

**SÍNTESIS POR RUTAS QUÍMICAS Y CARACTERIZACIÓN DEL DIÓXIDO DE
TITANIO: ESTUDIO PRELIMINAR DE SU ACCIÓN FOTOCATALÍTICA SOBRE
CÉLULAS CANCERÍGENAS**



MÓNICA ANDREA VARGAS URBANO

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS, NATURALES Y DE LA EDUCACIÓN
INGENIERÍA FÍSICA
GRUPO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MATERIALES CERÁMICOS
POPAYÁN
2010**

**SÍNTESIS POR RUTAS QUÍMICAS Y CARACTERIZACIÓN DEL DIÓXIDO DE
TITANIO: ESTUDIO PRELIMINAR DE SU ACCIÓN FOTOCATALÍTICA SOBRE
CÉLULAS CANCERÍGENAS**

MÓNICA ANDREA VARGAS URBANO

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Ingeniera Física**

Director

Dr. Jorge Enrique Rodríguez Páez

Codirector

Dr. Rubén Jesús Camargo Amado

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS EXÁCTAS, NATURALES Y DE LA EDUCACIÓN
INGENIERÍA FÍSICA
GRUPO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE MATERIALES CERÁMICOS
POPAYÁN
2010**

Nota de Aceptación

Director _____
Dr. Jorge Enrique Rodríguez P.

Jurado _____
Dra. Claudia Fernanda Villaquiran

Jurado _____
Dr. Nelson Rojas Martínez

Fecha de sustentación: Popayán, 13 julio de 2010

AGRADECIMIENTOS

Son tantas personas a las cuales debo parte de este triunfo, de lograr alcanzar esta primera parte de mi formación universitaria, la cual es el anhelo de todos los que así lo deseamos.

*Primero y antes que nada, quiero dar gracias a **Dios**, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo universitario.*

Agradezco con todo mi ser a mi familia; a mis padres Misael Vargas y María Nelsy Urbano, porque me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi perseverancia y mi empeño, y de no ser por el esfuerzo realizado por ellos, este logro no hubiese sido posible.

A mis hermanos Alex y Claudia por su apoyo incondicional, por creer en mi y ayudarme a seguir adelante.

A Andrés Felipe M., que ha estado conmigo en la última etapa de mi carrera, por compartir su tiempo a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas y la tristeza se transforma en alegría.

A Miguel y Santiago, dos personas que fueron mi apoyo durante este agradable periodo académico, por ser mis amigos, y por seguir siendo parte de mi vida.

A Jorge Enrique Rodríguez, director de este trabajo, por su confianza, disponibilidad y generosidad para compartir su experiencia y su amplio conocimiento, además de su valioso tiempo para llevar esta investigación a su culminación.

A Rubén Camargo, codirector, por su apoyo incondicional.

A la Universidad del Cauca, al programa de Ingeniería Física y a su maravilloso personal docente.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta investigación, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	19
1. INTRODUCCIÓN	20
1.1. Planteamiento del problema	25
1.2. Justificación	28
1.3. Objetivos	29
1.3.1. Objetivo general	29
1.3.2. Objetivos específicos	29
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	31
2.1. El TiO ₂ como fotocatalizador: sus propiedades fisicoquímicas	32
2.1.1. Propiedades fisicoquímicas del titanio	33
2.1.2. Cristalografía del dióxido de titanio, TiO ₂	35
2.2. Métodos convencionales y no convencionales para la preparación de polvos de dióxido de titanio, TiO ₂	37
2.2.1. Proceso sulfato	37
2.2.2. Proceso cloro	38
2.2.3. Método sol-gel	38
2.2.4. Método precursor polimérico (Pechini)	40
2.3. Usos y aplicaciones del dióxido de titanio, TiO ₂	42
2.4. Técnicas de oxidación	43
2.4.1. Actividad fotocatalítica del TiO ₂	44
2.5. Cáncer	47
2.5.1. Cáncer de piel	48
2.6. Cultivos celulares	49
2.7. Métodos de medición	50
2.7.1. Viabilidad celular	51

2.7.2. Citotoxicidad	52
2.7.3. Proliferación celular	53
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	55
3.1. Materiales	56
3.2. Métodos de síntesis	56
3.2.1. Método sol gel	57
3.2.2. Método de precursor polimérico (Pechini)	61
3.3. Técnicas de caracterización	64
3.3.1. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier FT-IR	64
3.3.2. Análisis térmico diferencial ATD y termogravimétrico TG	66
3.3.3. Difracción de rayos X	67
3.3.4. Microscopia Electrónica de Transmisión	69
3.3.5. Microscopia Electrónica de Barrido	70
4. SÍNTESIS DE TiO₂ POR EL MÉTODO SOL-GEL	72
4.1. Estudio de la formación de los soles	73
4.1.1. Sistema sin AcacH	74
4.1.2. Sistema con AcacH	88
4.1.2.1. Relación Ti : AcacH = 2:1	89
4.1.2.2. Relación Ti : AcacH = 3:1	102
4.2. Caracterización de los polvos obtenidos por el método sol- gel	114
4.2.1. Análisis térmico	115
4.2.1.1. Sistema sin AcacH	115
4.2.1.2. Sistema Ti : AcacH = 2:1	116
4.2.1.3. Sistema Ti : AcacH = 3:1	118
4.2.2. Espectroscopia Infrarroja	120
4.2.2.1. Espectros IR de las muestras obtenidas después del secado	120
4.2.2.2. Espectros IR del sistema de titanio sin AcacH	121
4.2.2.3. Espectros IR del sistema de titanio 2:1	125
4.2.2.4. Espectros IR del sistema de titanio 3:1	128
4.2.3. Difracción de rayos X	131
4.2.3.1. Difractogramas del material obtenido del secado	131

4.2.3.2. Difractogramas de las muestras del sistema de titanio sin AcachH132	
4.2.3.3. Difractogramas de las muestras del sistema de titanio 2:1	133
4.2.3.4. Difractogramas de las muestras del sistema de titanio 3:1	133
4.2.4. Microscopia Electrónica de Transmisión	134
4.2.4.1. Fotografías MET de muestras del sistema de titanio sin AcachH	134
4.2.4.2. Fotografías MET de muestras del sistema de titanio 2:1	135
4.2.4.3. Fotografías MET de muestras del sistema de titanio 3:1	136
4.2.5. Microscopia Electrónica de Barrido	137
4.2.5.1. Fotografías obtenidas con MEB de muestras sólidas del sistema de titanio sin AcachH y sistema 2:1	137
5. SINTESIS DE TiO₂ POR EL METODO PECHINI	140
5.1. Caracterización de los polvos obtenidos por el método Pechini	143
5.1.1. Análisis térmico: curvas de ATD/TG	143
5.1.2. Espectroscopia Infrarroja	145
5.1.2.1. Espectro de Infrarrojo del pre-calcinado obtenido	145
5.1.2.2. Efecto de la temperatura de tratamiento térmico	146
5.1.2.3. Efecto de la duración del tratamiento térmico	152
5.1.3. Difracción de rayos X	156
5.1.4. Microscopia Electrónica de Transmisión	157
5.1.5. Microscopia Electrónica de Barrido	159
6. EFECTO FOTOCATALITICO DEL TiO₂ SOBRE FIBROBLASTOS DE PIEL HUMANA NORMAL Y CELULAS CANCERIGENAS DE PIEL	161
6.1. Diseño experimental	162
6.1.1. Efecto citotóxico del TiO ₂ sobre fibroblastos de piel humana Normal	162
6.1.2. Efecto citotóxico de la radiación sobre fibroblastos de piel humana Normal	163
6.1.3. Efecto citotóxico de los factores tiempo de exposición a la radiación y concentración de TiO ₂ sobre fibroblastos de piel humana normal	163
6.1.4. Efecto citotóxico del TiO ₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma	164
6.1.5. Efecto citotóxico de la radiación sobre el cáncer de piel tipo Melanoma	164

6.1.6. Efecto citotóxico de los factores tiempo de exposición a la radiación y concentración de TiO ₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma	164
6.2. Descripción de la prueba	165
6.2.1. Preparación de las microplacas	165
6.2.2. Desarrollo de la prueba	166
6.3. Resultados obtenidos	168
6.4. Análisis de resultados	172
6.4.1. Efecto citotóxico del TiO ₂ sobre fibroblastos de piel humana normal	173
6.4.2. Efecto citotóxico del TiO ₂ sobre cáncer de piel tipo melanoma	178
6.4.3. Efecto citotóxico de la radiación sobre fibroblastos de piel humana normal	185
6.4.4. Efecto citotóxico de la radiación sobre cáncer de piel tipo melanoma	190
6.4.5. Efecto citotóxico de los factores concentración de TiO ₂ y tiempo de exposición, con la radiación, sobre fibroblastos de piel humana normal	195
6.4.6. Efecto citotóxico de los factores concentración de TiO ₂ y tiempo de exposición, con la radiación, sobre cáncer de piel tipo melanoma	201
7. CONCLUSIONES	207
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	212
ANEXO I	218
ANEXO II	221
ANEXO III	224
ANEXO IV	231
ANEXO V	235
ANEXO VI	241

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Principales características fisicoquímicas del titanio	33
Tabla 2.2. Propiedades mecánicas del titanio	34
Tabla 2.3. Características cristalográficas del titanio	35
Tabla 2.4. Mecanismos que ocurren durante el proceso fotocatalítico que presenta el dióxido de titanio irradiado	47
Tabla 3.1. Reactivos utilizados para la síntesis de polvos cerámicos de TiO ₂ , utilizando el método sol gel	56
Tabla 3.2. Reactivos utilizados para la síntesis de polvos cerámicos de TiO ₂ , utilizando el método Pechini	56
Tabla 3.3. Concentraciones molares, en una solución de 50 ml de los diferentes reactivos utilizados en la formación de los soles del sistema de titanio	58
Tabla 3.4. Cálculos estequiométricos de los diferentes reactivos utilizados en el método Pechini para sintetizar TiO ₂	61
Tabla 5.1. Valores de los parámetros más importantes al realizar la deconvolución de las bandas que componen el espectro IR, en la región entre 400 y 1000 cm ⁻¹ , de la muestra calcinada a 250°C y de las muestras tratadas térmicamente a 400, 450, 500, 600 y 700°C	152
Tabla 5.2. Resultados obtenidos del proceso de deconvolución de las bandas que componen el espectro IR de las muestras tratadas térmicamente a 450°C durante diferentes tiempos	155
Tabla 6.1. Configuración de las microplacas con radiación y sin radiación a 45 y 90 minutos	157
Tabla 6.2. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel	168
Tabla 6.3. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel	169

Tabla 6.4. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel 169

Tabla 6.5. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel 170

Tabla 6.6. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el Pechini 170

Tabla 6.7. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini 171

Tabla 6.8. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini 171

Tabla 6.9. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini 172

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2.1. Estructuras cristalinas del dióxido de titanio	36
Figura 2.2. Disposiciones de los átomos de Ti y O en las fases anatasa y rutilo del TiO ₂	37
Figura 2.3. Esquema del proceso fotocatalítico sobre una partícula semiconductora de TiO ₂ .	46
Figura 2.4. Cámara de conteo celular de Neubauer	51
Figura 2.5. Reacciones del Kit LDH ® ROCHE	53
Figura 2.6. Espectrofotómetro multiplicas - Medidor de placas ELISA	54
Figura 2.7. Producción del Formazan, a partir de las sales del tetrazolium del XTT. Kit XTT ® ROCHE	54
Figura 3.1. Reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren durante el proceso sol-gel	58
Figura 3.2. Textura de las suspensiones coloidales obtenidas durante el desarrollo del proceso sol-gel: sin acomplejante (a) relación Ti:AcacH=2:1 (b) y relación Ti:AcacH=3:1	59
Figura 3.3. Esquema de las etapas del proceso sol-gel utilizado para sintetizar polvos de TiO ₂	60
Figura 3.4. Etapa de conformación de la resina durante el desarrollo del proceso Pechini, utilizado para sintetizar el TiO ₂ utilizado en este trabajo	62
Figura 3.5. Esquema del método de precursor polimérico Pechini utilizado en este trabajo para sintetizar el TiO ₂ requerido	63
Figura 3.6. Espectrómetro de Infrarrojo (FTIR), marca Termo Nicolet IR200, utilizado en este trabajo	66
Figura 3.7. Curvas típicas de un análisis (a) termogravimétrico y (b) térmico diferencial	66

- Figura 3.8.** Difractómetro de rayos X (DRX), marca Philips PW1710, utilizado en este trabajo 68
- Figura 3.9.** Microscopio electrónico de transmisión (MET), marca JEOL JEM-1200 (Unidad de Microscopia Electrónica – Unicauca), utilizado en este trabajo 70
- Figura 4.1.** Espectros infrarrojos del sistema de titanio sin Acach a tiempos cortos de conformación del sol de titanio 75
- Figura 4.2.** Espectros IR, a tiempos cortos, correspondientes a muestras tomadas a la primer lectura (a), a los 15 minutos (b), a los 30 minutos (c), a los 45 minutos (d) y a los 60 minutos (e), de soles del sistema sin Acach (región entre 400 y 900 cm^{-1}) 77
- Figura 4.3.** Curvas que muestran la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos cortos, de las bandas a 435, 500, 632, 735 y 800 cm^{-1} (a) y 1048, 1083 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema de titanio sin Acach, durante la conformación de los soles de titanio 78
- Figura 4.4.** Espectros IR en la región entre 1000 y 1150 cm^{-1} , para tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e) de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema sin Acach 81
- Figura 4.5.** Espectros IR correspondientes a muestras del sistema de titanio, sin Acach, para tiempos largos de conformación del sol de titanio 81
- Figura 4.6.** Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} a tiempos largos correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y a las 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema sin Acach 83
- Figura 4.7.** Curvas que muestran la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos largos, de las bandas a 435, 500, 604 y 800 cm^{-1} (a) y 1040, 1083 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema de titanio sin Acach, durante la conformación de los soles de titanio 84
- Figura 4.8.** Espectros IR en la región 1000 y 1150 cm^{-1} , a tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c) y a las 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema sin Acach 86

Figura 4.9. Seguimiento de la evolución del sistema de titanio y formación de un precipitado en el seno de la solución. Las fotografías se tomaron cada 20 minutos. 88

Figura 4.10. Material obtenido al secar a 80° C, la suspensión de titanio obtenida al final del proceso sol – gel. 88

Figura 4.11. Espectros IR del sistema Ti:AcacH= 2:1 en tiempos cortos de la evolución del sol de titanio. 89

Figura 4.12. Espectros IR, tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e) de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH= 2:1, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} . 92

Figura 4.13. Curvas que indican la evolución del área integrada (A_b/A_T), para tiempos cortos, de las bandas a 438, 590, 600, 640, 735, 800 y 880 cm^{-1} (a) y 1050, 1080 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:AcacH = 2:1, durante la conformación de los soles de titanio. 93

Figura 4.14. Espectros IR tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema 2:1, en la región entre 1000 y 1150 cm^{-1} . 97

Figura 4.15. Espectros IR del sistema Ti:AcacH = 2:1 para tiempos largos de evolución del sol de titanio 97

Figura 4.16. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y 72 horas (d) de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 2:1. 99

Figura 4.17. Curvas que indican la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos largos, de las bandas a 438, 500, 634, 745 y 883 cm^{-1} (a) y 1050, 1080 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:AcacH = 2:1, durante la conformación de los soles de titanio.

Figura 4.18. Espectros IR, en la región 1000 y 1150 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y a 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 2:1. 102

Figura 4.19. Espectros IR del sistema Ti:AcacH = 3:1 a tiempos cortos de evolución del sol de titanio. 103

Figura 4.20. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1. 105

Figura 4.21. Curvas que indican la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos cortos, de las bandas a 440, 478, 606, 657, 743, 809 y 885 cm^{-1} (a) y 1054, 1126 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:AcacH = 3:1, durante la conformación de los soles de titanio. 106

Figura 4.22. Espectros IR, en la región entre 1000 y 1150 cm^{-1} tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1. 109

Figura 4.23. Espectros infrarrojos del sistema Ti:AcacH = 3:1 a tiempos largos de evolución del sol de titanio. 109

Figura 4.24. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1. 111

Figura 4.25. Curvas que muestran la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos largos, de las bandas a 439, 653, 750, 806, 850 y 882 cm^{-1} (a) y 1049, 1088 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:AcacH = 3:1, durante la conformación de los soles de titanio. 112

Figura 4.26. Espectros IR, en la región 1000 y 1150 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1. 114

Figura 4.27. Curvas de ATD/TG correspondientes al sólido obtenido del proceso de secado del sistema sin acacH. 115

Figura 4.28. Curvas de ATD/TG correspondientes al material obtenido del proceso de secado del sistema Ti:AcacH = 2:1 en medio básico. 116

- Figura 4.29.** Curvas de ATD/TG para el material obtenido del proceso de secado del sistema Ti:AcacH = 2:1 medio ácido. 118
- Figura 4.30.** Curvas de ATD/TG para el material obtenido del proceso de secado del sistema Ti:AcacH = 3:1. 119
- Figura 4.31.** Rampa de tratamiento térmico utilizado para obtener los polvos cerámicos de TiO₂ obtenidos por el método sol-gel. 120
- Figura 4.32.** Espectros IR del material secado a 80°C de los sistemas de titanio: sin acacH, relación 2:1 medio básico, relación 2:1 medio ácido y relación 3:1, obtenidos por el método sol-gel. 121
- Figura 4.33.** Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema sin AcacH obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas. 122
- Figura 4.34.** Deconvolución de los espectros IR, región de 400 a 1000 cm⁻¹, de muestras sólidas del sistema de titanio sin acacH sintetizado por el método sol-gel y tratadas térmicamente por dos horas a: (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C y(d) 450°C. 124
- Figura 4.35.** Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema de titanio 2:1 obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas. 125
- Figura 4.36.** Deconvolución de los espectros IR, región entre 400 a 1000 cm⁻¹, de sólidos del sistema de titanio 2:1, sintetizado por el método sol-gel y tratadas térmicamente por dos horas a temperaturas de: (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C y(d) 450°C. 128
- Figura 4.37.** Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema de titanio 3:1 obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas. 128
- Figura 4.38.** Deconvolución de los espectros IR, región de 400 a 1000 cm⁻¹, correspondiente a sólidos del sistema de titanio 3:1, sintetizado por el método sol-gel, y tratadas térmicamente por dos horas a temperaturas de: (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C y(d) 450°C. 130
- Figura 4.39.** Difractogramas de rayos X de las muestras sólidas secadas a 80°C/ 24h de los sistemas de titanio: (a) sin acacH, (b) Ti:AcacH = 2:1 y (c) Ti:AcacH = 3:1. 131

- Figura 4.40.** Difractogramas de rayos X correspondientes a los sólidos del sistema de titanio sin acach, obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas. 132
- Figura 4.41.** Difractogramas de rayos X de los sólidos del sistema de titanio 2:1, obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas. 133
- Figura 4.42.** Difractograma de rayos X correspondiente al sólido del sistema de titanio 3:1 obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/ 2h. 134
- Figura 4.43.** Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, del sistema sin Acach, obtenido por el método sol-gel y tratado térmicamente a: (a) 100°C; (b) 450°C/2h y (c) 700°C /2h. 135
- Figura 4.44.** Fotografías tomadas con MET del material en polvo obtenido del sistema de titanio 2:1 sintetizado por sol-gel y tratado a: (a) 100°C; (b) 450°C/2h y (c) 700°C/2h. 136
- Figura 4.45.** Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, del sistema de titanio 3:1, obtenido por sol-gel y tratado a: (a) 100°C; (b) 450°C/2h y (c) 700°C/2h. 137
- Figura 4.46.** Fotografías obtenidas con MEB del sólido del sistema de titanio sin Acach obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/2h [aumentos (a) 1000X, (b) 2000X y (c) 5000X]. 138
- Figura 4.47.** Fotografías obtenidas con MEB del sólido del sistema de titanio 2:1 obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/2h [aumentos (a) 1000X, (b) 2000X y (c) 5000X]. 139
- Figura 5.1.** Fotografías que ilustran de la evolución y formación de la resina polimérica durante el desarrollo del proceso Pechini. 142
- Figura 5.2.** Material pre-calcinado que se obtuvo durante el desarrollo del proceso Pechini. 142
- Figura 5.3.** Curvas de ATD/TG correspondientes al sólido pre-calcinado obtenido durante el desarrollo del proceso Pechini. 144
- Figura 5.4.** Programa de calentamiento utilizado en este trabajo para obtener los polvos cerámicos de TiO₂ por el método Pechini. 145
- Figura 5.5.** Espectro IR correspondiente al material pre-calcinado obtenido por el método Pechini. 145

- Figura 5.6.** Espectros IR correspondientes a sólidos obtenidos por el método Pechini y que fueron tratadas a diferentes temperaturas. 147
- Figura 5.7.** Deconvolución de los espectros IR, en la región de 1000 a 400 cm^{-1} del polvo cerámico sintetizado por el método Pechini, que fue sometido durante 3 horas a diferentes tratamientos térmicos: (a) calcinado a 250°C, (b) 400°C, (c) 450°C, (d) 500°C, (e) 600°C y (f) 700°C. 151
- Figura 5.8.** Espectros IR de los polvos cerámicos obtenidos por el método Pechini correspondientes a las muestras tratadas térmicamente a: 450°C/3 horas, 450°C/ 5horas y 450°C/7 horas. 153
- Figura 5.9.** Deconvolución de los espectros infrarrojos, en la región de 1000 a 400 cm^{-1} , del polvo cerámico sintetizado por el método Pechini, y tratado a 450°C durante: (a) 3 horas, (b) 5 horas y (c) 7 horas. 155
- Figura 5.10.** Evolución del área integrada, A_b/A_T , de los modos vibracionales correspondientes a las bandas 466, 515 y 715 cm^{-1} correspondientes a los espectros IR de muestras tratadas térmicamente a 450°C durante diferentes tiempos. 156
- Figura 5.11.** Difractogramas de rayos X correspondientes al sistema de titanio, pH 9, tratadas a 450°C por 5 y 7 horas. Adicionalmente se han colocado los difractogramas de la muestra calcinada y tratada a 350°C/3 horas. 157
- Figura 5.12.** Fotografías obtenidas con MET de muestras sólidas de TiO_2 , obtenidas por el método de Pechini, y tratadas a: (a) 250°C, (b) 450°C/3h y (c) 500°C/3h. 158
- Figura 5.13.** Fotografías obtenidas con MET de muestras sólidas de TiO_2 , obtenidas por el método de Pechini, y tratadas a: (a) 450°C/3h, (b) 450°C/5h y (c) 450°C/7h. 158
- Figura 5.14.** Fotografías obtenidas con MEB del sólido sintetizado por Pechini, y tratado térmicamente a 450 °C durante 3 horas, [aumentos (a)1000X, (b)2000X y (c)5000X]. 159
- Figura 6.1.** Cabina de flujo laminar tipo A2B3. 166
- Figura 6.2.** Proceso de llenado de las microplacas. 168
- Figura 6.3.** Gráfico de residuos de Absorbancia de datos obtenidos experimentalmente considerando el efecto del TiO_2 , sintetizado por los métodos sol gel y Pechini, sobre FPHN. 173

- Figura 6.4.** Gráfico de Pareto de cada una de las variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre FPHN. 174
- Figura 6.5.** Gráfico de efectos principales, de las diferentes variables analizadas, considerando para el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre FPHN. 176
- Figura 6.6.** Graficas de superficie de respuesta: método vs concentración (a) y tiempo de exposición vs concentración (b), analizando el efecto del TiO_2 , sintetizado por el método sol gel y Pechini, sobre FPHN. 177
- Figura 6.7.** Proliferación de FPHN al exponer el sistema durante 45 minutos al dióxido de titanio (fase anatasa), obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b). 177
- Figura 6.8.** Proliferación de FPHN al exponer el sistema durante 90 minutos al dióxido de titanio (fase anatasa), obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b). 178
- Figura 6.9.** Gráfico de residuos de la Absorbancia para los datos obtenidos experimentalmente al considerar el efecto del TiO_2 , obtenido por los métodos sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 179
- Figura 6.10.** Grafico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 180
- Figura 6.11.** Gráfico de efectos principales de la absorbancia considerando las diferentes variables analizadas para estudiar el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 181
- Figura 6.12.** Gráficas de superficie de respuesta: del método de síntesis vs concentración (a) y del tiempo de exposición vs concentración (b), considerando el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 182
- Figura 6.13.** Proliferación de cáncer de piel tipo melanoma (densidad óptica en función del tiempo), al exponer el sistema durante 45 minutos al dióxido de titanio, fase anatasa, obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).
- Figura 6.14.** Proliferación de cáncer de piel tipo melanoma (densidad óptica en función del tiempo), al exponer el sistema durante 90 minutos al dióxido de titanio, fase anatasa, obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

- Figura 6.15.** Gráfico de residuos para la Absorbancia de los datos obtenidos experimentalmente considerando el efecto de la radiación sobre los FPHN. 185
- Figura 6.16.** Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA, considerando el efecto de la radiación sobre FPHN. 186
- Figura 6.17.** Gráfico de efectos principales de las diferentes variables analizadas considerando el efecto de la radiación sobre los FPHN. 187
- Figura 6.18.** Grafica de superficie de respuesta del tiempo de exposición vs radiación, considerando el efecto de la radiación sobre FPHN. 188
- Figura 6.19.** Interacción de los factores tiempo de exposición y radiación para los FPHN. 188
- Figura. 6.20.** Proliferación de los FPHN (densidad óptica en función del tiempo) expuestos a: 45 minutos a la radiación (a) y 90 minutos a la radiación (b). 189
- Figura 6.21.** Gráfico de residuos para la Absorbancia correspondiente a los datos experimentales que indican el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 191
- Figura 6.22.** Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 191
- Figura 6.23.** Gráfico de efectos principales, de las diferentes variables analizadas, considerando el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 193
- Figura 6.24.** Grafica de la superficie de respuesta del tiempo de exposición vs radiación, analizando para el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 193
- Figura 6.25.** Proliferación (densidad óptica en función del tiempo) de cáncer de piel tipo melanoma, expuestos a: 45 minutos a la radiación (a) y 90 minutos a la radiación (b). 194
- Figura 6.26.** Gráfico de residuos para la Absorbancia obtenido de los datos experimentales al considerar el efecto del TiO_2 y la radiación sobre FPHN.
- Figura 6.27.** Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto de la radiación y el TiO_2 sobre los FPHN.

- Figura 6.28.** Gráfico de efectos principales de las diferentes variables analizadas, considerando el efecto de la radiación y el TiO₂ sobre los FPHN. 198
- Figura 6.29.** Graficas de superficie de respuesta para la concentración de TiO₂ vs método de síntesis (a), concentración de TiO₂ vs tiempo de exposición (b) y el método de síntesis vs tiempo de exposición (c), analizando el efecto de la radiación y el TiO₂ sobre los FPHN. 199
- Figura. 6.30.** Proliferación de los FPHN para 45 minutos de exposición a la radiación, tomando a diferentes concentraciones de TiO₂ sintetizados por: el método sol gel (a) y el método Pechini (b). 200
- Figura 6.31.** Proliferación de los FPHN para 90 minutos de exposición a la radiación, tomando a diferentes concentraciones de TiO₂ sintetizados por: el método sol gel (a) y el método Pechini (b). 200
- Figura 6.32.** Gráfico de residuos para la Absorbancia correspondientes a datos experimentales del efecto del TiO₂ y la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 201
- Figura 6.33.** Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto de la radiación y el TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 202
- Figura 6.34.** Gráfico de efectos principales de las diferentes variables analizadas, considerando el efecto de la radiación y el TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma. 203
- Figura 6.35.** Grafica de superficie de respuesta de la concentración de TiO₂ vs método de síntesis (a), concentración de TiO₂ vs tiempo de exposición (b) y método de síntesis vs tiempo de exposición (c), analizando el efecto de la radiación y el TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma 204
- Figura 6.36.** Proliferación del cáncer de piel tipo melanoma durante 45 minutos de exposición a la radiación, para diferentes concentraciones de TiO₂, obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b). 206
- Figura 6.37.** Proliferación del cáncer de piel tipo melanoma durante 90 minutos de exposición a la radiación, para diferentes concentraciones de TiO₂, obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b). 206

RESÚMEN

El dióxido de titanio, TiO_2 , es un compuesto de gran interés científico y tecnológico. El TiO_2 , es un semiconductor tipo n sensible a la luz y absorbe radiación electromagnética principalmente en la región UV; es un óxido anfótero muy estable químicamente. Por las características mencionadas es el fotocatalizador más empleado y actualmente se utiliza para degradar moléculas orgánicas durante la purificación del agua, además se utiliza como pigmento blanco, recubrimiento anticorrosivo, sensor de gases, absorbente de rayos UV en productos cosméticos y de manera general en la industria cerámica.

En este trabajo se sintetizó el dióxido de titanio, TiO_2 , a través de dos (2) métodos químicos: sol-gel y precursor polimérico (Pechini), siguiendo los procedimientos respectivos definidos para cada uno de ellos. Se utilizó como precursor de titanio el tetrabutóxido de titanio (TBT), que se mezcló con agua – alcohol y acomplejante para que ocurrieran reacciones de hidrólisis y condensación, en el proceso Sol-gel, o con etilenglicol y ácido cítrico para favorecer reacciones de esterificación y poliesterificación, en el método Pechini. Obtenido el sólido, se definió la temperatura óptima de tratamiento para sintetizar el óxido de interés, TiO_2 fase anatasa, utilizando el análisis térmico (ATD-TG) de la muestra sólida seca. Las características del polvo cerámico de TiO_2 se determinaron empleando espectroscopía infrarroja (FT-IR) para analizar los grupos funcionales presentes, difracción de rayos X (DRX) para identificar las fases cristalinas, y para determinar el tamaño de partícula, la homogeneidad y uniformidad de las nanopartículas se usó microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB). Paralelamente, se llevaron a cabo estudios de la incidencia del efecto fotocatalítico de estas partículas en líneas de células cancerígenas, realizando pruebas de citotoxicidad y viabilidad celular.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Con el transcurso del tiempo, el hombre descubrió técnicas para producir materiales con propiedades superiores a las de los naturales; entre estos nuevos materiales se encuentran la cerámica y algunos metales. Hace relativamente poco tiempo que los científicos llegaron a comprender la relación entre los elementos estructurales de los materiales y sus propiedades. Con base en esta información se han desarrollado miles de materiales distintos con características muy especiales para satisfacer las necesidades de la moderna y compleja sociedad; tales como cerámicos, metales, plásticos, vidrios y fibras.

La ciencia e ingeniería de los materiales es la encargada de estudiar las relaciones entre propiedades – estructura, diseño y optimización para conseguir un conjunto predeterminado de propiedades. Un área de gran importancia está relacionada con el estudio de los óxidos, la cual representa una excelente opción tecnológica porque ellos presentan diversas propiedades que los torna objeto de gran estudio e investigación.

Los materiales cerámicos son compuestos constituidos por metales y no metales, tales como los óxidos, nitruros y carburos, los cuales presentan una amplia gama de propiedades mecánicas y físicas, sus aplicaciones pueden ser como materiales refractarios, dispositivos eléctricos, cementos, vidrios, implantes dentales, prótesis de cadera y rodilla, hasta en transbordadores espaciales. Debido a sus enlaces iónicos, covalentes o ioni-covalentes, los materiales cerámicos, por lo general, son duros, frágiles, con un alto punto de fusión, baja conductividad eléctrica y térmica, buena estabilidad química y térmica, y elevada resistencia a la compresión [1]. Las nuevas técnicas de procesamiento han permitido obtener cerámicos lo suficientemente resistentes a la fractura para ser utilizados en aplicaciones de carga, con alta resistencia a la corrosión y a la oxidación, en diversas condiciones ambientales.

Entre las aplicaciones que en mayor grado ha motivado el desarrollo de nuevos materiales cerámicos se destaca el empleo de materiales con excelentes resistencia mecánica, lo que ha permitido el desarrollo y perfeccionamiento de alúminas de distintos grados de pureza, carburo de silicio, carburo de boro, diboruro de titanio, nitruro de titanio, entre otros [2].

En el caso específico del dióxido de titanio, de interés para este proyecto, concretamente la fase anatasa, es ampliamente utilizada tecnológicamente por sus propiedades ópticas y electrónicas, bajo costo, estabilidad química y principalmente baja toxicidad [3]. Un gran número de trabajos [4], por ejemplo, han reportado que el TiO_2 es un buen fotocatalizador debido a que posee un adecuado valor de gap de energía ($\sim 3\text{eV}$).

Por otro lado, la salud es uno de los indicadores más importantes para determinar el nivel de bienestar de la población de un país. Es por esto que los gobiernos e instituciones dedican un gran esfuerzo para dar soluciones a los problemas de salud que presenta su población. Uno de los problemas de salud, que cada día deja más víctimas, es el cáncer. Tanto en países industrializados como en países en vía de desarrollo, el cáncer encabeza la lista de causas de muerte y a diferencia de otras enfermedades, es de difícil predicción y tratamiento.

Los métodos más comunes para el tratamiento del cáncer son: la quimioterapia (utilización de fármacos), radioterapia (usando fuentes radiactivas), la cirugía o la combinación de los métodos. Aunque en algunos pacientes pueden ser efectivos, estos son altamente perjudiciales y causan fuertes efectos secundarios como daño en células sanas y alteraciones de las mismas con el tiempo, debido a la permanencia de las sustancias químicas en el cuerpo y a la acción radiactiva.

Desde los primeros reportes del uso del TiO_2 para tratamientos microbiales, la actividad fotocatalítica de este óxido ha recibido cada vez mayor atención. En los últimos años se han realizado muchos estudios donde se ha utilizado el TiO_2 para fotodescomponer contaminantes orgánicos [5] lo que contrasta con los pocos estudios que investigaban la acción de TiO_2 en las ciencias de la vida, especialmente en el campo del tratamiento del cáncer.

Ante la necesidad de tratar efectivamente el cáncer, y disminuir los nocivos efectos secundarios, se han venido estudiando métodos alternativos de tratamiento. Concretamente, desde mediados de la década de los 80, se viene investigando la posibilidad de tratar el cáncer mediante fotocátalisis utilizando el TiO_2 como catalizador. Teniendo en cuenta que en el grupo CYTEMAC se ha trabajado en la síntesis de TiO_2 por diferentes rutas químicas [6], para controlar la fase presente, el tamaño y morfología de las partículas, y que existe en el mundo científico el interés mencionado anteriormente, se realizó esta investigación que estuvo enfocada en determinar el efecto del método de síntesis sobre las propiedades fotocatalíticas de polvos de dióxido de titanio, obtenidos por dos métodos químicos: sol gel y precursor polimérico (Pechini). Se estudió el efecto que tenían los diferentes parámetros de los métodos de síntesis utilizados, tales como naturaleza del precursor de titanio y del solvente, las condiciones más adecuadas de pH y temperatura de tratamiento térmico. Para ello se determinaron las mejores condiciones de síntesis y se analizó el efecto de las características de la materia prima sobre su funcionalidad fotodegradante.

Inicialmente se caracterizaron los polvos cerámicos sintetizados, por las dos rutas químicas mencionadas, para conocer las fases cristalinas presentes, los grupos funcionales existentes en las muestras, su comportamiento ante diferentes tratamientos térmicos realizados, y determinar el tamaño y la morfología de las partículas.

Luego se realizaron estudios preliminares para determinar el efecto fotocatalítico de los polvos cerámicos sintetizados en este trabajo, sobre células de piel sanas y cancerígenas, realizando ensayos de citotoxicidad mediante la actividad de Lactato deshidrogenasa (LDH) y proliferación por conteo celular mediante el método de azul de tripan.

Estos resultados servirán para dar inicio a una nueva línea de investigación en el grupo y contribuir al posible desarrollo de un procedimiento alternativo para el tratamiento del cáncer, que disminuya los efectos secundarios.

1.1. Planteamiento del problema

Estudios realizados recientemente revelan que células de cáncer de colon tratadas con nanopartículas de TiO_2 fotoexcitadas ($C > 200 \mu\text{g/mL}$) son degradadas, encontrándose contraídas y fragmentadas [7]. Este resultado ha motivado a los investigadores a determinar el mecanismo de fotoexcitación del TiO_2 , que actuaría en la degradación de dichas células, conocimiento que se podría extrapolar a otros tipos de cáncer. Para aportar al tema de nuevas terapias, desde el punto de vista del material, se realizó este proyecto que consideró la síntesis del TiO_2 por rutas químicas y el uso de estas nanopartículas de TiO_2 en terapias fotodinámicas. Se analizó el efecto de la fase anatasa, el tamaño de partícula, además de la concentración, tiempo de exposición e intensidad de la radiación UV incidente sobre las células libres de cáncer y la degradación de las células cancerígenas. Además se buscó determinar el efecto del método de síntesis sobre la funcionalidad del TiO_2 .

Todo lo anterior ha sido motivado porque el cáncer es un problema primordial para la sociedad debido al dolor y al sufrimiento personal que causa, a los costos médicos crecientes, las muertes prematuras, y la pérdida de años productivos de vida. Las políticas para el control del cáncer deberían utilizar adecuadamente la evidencia científica, especialmente los hallazgos que resultan de la investigación y de la vigilancia para ello. La clave para controlar este flagelo está, entonces, en el conocimiento. Actualmente, se presentan a nivel mundial alrededor de 8 millones de casos nuevos de cáncer anuales (excluyendo el cáncer de piel no melanoma) [8].

En el año 2000 los tumores malignos representaron el 12% de alrededor de 56 millones de muertes que se produjeron en el mundo. Para ese mismo año cerca de 5,3 millones de hombres y 4,7 millones de mujeres desarrollaron la

enfermedad, y las proyecciones de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC por su nombre en inglés) muestran que para el año 2020 probablemente se habrá producido un incremento de 50% en el número de casos nuevos, los que llegarán a 15 millones [9].

El cáncer representa en los países occidentales el 25% de todas las muertes, encabezando la lista de causas de muerte. Según el Instituto Nacional de Cancerología, sólo en Colombia en el año 2000 murieron 27.255 personas por causa del cáncer, mientras que para el año 2002 el número de muertes causadas por los distintos tipos de cáncer, a nivel nacional, fue de 28.627 personas [10]. Esto evidencia un incremento considerable en la tasa de incidencia y mortalidad causada por esta enfermedad.

Debido a las limitaciones y dependencia de tipo científico y tecnológico, Colombia ha basado sus intervenciones, para la prevención y control del cáncer, en estrategias desarrolladas por las naciones industrializadas y en las recomendaciones de organismos internacionales de carácter multilateral. Usualmente, los tratamientos para el cáncer son de naturaleza quirúrgica así como las terapias con radiación (utilizando sustancias radiactivas) y químicos (utilización de fármacos), que generan efectos secundarios en el cuerpo humano.

Es necesario, por lo tanto, realizar investigaciones que conduzcan a terapias eficaces y menos agresivas. Con los avances de la fotoquímica, y la facilidad de inducir reacciones químicas por la incidencia de radiación ultravioleta, se han desarrollado nuevos campos de aplicación, con las denominadas terapias asistidas con luz o Terapia Fotodinámica (Photodynamic Therapy: PDT). En ellas, la luz de una longitud de onda, previamente establecida, es absorbida por moléculas del organismo o por sustancias implantadas en el mismo, estas sustancias son fotocatalizadores que en estado excitado generan especies

oxidantes, produciendo o catalizando cambios que llevan a la destrucción celular; basándose en este principio, se han desarrollado terapias para el tratamiento y muerte de células cancerígenas.

1.2. Justificación

Es conocido a nivel mundial que el número de casos de cáncer aumenta de manera rápida y progresiva. En Colombia, los incrementos en las tasas de incidencia y mortalidad para la mayoría de tipos de cáncer lo definen como un problema creciente de salud pública que se ubica como la tercera causa de muerte en el país, después de la violencia y las enfermedades cardiovasculares. Esto exige establecer tratamientos efectivos para su erradicación. La llamada terapia fotodinámica, usando agentes fotosensibilizadores de naturaleza semiconductor y con tamaño nanométrico, está siendo explorada actualmente por su particular efecto fototóxico, en diversos sistemas biológicos.

La fotocatalisis con TiO_2 es una opción viable para el tratamiento alternativo del cáncer debido a que presenta una alta citotoxicidad, en presencia de sistemas cancerígenos, cuando se le hace incidir radiación UVA. Por esta razón es necesario evaluar cuidadosamente la influencia del tamaño, estructura y concentración de las nanopartículas de TiO_2 sobre su efecto fototóxico, esto para entender mejor los mecanismos de toxicidad involucrados y con esta información poder abordar el tema de tratamiento contra el cáncer utilizando fotocatalisis heterogénea. Igualmente es importante determinar el efecto que tiene el método de síntesis sobre la funcionalidad del TiO_2 .

En este proyecto se investigó el efecto fotocatalítico de nanopartículas de TiO_2 sobre células de piel sanas y cancerígenas. La investigación se realizó con el fin de determinar el efecto de nanopartículas de TiO_2 , sintetizadas por rutas químicas, en la degradación de tumores malignos y sobre las células libres de cáncer.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Sintetizar TiO_2 en diferentes fases, utilizando rutas químicas, y estudiar el efecto fotocatalítico del TiO_2 , sobre la degradación de células de piel humana, sanas y cancerígenas.

1.3.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de TiO_2 empleando los métodos sol-gel y precursor polimérico (Pechini), definiendo las condiciones más adecuadas para su obtención: valor de pH, naturaleza del precursor de titanio y del solvente, y temperatura de tratamiento térmico, así como estandarizar la metodología de síntesis de nanopartículas para garantizar la reproducibilidad de sus características.
- Determinar las características estructurales de las nanopartículas sintetizadas utilizando para ello técnicas experimentales como Difracción de rayos X (DRX), Espectroscopía Infrarroja (FTIR), Microscopía Electrónica (MEB y MET) y ATD-TG.
- Obtener resultados preliminares que permitan determinar el efecto fotocatalítico de las nanopartículas de TiO_2 , (fase anatasa), sintetizadas por rutas químicas, sobre células de piel sanas y cancerígenas, realizando para ello ensayos de citotoxicidad, mediante la actividad de Lactato deshidrogenasa (LDH) y la proliferación por conteo celular mediante el método de azul de tripan.

- Determinar la correlación entre los parámetros de síntesis, las propiedades estructurales de las nanopartículas de TiO_2 y su potencial funcionalidad como material degradante de células cancerígenas.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. El TiO₂ como fotocatalizador: sus propiedades fisicoquímicas

El fenómeno de fotocatalisis es una funcionalidad que se viene investigando desde hace relativamente poco tiempo, desde 1985 [11], y es el dióxido de titanio el que más se ha estudiado.

La capacidad fotocatalítica del dióxido de titanio se ha estudiado de forma exhaustiva en los últimos 25 años con el fin de eliminar compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el agua contaminada requerida para consumo humano, desinfectar el aire en los servicios médicos y favorecer la oxidación parcial de los compuestos orgánicos; esta actividad fotocatalítica es más activa en cristales de TiO₂ fase anatasa [11].

Desde los primeros reportes del uso del TiO₂ para tratamientos microbiales, la capacidad fotocatalítica de este óxido ha recibido cada vez mayor atención. Este interés contrasta con los pocos estudios sobre el posible uso del TiO₂ en las ciencias de la vida, especialmente en el campo del tratamiento del cáncer. La fototerapia de células malignas, utilizando el TiO₂, ha mostrado que este óxido es un potencial agente fotosensibilizador para la terapia fotodinámica debido a su efecto foto-tóxico [5]. Algunos estudios consideran el TiO₂ como una sustancia con potenciales usos en los tratamientos de diferentes tipos de cáncer [11].

El dióxido de titanio presenta un efecto de citotoxicidad, al estar expuesto a la luz, y se investiga la posibilidad de aprovechar este comportamiento para desarrollar terapias que eviten las limitaciones existentes en los tratamientos convencionales. Existen algunos estudios que han explorado la combinación de terapias fotodinámicas, utilizando nano-TiO₂, con quimioterapia, aplicándolos simultáneamente [12].

Algunos Investigadores [13, 14] han encontrado inconvenientes en el uso del TiO₂ en estos tratamientos, por su baja selectividad y la insuficiente acumulación de TiO₂ en el entorno de las células cancerígenas, considerando que se requieren altas concentraciones de TiO₂ para ocasionar la muerte celular. Por tal motivo se han realizado estudios [13] modificando las nanopartículas de TiO₂, con biomoléculas, para favorecer un ataque preferencial de las células cancerígenas, mejorando así su selectividad y eficiencia. Por otro lado, se ha sugerido la utilización de la electroporación, aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular ocasionado por un campo eléctrico aplicado desde el exterior, con el fin de mejorar la presencia, en la célula cancerosa, de los anticuerpos y el TiO₂, conjugados [13, 14]. Este procedimiento de degradación de las células cancerígenas combina la acción de dos factores: la intensidad de radiación ultravioleta (<400 nm) y la concentración del catalizador, comúnmente TiO₂ [14].

2.1.1. Propiedades fisicoquímicas del titanio

El titanio es un elemento químico de símbolo, Ti, número atómico 22 y peso atómico 47.90 gr/mol. El elemento fue descubierto en 1791 por el sacerdote y mineralogista inglés William Gregor y en 1795, el químico alemán Martín Kalprotz, descubridor del uranio, le dio el nombre de titanio [15]. En la naturaleza se encuentran 5 isótopos estables; 46, 47, 48, 49 y 50.

Tabla 2.1. Principales características fisicoquímicas del titanio [15].

Símbolo	Ti
Numero atómico	22
Peso atómico	47.88
Volumen atómico	10.6 W/D
Configuración electrónica	[Ar] 3d ² 4s ²
Radio covalente	1.32 Å

Primer potencial de ionización	6.83 eV
Valencia	3,4
Punto de fusión	1670 ± 5 °C
Punto de ebullición	3260 °C
Capacidad calorífica	523 J/Kg °C
Conductividad térmica	17 W/m °C
Coeficiente de expansión térmica a (20 °C)	8.41 x 10 ⁻⁶ °C ⁻²
Conductividad eléctrica	0.031 la del Cu
Resistividad eléctrica	0.0026°C
Susceptibilidad magnética (K)	1.25 x 10 ⁻⁵

El titanio es el noveno elemento mas abundante en la corteza de la tierra, con un 0.8% en peso, si bien no es tan frecuente su existencia en concentraciones que hagan económicamente viable su extracción. Está presente en rocas ígneas y en los sedimentos derivados de ellas. En la mayor parte de las reacciones se enlaza con el oxígeno en presencia sobre otros elementos, encontrándose como óxido en los minerales rutilo (TiO₂), ilmenita (FeTiO₃), y esfena (CaO · TiO₂ · SiO₂) [15].

Por otro lado las propiedades mecánicas del titanio dependen de su pureza, considerándose representativos los valores del titanio comercialmente puro.

Tabla 2.2. Propiedades mecánicas del titanio [15].

Propiedad	Valor
Resistencia	240 Mpa
Limite elástico	170 Mpa
Alargamiento	50%
Dureza	70 HR _B ; 85 HV

2.1.2. Cristalografía del dióxido de titanio, TiO₂

El titanio presenta transformación alotrópica, la cual permite que se puede realizar tratamientos térmicos con transformación total. A temperatura ambiente, el titanio puro presenta una estructura cristalina hexagonal compacta, HCP, llamada fase α . Por encima de los 882°C, dicha estructura cristalina sufre una transformación alotrópica, y se convierte en una estructura cúbica centrada en el cuerpo, BCC, llamada fase β .

Tabla 2.3. Características cristalográficas del titanio [15].

Propiedades	Valor
Estructura cristalina	α (HCP) para $T < 882^\circ\text{C}$ β (BCC) para $T > 882^\circ\text{C}$
Parámetros de red cristalina	α : $c = 0.468 \text{ nm}$; $a = 0.295 \text{ nm}$ β : $a = 0.332 \text{ nm}$ a (900°C)
Temperatura de transición $\alpha - \beta$	$882 \pm 2^\circ\text{C}$
Densidad	Fase α (20°C): 4.507 g/cm^3 Fase β (885°C): 4.35 g/cm^3

A su vez, el dióxido de titanio presenta cuatro fases cristalinas: rutilo (estructura tetragonal), anatasa (estructura octaédrica), brookita (estructura ortorrómbica) y una de alta presión tipo $\alpha\text{-PbO}_2$ [16]. Como lo requiere la regla electrostática de valencia, cada átomo de O es compartido por tres (3) octaedros. Para el rutilo y el TiO₂ de alta presión, cada octaedro tiene dos (2) lados comunes con otros octaedros; en la brookita hay tres (3) y en la anatasa cuatro (4) lados compartidos por octaedros [16]. Por lo anterior, el rutilo y la fase de alta presión son las formas más estables del TiO₂. Por ello, muchos compuestos cristalizan en estructura tipo rutilo y algunos en la forma tipo $\alpha\text{-PbO}_2$, mientras que muy

pocos ejemplos se conocen de materiales que presentan estructuras anatasa y brookita [16].

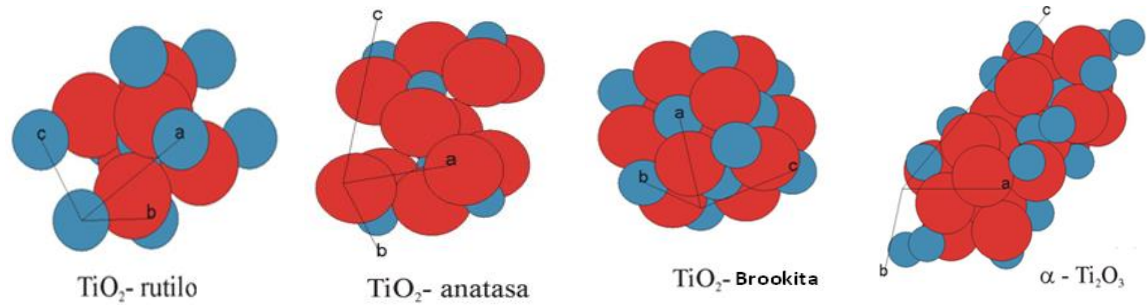


Figura 2.1. Estructuras cristalinas del dióxido de titanio [17].

El rutilo cristaliza en el sistema tetragonal con $a= 4.85\text{Å}$ y $c= 2.953\text{Å}$. El Ti se ubica en las posiciones $(0,0,0)$ y $(1/2,1/2,1/2)$ y el oxígeno en las posiciones $(x,x,0)$, $(-x,-x,0)$, $(x+1/2, 1/2-x, 1/2)$ y $(1/2-x, 1/2+y, 1/2)$ donde $x= 0.302$. La anatasa, que es una fase polimorfa del anterior, cristaliza en el sistema tetragonal en una red I con $a= 3.777\text{Å}$ y $c=9.501 \text{Å}$, donde el Ti ocupa las posiciones $(0,0,0)$, $(0,1/2,3/4)$ y las posiciones equivalentes por ser la red I , mientras que los oxígenos se sitúan en $(0,0,0.204)$, $(0,0,0.796)$, $(1/2,0,0.454)$, $(1/2,0,0.046)$ y las posiciones equivalentes por ser la red I . [18].

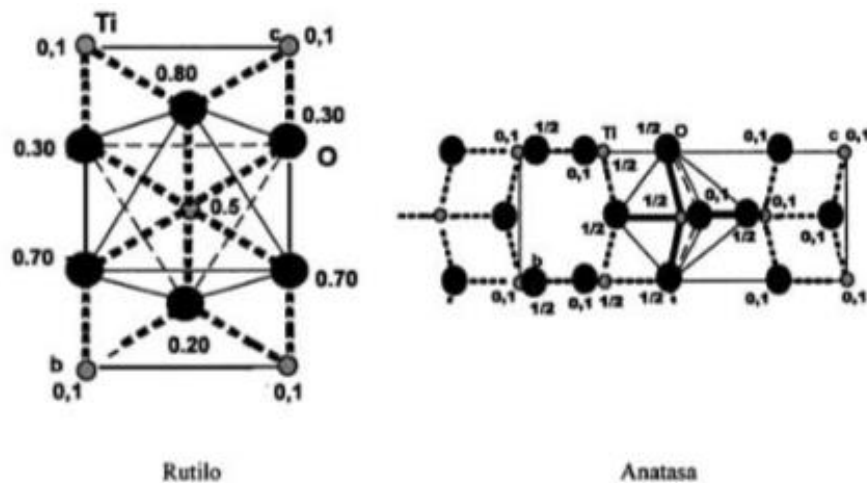


Figura 2.2. Disposiciones de los átomos de Ti y O en las fases anatasa y rutilo del TiO_2 [18].

2.2. Métodos convencionales y no convencionales para la preparación de polvos de dióxido de titanio, TiO₂

Las materias primas para la producción de TiO₂ son la ilmenita, el rutilo, el rutilo sintético, y anatasa natural. La ilmenita posee un 43-61 % de TiO₂ y entre 34 y 49% de óxido de hierro, este material se encuentra en depósitos naturales primarios en Noruega, Rusia, Finlandia, Canadá y EE.UU. El rutilo se extrae de arenas de río, que poseen entre 90 y 98 % de rutilo, junto con Fe, Zr, V, Cr, Al, Si y Mg. El principal productor es Australia. El rutilo sintético se obtiene de la ilmenita, extrayendo el hierro y conservando la forma de la partícula. En Brasil se encontraron los depósitos más ricos del mundo de anatasa natural, con un contenido de TiO₂ entre el 30 y el 40% [19].

Existen dos métodos convencionales para obtener el dióxido de titanio, no necesariamente nanométrico, estos son el proceso sulfato y el proceso cloro [20].

2.2.1. Proceso sulfato

Fue el primer proceso comercial utilizado para la manufactura del dióxido de titanio. El mineral es inicialmente secado, separado y clasificado de modo que se asegure la sulfatación en un baño con ácido sulfúrico concentrado o en una reacción continua exotérmica; se debe tratar de maximizar la conversión del TiO₂ a sulfato de titanilo soluble en agua usando una cantidad mínima de ácido. Luego de precipitar el FeSO₄·7H₂O y filtrar, con el objetivo de retirar las últimas impurezas, el sulfato de titanilo es evaporado e hidrolizado para producir los “clusters” de óxido de titanio, el cual mediante un proceso de precipitación adecuado toma el tamaño de partícula deseado. Estas partículas, después de un adecuado tratamiento térmico adquieren la forma cristalina requerida [20].

2.2.2. Proceso cloro

Este proceso es conocido también como oxidación en llama. En este caso, se parte de un mineral o un precursor sintético con alta concentración de TiO_2 . Se procede a mezclar con carbón y se hace reaccionar en un lecho fluidizado con cloro, a aproximadamente 900°C , hasta obtener TiCl_4 . Luego se realiza un proceso de enfriamiento para retirar algunas impurezas. El resto del vapor es condensado, hasta líquido, y se realiza una destilación fraccionada para producir TiCl_4 puro. Posteriormente se realiza la combustión del TiCl_4 en una llama oxigenada.

El tamaño de las partículas de TiO_2 , depende del tiempo de residencia en la llama; tiempos largos favorece las partículas de mayor diámetro, presumiblemente formadas por la agregación de las partículas; el tamaño de partícula oscila entre los 10 y 100 nm [20].

2.2.3. Método sol-gel

Es un proceso utilizado para la producción, principalmente, de óxidos inorgánicos pero también se pueden obtener nitratos, sulfuros, híbridos orgánicos e inorgánicos [21]. La química del proceso sol-gel está basada en las reacciones de hidrólisis y condensación de especies químicas provenientes de precursores moleculares [21], siendo los alcóxidos los que se utilizan más frecuentemente. Este método es apropiado para obtener vidrios y cerámicos. Los precursores que se utilizan más frecuentemente para conformar las soluciones son las sales inorgánicas o los compuestos metal-orgánico, que contienen el catión de interés. Los precursores más empleados, para la síntesis de los polvos cerámicos utilizando el proceso sol-gel, son los alcóxidos metálicos los cuales son muy reactivos con los agentes nucleofílicos, tal como el agua [21].

Se denomina sol a un líquido viscoso que realmente es una suspensión estable de partículas sólidas coloidales dentro de un líquido. Por otro lado, el gel es una red sólida interconectada tridimensionalmente, porosa, que se extiende de manera estable a través de un medio líquido y su tamaño es limitado por el tamaño del recipiente. Se denomina proceso de gelación a la formación del gel y éste comienza cuando se realiza la dispersión homogénea del precursor, formación del sol, llegando a rigidizarse cuando el sistema experimenta un cambio brusco de líquido altamente viscoso a fase sólida. En esta etapa se presenta un estado intermedio, entre el precipitado y el gel, al que se denomina precipitado gelatinoso [22]. Los solventes que normalmente se emplean son el agua y líquidos orgánicos, principalmente alcoholes. El agua es el solvente más utilizado para transformar el precursor ya que sus propiedades eléctricas, alta constante dieléctrica y momento dipolar permanente, son muy importantes para que ocurra el proceso de transformación del precursor durante el desarrollo del proceso sol –gel.

Con frecuencia en este proceso se utilizan solventes orgánicos, porque ellos permiten la disolución de los precursores y controlan la reacción de estos alcóxidos con agua. Dos parámetros importantes que se consideran, durante el proceso, son la electronegatividad del catión y el pH del sistema; cualquier cambio del pH de la solución desplaza el equilibrio de hidrólisis y por lo tanto ocasiona un cambio de la electronegatividad promedio del medio.

Las principales ventajas que presenta el método Sol-gel, frente a los otros métodos comúnmente empleados son:

- Alta pureza de los productos obtenidos.
- Baja temperatura para realizar el proceso.

- Control adecuado de la nucleación y el crecimiento de las partículas coloidales primarias (morfología, tamaño y distribución de las partículas).
- Reducción de la temperatura de sinterización de los polvos sintetizados.
- Control de la microestructura del cerámico.
- Favorable obtención de nuevos tipos de vidrios.
- Se alcanza homogeneidad química a nivel atómico.

Dentro de las desventajas del proceso Sol-gel se pueden destacar:

- El alto costo de los precursores (alcóxidos).
- No se puede utilizar en producción a gran escala (solo se emplea para obtener cerámicos avanzados).

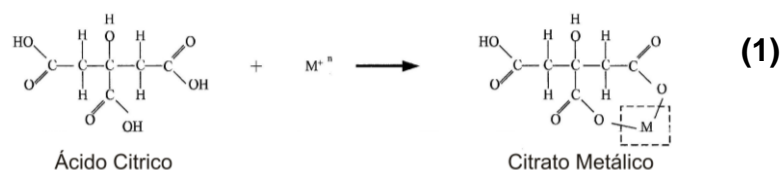
2.2.4. Método precursor polimérico (Pechini)

Este proceso de síntesis usado para producir ferritas, aluminatos, titanatos entre otros, fue patentado el 11 de julio de 1967 por Magio P. Pechini [23]. Los polvos cerámicos obtenidos presentaron alta pureza y tamaño de partícula nanométrico muy importantes para la nanotecnología. El método Pechini se realiza en un medio líquido conformado por un polialcohol y un ácido carboxílico, principalmente ácido cítrico; en esta solución son solubles un amplio rango de sales metálicas [24] y la presencia simultánea de un polialcohol y un ácido carboxílico, facilita el proceso de poliesterificación. Esta técnica está basada en la formación de complejos metálicos a partir de disoluciones concentradas de ácidos orgánicos polifuncionales, sales u óxidos de los cationes requeridos para la formación del óxido mixto [24].

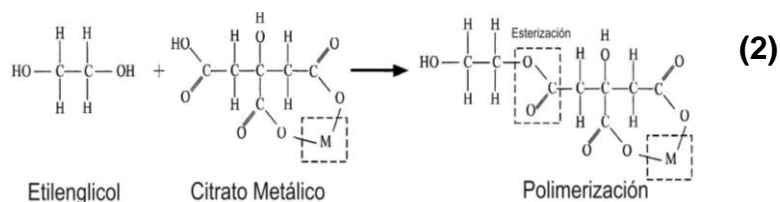
En general, durante el método Pechini se adicionan las sales que contengan los cationes de interés, en nuestro caso titanio, a una solución viscosa de ácido

cítrico y etilenglicol. Esta mezcla, en agitación continua, debe llevar a la conformación de una disolución líquida transparente. Como en el sistema se encuentran presentes cationes es posible que se conformen quelatos polibásicos, ácidos, que posteriormente, por calentamiento, experimenten polimerización dando origen a una resina viscosa [23,24].

Comúnmente, en el proceso Pechini se utiliza una solución de ácido cítrico y etilenglicol de tal manera que la quelación del catión, que se favorece con la acción de la temperatura, se puede esquematizar de la siguiente manera [25]:



Por otro lado, la poliesterificación del citrato metálico con el etilenglicol, que también ocurre por acción de la temperatura, se puede representar así [25]:



En la práctica no se ha determinado si las reacciones (1) y (2) ocurren simultánea o secuencialmente. El calentamiento de la solución se debe realizar continuamente hasta que toda el agua, y el ácido cítrico, se destilen dando como resultado el polímero. Aparentemente, la presencia del grupo hidróxido α del ácido carboxílico, en el ácido cítrico, es muy importante porque permite la reacción del ion metálico con el grupo ácido de manera completa. Si esta reacción no ocurre de manera completa, se produciría la precipitación del ion

metálico, que no reaccionó, ocasionando segregación del metal en el sistema. La descomposición de esta resina, comúnmente amorfa, se realiza calcinándola a temperaturas inferiores a 450°C.

Con este método de síntesis se superan los problemas de segregación o precipitación preferencial en la solución, debido a que los cationes se fijan a la resina permitiendo, por lo tanto, tener un mayor control de la estequiometría del compuesto que se desea sintetizar.

Los sólidos que se obtienen, utilizando estas dos últimas técnicas de síntesis, presentan pequeño tamaño de partícula y alta reactividad, lo que favorece la funcionalidad de los mismos y entre ellas su capacidad catalítica, que es lo que se requiere en el presente trabajo.

2.3. Usos y aplicaciones del dióxido de titanio, TiO₂

El titanio tiene una resistencia a la corrosión excelente, resistencia mecánica específica alta y buenas propiedades a altas temperaturas [1]; resistencia hasta de 200,000 psi, sumadas a una densidad de 4.505gr/cm³, proporcionan excelentes propiedades mecánicas. Una película adherente y protectora de TiO₂ proporciona por debajo de 535 °C excelente resistencia a la corrosión y a la contaminación [1]. Por la alta resistencia a la corrosión, que presenta el titanio, se suele de usar en equipos de procesamiento químico, componentes marinos e implantes biomédicos. Es también un material importante para aplicaciones aeroespaciales, como componentes del bastidor aéreo y del motor del turborreactor [1]. El titanio es un metal biocompatible porque los tejidos del organismo toleran su presencia sin que se presenten reacciones alérgicas del sistema inmunitario. Esta propiedad de biocompatibilidad del titanio, unido a sus cualidades mecánicas de dureza, ligereza y resistencia, han hecho posible una

gran cantidad de aplicaciones, principalmente médicas, como prótesis de cadera y rodilla, tornillos óseos, placas antitrauma e implantes dentales, componentes para la fabricación de válvulas cardíacas y marcapasos, herramienta quirúrgica tales como bisturís, tijeras, etc [15].

El dióxido de titanio es una de las sustancias químicas más blancas que existen, esta refleja prácticamente toda la radiación visible que incide sobre ella y mantiene el color de forma permanente, por ello juega un papel muy importante como pigmento inorgánico en la producción de pinturas y plásticos, así como en papel, tintas de impresión, cosméticos, productos textiles, farmacéuticos y alimentarios, ya que proporciona a los productos finales una brillante blancura, opacidad y protección [17, 26].

Además, el TiO_2 es ampliamente utilizado como recubrimiento anticorrosivo, en sensores de gases, celdas solares (por absorber los rayos ultra violeta) y de manera general en toda la industria cerámica. Otra de las recientes aplicaciones del dióxido de titanio es en los tratamientos contra el cáncer, donde se utiliza la fotocatalisis usando el TiO_2 como catalizador [27].

2.4. Técnicas de oxidación

Estas técnicas se basan en procesos fisicoquímicos capaces de producir cambios profundos en la estructura química de diversas sustancias. Estas técnicas involucran la generación y el uso de especies transitorias, altamente reactivas, principalmente: el radical hidroxilo (OH) o el oxígeno singlete O_2 . El radical OH puede ser generado por medios fotoquímicos, incluida la luz solar u otras formas de energía, y es altamente efectivo en la oxidación de materia orgánica [28].

Entre las técnicas avanzadas de oxidación, más utilizadas, se encuentra la fotocatalisis heterogénea, procedimiento muy frecuentemente utilizado debido a su gran capacidad para degradar materia orgánica y por su bajo costo energético ya que la energía requerida se toma, normalmente de la luz solar para la mayoría de las aplicaciones. La fotocatalisis heterogénea es un proceso que se fundamenta en la absorción directa, o indirecta, de energía radiante (visible o UV) por un sólido que actúa como fotocatalizador, siendo este normalmente un semiconductor de “banda ancha” (amplio “gap” de energía). En la región interfacial, entre sólido excitado y la materia a degradar, ocurren una serie de reacciones de destrucción o de remoción de las sustancias no deseadas, sin que el catalizador sufra cambios químicos [28].

Existen diversos materiales, principalmente semiconductores tipo “n”, con propiedades idóneas para actuar como fotocatalizadores y favorecer así reacciones fotosensibilizadas, entre ellos se destaca el TiO_2 . Este material es económicamente asequible y es el semiconductor que ha alcanzado un mayor grado de desarrollo tecnológico si se consideran los procesos fotocatalíticos. Además, el TiO_2 presenta una elevada estabilidad química que lo hace apto para trabajar en un amplio rango de pH, al mismo tiempo que es capaz de producir transiciones electrónicas por absorción de luz en el ultravioleta cercano (UV-A).

2.4.1. Actividad fotocatalítica del TiO_2

Dos de las fases cristalinas del TiO_2 presentan actividad fotocatalítica, la anatasa y el rutilo. La fase anatasa tiene un “gap” de energía de 3.2eV y el rutilo es de 3.0 eV, siendo la anatasa la que presenta mayor actividad. Durante la acción del proceso fotocatalítico se presentan varias etapas donde se producen especies químicas reactivas que causan, bajo la incidencia de radiación UV, daños importantes a los microorganismos. Las etapas se resumen en la figura 2.3 y

tabla 2.4, donde se destaca la formación de especies como: radicales hidroxilo, peróxido de hidrogeno, superóxidos, debido a los electrones que se ubican en la banda de conducción y a los huecos ubicados en la banda de valencia. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden interrumpir, o romper, la función, o la estructura, de las células o virus que rodean al fotocatalizador. Para una célula o virus, en contacto con la superficie del dióxido de titanio, puede experimentar una directa transferencia de un electrón, o un hueco, a uno de sus componentes, ocasionando la reducción o la oxidación, de las mismas [29].

El mecanismo fotocatalítico se representa en la figura 2.3, en la cual se puede notar, que al iluminar el TiO_2 fase anatasa, con luz de longitud de onda inferior a 385 nm, un electrón de la banda de valencia es promovido hacia la banda de conducción, dejando un "hueco" positivo en la primera. Este hueco reacciona con agua o iones hidróxido, produciendo el radical $\cdot\text{OH}$, que se encarga de oxidar la materia orgánica (R). También puede haber una reacción directa entre el hueco y la materia orgánica; esto sucede únicamente si los sustratos orgánicos pueden adsorberse fácilmente sobre la superficie el semiconductor. Por otro lado, los electrones pueden generar radicales OH al reaccionar con peróxido de hidrógeno, o reaccionar con oxígeno molecular para generar el radical superóxido (O_2^-), que también puede colaborar en la oxidación de materia orgánica o de bacterias [30].

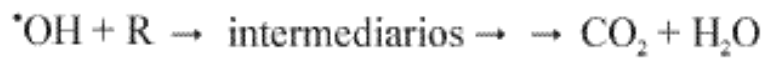
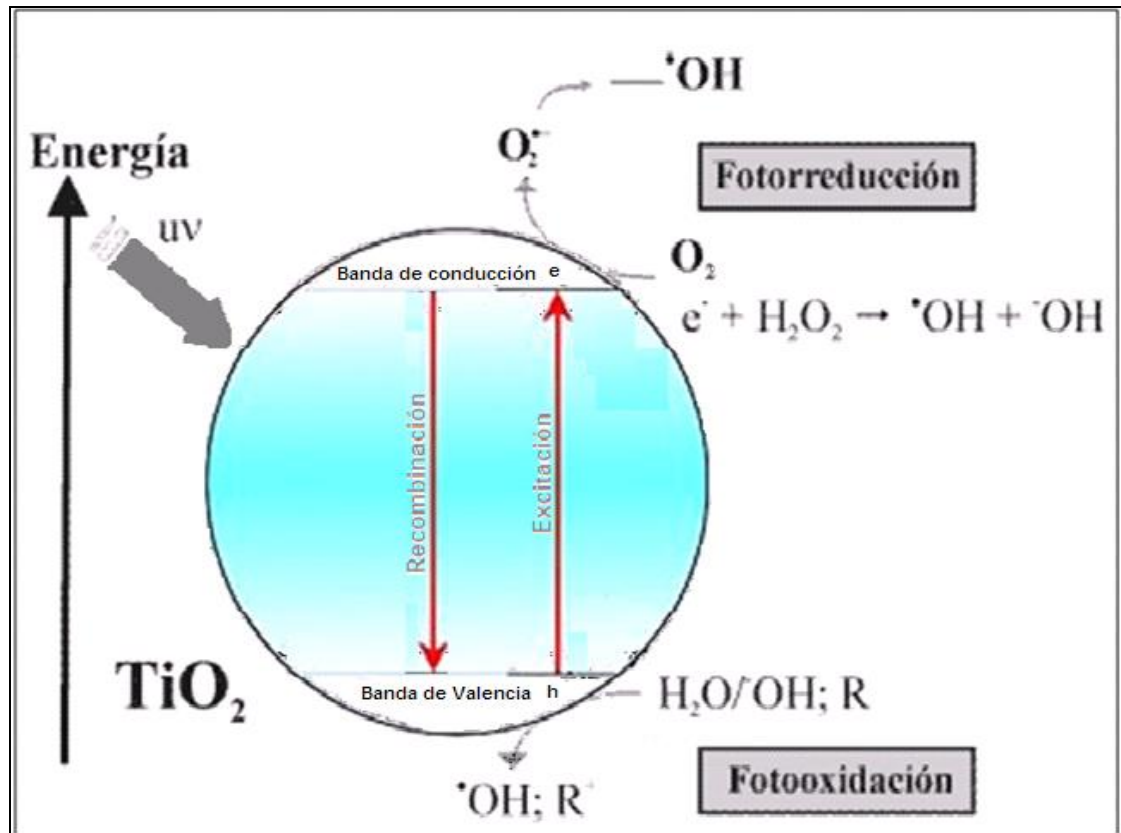
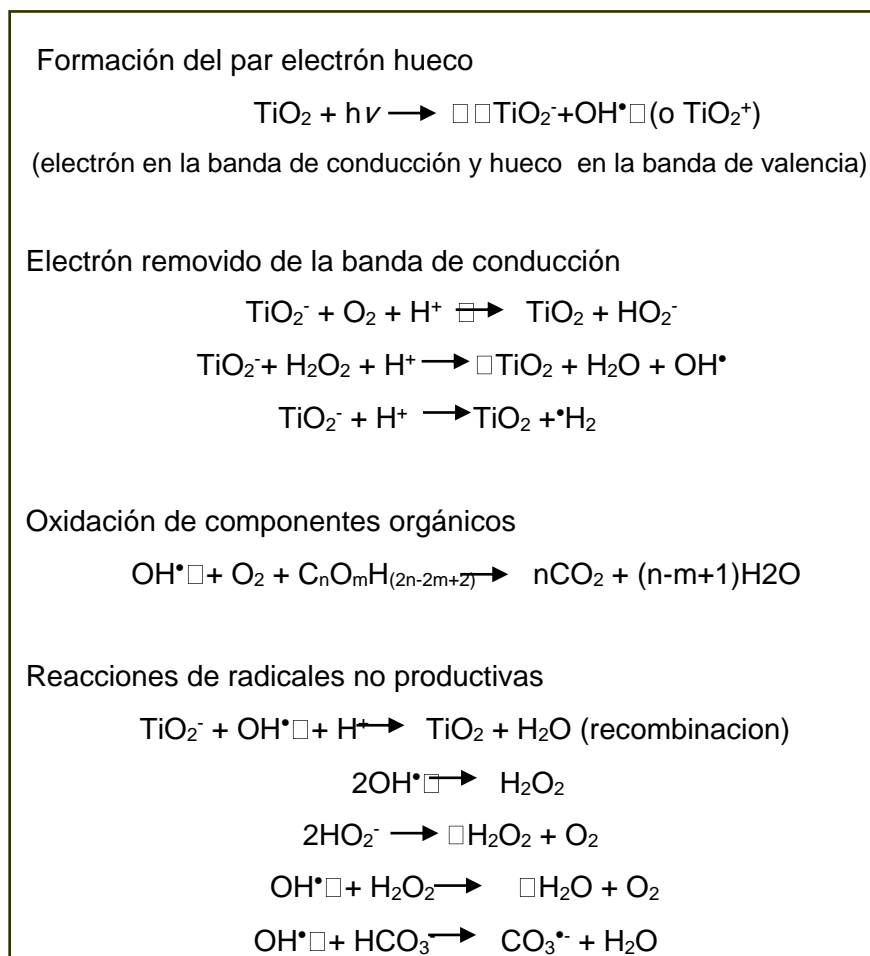


Figura 2.3. Esquema del proceso fotocatalítico sobre una partícula semiconductor de TiO_2 [30].

Considerando la funcionalidad que presenta el TiO_2 como material degradante de moléculas orgánicas, como se indicó anteriormente, se ha planteado su potencial uso en el tratamiento de ciertas perturbaciones y enfermedades que presenta, en algunas ocasiones, el cuerpo humano, concretamente el cáncer.

Tabla 2.4. Mecanismos que ocurren durante el proceso fotocatalítico que presenta el dióxido de titanio irradiado [29].



2.5. Cáncer

El cáncer es un término usado para caracterizar un crecimiento anormal de células que pueden invadir tejidos sanos o normales de órganos distantes, esta acción de invasión es conocida como metástasis [31]. Este crecimiento anormal causa diferentes enfermedades y afecta distintos tipos de tejidos. Hay más de 100 tipos diferentes de cáncer, sin embargo todos tienen en común su lugar de origen, las células. El cáncer se caracteriza por un desorden en el proceso de

división celular, se producen células nuevas en momentos extemporáneos del ciclo celular, por tanto las células viejas no son eliminadas cuando debe ser. La acumulación de masa de células muertas se conoce como tumor, sin embargo para ser clasificado como maligno (canceroso) debe hacer metástasis. El riesgo de desarrollar cáncer es multifactorial, depende de factores genéticos, exposición a sustancias cancerígenas, edad, sexo, raza y alimentación [31].

Las células de cáncer se generan a partir de células normales en un proceso que se conoce como de transformación, este proceso se da en tres pasos: iniciación, promoción y progresión.

En la proliferación de los tumores, la angiogénesis (producción de nuevos vasos sanguíneos) juega un papel muy importante ya que en la medida que crece el tumor se multiplican los vasos y se aumenta la posibilidad de metástasis. Después que la célula tumoral ha producido la metástasis, la proliferación vascular es necesaria para que se instale un tumor [31].

2.5.1 Cáncer de piel

La piel es el órgano más grande que poseemos los seres humanos, nos protege contra el calor, la luz solar, las lesiones y las infecciones . La piel también ayuda al cuerpo a controlar la temperatura y almacena agua, grasa y vitamina D. La piel tiene varias capas, pero las dos capas principales son la epidermis (capa superior o externa) y la dermis (capa inferior o interna). El cáncer de piel comienza en la epidermis, esta se compone de 3 tipos de células :

- Células escamosas: células planas y delgadas, que forman la capa superior de la epidermis.
- Células basales: células redondas en las células escamosas.

- Los melanocitos : Se encuentra en la parte inferior de la epidermis, estas células producen la melanina, el pigmento que da color a la piel natural. Cuando la piel está expuesta al sol, los melanocitos elaboran más pigmento, haciendo que la piel se oscurezca [31].

El cáncer de piel puede ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero es más común en la piel que a sido expuesta a la luz solar por periodos largos de tiempo, como la cara, el cuello, las manos y los brazos. Existen varios tipos de cáncer que comienzan en la piel, siendo los más comunes el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas, que son cánceres de piel no melanoma [31]. Los principales tratamientos para el cáncer de piel son la radioterapia y la cirugía.

2.6. Cultivos celulares

Las líneas celulares utilizadas, fibroblastos sanos de piel humana y células cancerígenas tipo melanoma Hs 688(A) T CRL-7425™ deben ser cultivadas y subcultivadas para asegurar un apropiado crecimiento celular. Para lograrlo, el cultivo celular debe cumplir con diversas características que en cierta medida simulen las condiciones del cuerpo humano. En primera instancia se debe suministrar al cultivo un medio nutritivo (natural o sintético), que entregue a las células las sustancias necesarias para el crecimiento, la adhesión intracelular, entre otras funciones. También se hace necesario mantener el cultivo libre de microorganismos vivos (bacterias y hongos), que puedan transmitir infecciones a las células; por esto se debe agregar al cultivo una dosis adecuada de antibióticos que inhiba el crecimiento de estos cuerpos. Además, se deben controlar otras variables influyentes como la composición de la fase gaseosa y la temperatura del medio. La primera hace referencia a la presencia de humedad y dióxido de carbono en la atmósfera simulada y la segunda, muestra que la temperatura debe mantenerse en un valor aproximado de 37.5°C [32] que es la

temperatura óptima de viabilidad para células de especies mamíferas. Cuando es requerido mantener la línea celular por un periodo prolongado de tiempo, se recomienda recurrir al congelamiento. Para llevar a cabo este procedimiento es necesario adicionar al cultivo celular agentes criopreservantes (dimetil sulfoxido) que impidan la formación de cristales de agua al interior de las células, manteniendo la integridad celular. De esta forma, es posible preservar las células en nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C , durante meses o años.

Posteriormente, cuando el cultivo sea descongelado, las células estarán de nuevo en condiciones aptas para continuar con su crecimiento. Los procedimientos de congelación, descongelación y mantenimiento de las líneas celulares se muestran en el ANEXO I.

Normalmente después de ser agregado el medio nutritivo, las células son transferidas a una superficie de vidrio o plástico, en el que forman un cultivo en suspensión. Sobre esta superficie las células crecen adecuadamente y forman una agrupación denominada monocapa.

2.7. Métodos de medición

El proceso de crecimiento celular en cultivos in Vitro se puede ver interrumpido debido a diferentes factores que inhiben los procesos de división celular y por tanto impiden la aparición y crecimiento de nuevas células. La aplicación de radiación ultravioleta y dióxido de titanio sobre el las células actúan como agentes perturbadores de las condiciones de cultivo, por eso se hace necesario utilizar técnicas de medición que permitan medir el efecto inhibitorio del ataque fotocatalítico. Los procedimientos de los métodos de medición se muestran en el ANEXO II.

2.7.1. Viabilidad celular

La viabilidad celular hace referencia a la cantidad de células que están vivas o muertas en un cultivo en suspensión. Para la medición de esta variable, son utilizados diversos métodos de conteo celular entre los que se encuentran las tinciones complementadas con las cámaras de conteo celular. Las tinciones consisten en la inyección de sustancias colorantes al cultivo, las cuales pueden ser captadas en forma selectiva por determinadas células vivas, como consecuencia, la localización del colorante se puede utilizar para detectar estas células o determinadas organelas, a las que se une el colorante después de ser captado [32]. Posterior a la captación del colorante, los cultivos se llevan a una cámara de conteo celular en donde con patrones conocidos de volumen se puede realizar el conteo e incluso determinar la densidad de células en suspensión. Estos dispositivos son placas de vidrio (figura 2.4) divididas en cuatro cuadrantes compuestos de pequeñas celdas que facilitan el conteo manual de las células en los cultivos.



Figura 2.4. Cámara de conteo celular de Neubauer.

Una de las sustancias de tinción que se puede utilizar es el azul de tripám. Este es un coloide que puede penetrar la membrana celular y de esta forma indicar la viabilidad celular en el cultivo. Las células que permanecen viables (vivas) se caracterizan por no poseer ningún tipo de coloración, mientras que las células no viables (muertas) se caracterizan por una coloración azul debida a la alta

permeabilidad de la membrana.

2.7.2 Citotoxicidad

La citotoxicidad es una medida cualitativa para determinar que tan tóxico es un agente determinado (sustancia o radiación), sobre las células de un cultivo celular, tejido, órgano o cualquier cuerpo. La forma más común de expresar el grado de toxicidad de un agente es la dosis letal 50 (LD50) que hace referencia a la dosis necesaria de sustancia o radiación que produce muerte al 50% de la población celular [33].

La determinación de la actividad citotóxica de algún agente sobre un cultivo celular, se hace con el *kit* LDH[®] Roche. Esta es una alternativa no radiactiva de análisis colorimétrico para determinar y cuantificar la muerte celular, basada en la medida de la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada por el citoesqueleto de las células dañadas al sobrenadante del medio de cultivo [34].

Este *kit* contiene dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD) y L-lactato que en una reacción de deshidrogenación producen piruvato y NAD deshidrogenada (NADH). En el primer paso de la reacción el NAD⁺ es reducido a NADH/ H⁺ por la conversión LDH-catalizada y convertida de lactato a piruvato. Luego, el catalizador transfiere H/H⁺ de NADH/H⁺ a las sales del tetrazolium INT que se reduce a formazan [34]. El orden de las reacciones se esquematiza en la figura 2.5.

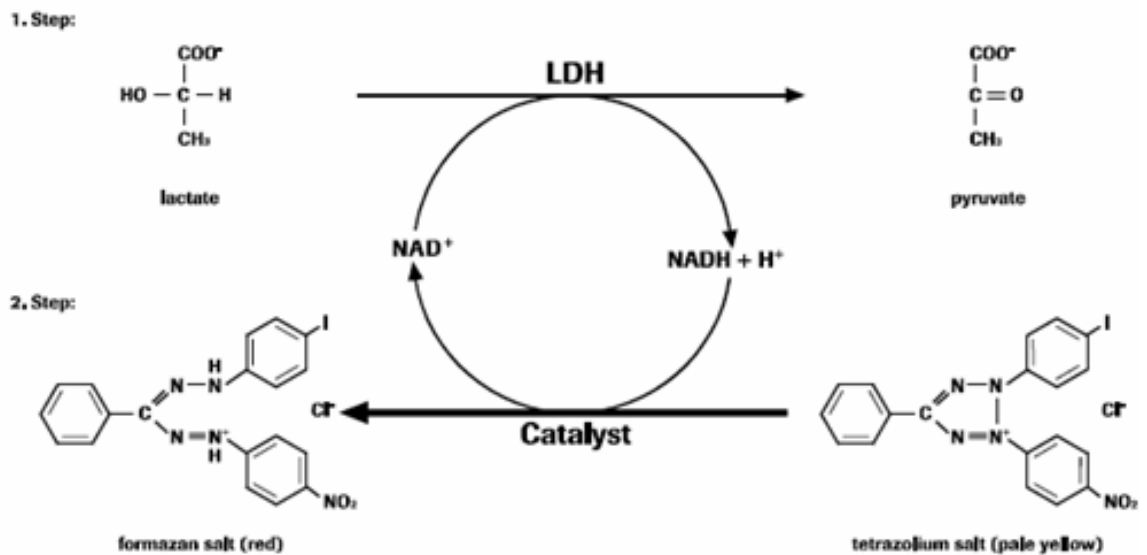


Figura 2.5. Reacciones del Kit LDH ® ROCHE [34].

2.7.3. Proliferación celular

La proliferación celular hace referencia al incremento del número de células por división celular, es más activa durante el desarrollo de los organismos y es fundamental para la regeneración de tejidos deteriorados o antiguos [35]. La proliferación es característica de cada tipo celular, por lo que está controlada de forma muy específica. Para determinar la proliferación celular se usa el *Kit* XTT ® ROCHE. Es una técnica colorimétrica basada en el cambio de las sales del tetrazolium del XTT a formazan lo cual produce un color naranja debido a la actividad metabólica de las células. Esta conversión ocurre solamente en células viables. El formazan producido es soluble en soluciones acuosas y su concentración se cuantifica directamente usando un espectrofotómetro multiplicas (lector de ELISA), figura 2.6, que muestra resultados de densidad óptica [35]. El esquema de la figura 2.7, muestra la reacción que se lleva a cabo debido a la actividad de las células.



Figura 2.6. Espectrofotómetro multiplicas - Medidor de placas ELISA.

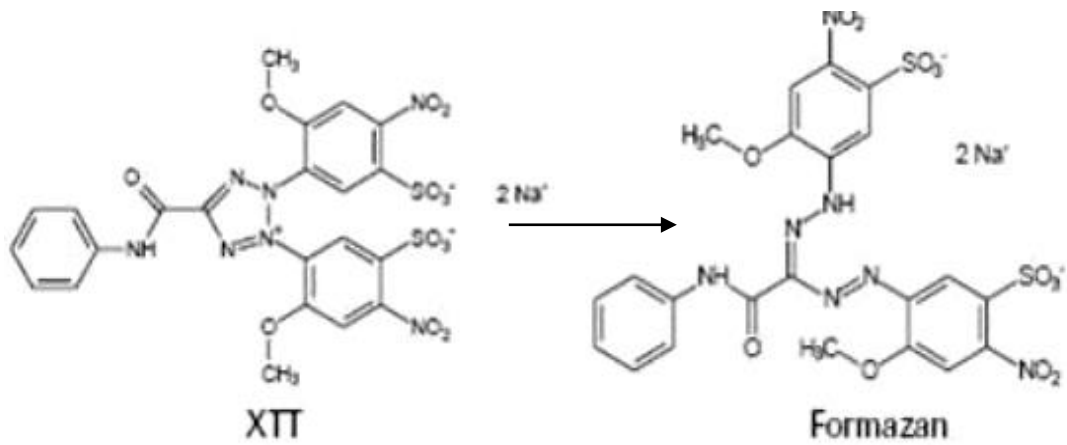


Figura 2.7. Producción del Formazan, a partir de las sales del tetrazolium del XTT. Kit XTT® ROCHE [35].

CAPÍTULO 3

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

Para la obtención de polvos cerámicos de dióxido de titanio, fueron utilizados dos métodos de síntesis: sol gel y precursor polimérico Pechini. Los reactivos usados en cada uno de estos métodos, su pureza y sus marcas son listados en las tablas 3.1 y 3.2 respectivamente.

Tabla 3.1. Reactivos utilizados para la síntesis de polvos cerámicos de TiO_2 , utilizando el método sol gel.

REACTIVO	MARCA	PUREZA
Tetrabutóxido de titanio	Aldrich	99%.
Acetilacetona (AcacH).	J.T:Baker	98%
Etanol absoluto anhidrido	Mallinckrodt	99.5%
Hidróxido de Amonio HN_4OH	Merck	99%
Agua destilada		

Tabla 3.2. Reactivos utilizados para la síntesis de polvos cerámicos de TiO_2 , utilizando el método Pechini.

REACTIVO	MARCA	PUREZA
Etilenglicol $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$	Mallinckrodt	99.8%.
Acido Cítrico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	Merck	99.5%
Tetrabutóxido de titanio	Aldrich	99%.
Hidróxido de Amonio HN_4OH	Merck	99%

3.2. Métodos de síntesis

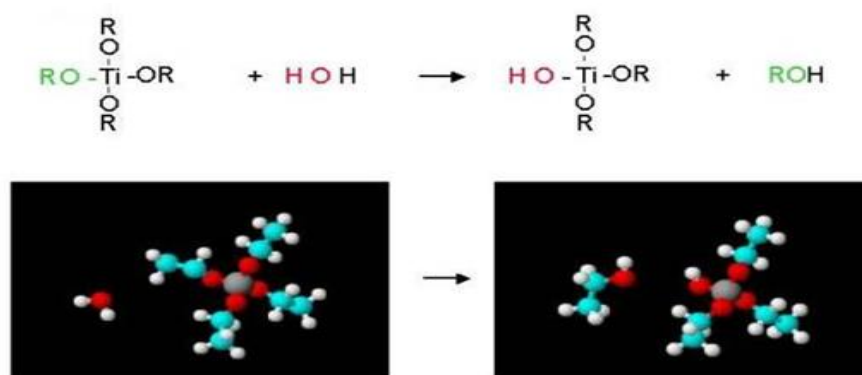
Para cumplir los objetivos de este trabajo es importante obtener un polvo

cerámico de TiO₂ con partículas nanométricas y baja aglomeración. Para cumplir con estos requisitos, se debe tener un buen control sobre los parámetros mas importantes que intervienen en el desarrollo del proceso de síntesis, tales como naturaleza y concentración de los precursores, naturaleza del solvente y pH del sistema, además de la temperatura y el tiempo de duración de los tratamientos térmicos.

Como ya se indicó, los dos métodos utilizados fueron el método sol gel y el método de precursor polimérico (Pechini) que se describen a continuación.

3.2.1. Método sol gel

La obtención de los soles de TiO₂, por el método sol gel, se realizo a través de las reacciones de hidrólisis y policondensación del tetrabutóxido de titanio (TBT), Ti(OBu)₄ (figura 3.1), utilizando o no, como acomplejante la acetilacetona- AcacH para controlar las reacciones de hidrólisis del TBT [36]. Además, se adiciona hidróxido de amonio para obtener una condición básica en la solución, con el fin de favorecer la formación de partículas nanométricas frente a la formación de un gel [36].



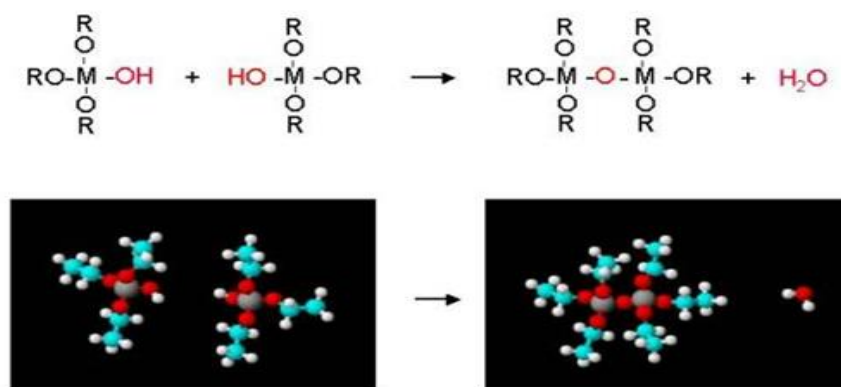


Figura 3.1. Reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren durante el proceso sol-gel [37].

Se empleó como solvente alcohol etílico, para disolver el TBT, teniendo la precaución de que no se hidrolizara el precursor de titanio al entrar en contacto con el medio ambiente. La solución se agitó durante 20 minutos y finalmente se adicionó el agua destilada, manteniendo la agitación durante otros 20 minutos.

Un interés de este trabajo fue determinar el efecto acomplejante del AcacH y para ello se analizaron sistemas con diferentes relaciones TBT: AcacH, 2:1 y 3:1, que permitió determinar el efecto de la presencia de este reactivo sobre las características fisicoquímicas del polvo cerámico final. En la Tabla 3.3 se indican las relaciones y cantidades de los reactivos utilizados en este trabajo para conformar los soles estables de titanio. La concentración de los precursores fue el principal parámetro a analizar, así como la razón de concentración titanio - acetilacetona [Ti/AcacH].

Tabla 3.3. Concentraciones molares, en una solución de 50 ml de los diferentes reactivos utilizados en la formación de los soles del sistema de titanio.

Rc=Ti/AcacH	TBT	AcacH – Hidróxido de Amonio	Agua	Etanol
Sin AcacH	10.98 ml	0	0.85 mL	38.17 mL
2:1	10.98ml	1.62 mL	0.85 mL	36.55 mL
3:1	10.98ml	1.08 mL	0.85 mL	37.09 mL

En la figura 3.2 se muestran las suspensiones coloidales del sistema de titanio que se obtuvieron; sin AcacH (figura 3.2(a)), relación Ti:AcacH=2:1(figura 3.2(b)) y relación Ti:AcacH=3:1(figura 3.2(c)). Muestras de estos soles, para los diferentes sistemas de interés, se caracterizaron utilizando espectroscopia IR con el fin de determinar como evolucionan los grupos funcionales presentes en ellas.

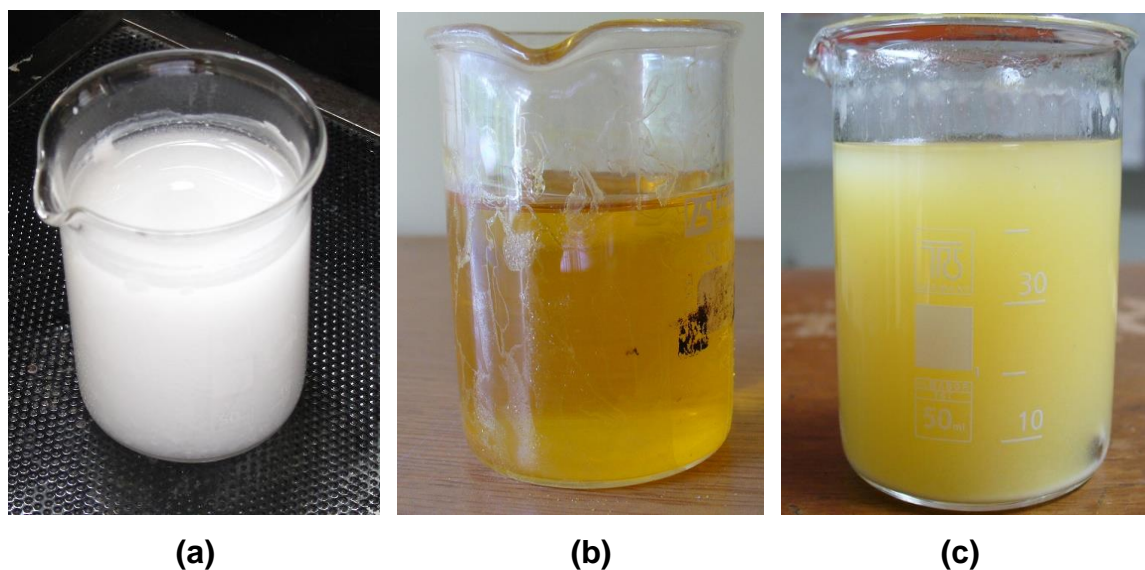


Figura 3.2. Textura de las suspensiones coloidales obtenidas durante el desarrollo del proceso sol-gel: sin acomplejante (a) relación Ti:AcacH=2:1 (b) y relación Ti:AcacH=3:1.

Para determinar el efecto del tratamiento térmico sobre la estructura y las propiedades del TiO_2 obtenido, los soles fueron sometidos a un programa de secado a 80°C , durante aproximadamente 3 días, hasta obtener los polvos cerámicos. A las muestras secas se les realizó un tratamiento térmico, cuyo programa de calentamiento involucró una velocidad de calentamiento de $3^\circ\text{C}/\text{min}$, desde temperatura ambiente hasta 150°C . El sistema se mantuvo en esta temperatura por 2 horas con el fin de evaporar el agua fisisorbida y gran parte del solvente; posteriormente, se incrementó la temperatura, a $3^\circ\text{C}/\text{min}$, hasta una temperatura final previamente determinada (450 ; 500 o 700°C), donde

el sólido permaneció por 2 horas. Luego se disminuyó la temperatura, hasta temperatura ambiente, a la misma velocidad (3 °C/min).

Las muestras sólidas obtenidas, al final del tratamiento térmico, se caracterizaron utilizando difracción de rayos X (DRX) con el fin de identificar las fases cristalinas presentes en ellas.

En la figura 3.3, se resumen las diferentes etapas que se cumplieron, durante el desarrollo del método sol-gel, para sintetizar los polvos de TiO₂ utilizados en este trabajo de grado.

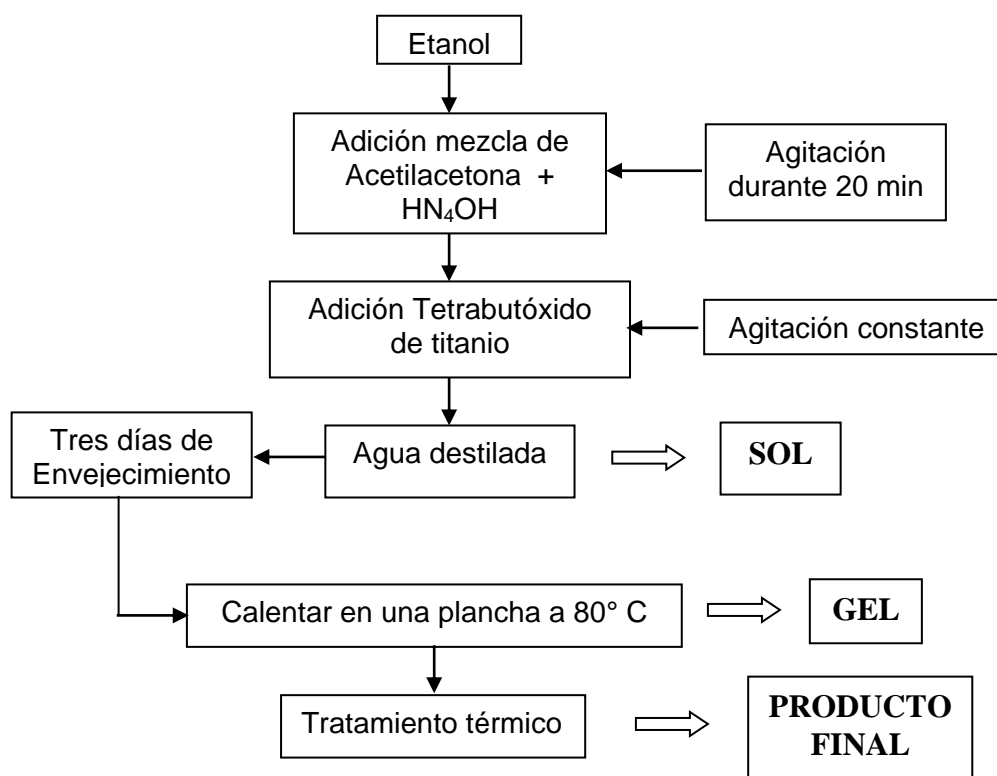


Figura 3.3. Esquema de las etapas del proceso sol-gel utilizado para sintetizar polvos de TiO₂.

3.2.2. Método de precursor polimérico (Pechini)

Otro método que se utilizó para obtener el polvo de TiO_2 fue el proceso de precursor polimérico (Pechini). Para ello se calentó el etilenglicol en una plancha calefactora, a 70°C , y se le adicionó una cantidad adecuada de ácido cítrico para garantizar una relación molar 1:4 (etilenglicol: ácido cítrico). Cuando el ácido cítrico se disolvió completamente en el etilenglicol, la mezcla se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. En esta última condición, se adicionó el precursor de titanio, (tetrabutóxido de titanio). Las cantidades de los reactivos que se utilizaron en el proceso Pechini se indican en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Cálculos estequiométricos de los diferentes reactivos utilizados en el método Pechini para sintetizar TiO_2 .

Etilenglicol	Acido cítrico	TBT	NH_4OH
20.9 g	17.5 g	21.51g	Hasta obtener pH 7

Se controló y garantizó que la solución obtenida del proceso anterior fuera totalmente transparente, condición que indica una mezcla uniforme, homogénea y una adecuada distribución del catión de interés en la solución polimérica, sin ningún problema de segregación de fases. La mezcla se sometió a la acción de un equipo de alta cizalla para eliminar la presencia de los pequeños precipitados que se hayan podido formar durante el proceso. Posteriormente, a la mezcla obtenida, se le adicionó hidróxido de amonio, (NH_4OH), a una baja velocidad para llevar el sistema a un pH básico, garantizando que la solución siga siendo transparente, es decir que no se forme precipitado en el seno de la solución.

La adición del NH_4OH se realizó utilizando un dosificador marca metrohm, modelo 775, y el valor del pH de la solución fue medido con un pH-metro, marca metrohm modelo 775. El aumento del pH permitió disolver las pequeñas

partículas que se generaron por la hidrólisis del tetrabutóxido de titanio, favoreciendo la disminución del tamaño de las partículas.

Posteriormente, la solución transparente se calentó en una plancha calefactora, a una temperatura de 100°C, para eliminar el solvente y favorecer las reacciones de poliesterificación, y por lo tanto la conformación de la resina. Finalmente, esta resina se calcinó en una estufa a una temperatura de 250°C, durante 24 horas, para obtener un precursor sólido intermedio “blando”, con alto contenido de material orgánico y de allí su color negro, que se macero utilizando un mortero de ágata. Esta muestra sólida se denomina comúnmente, “pre-calcinado”.



Figura 3.4. Etapa de conformación de la resina durante el desarrollo del proceso Pechini, utilizado para sintetizar el TiO_2 utilizado en este trabajo.

Luego el material se sometió a un tratamiento térmico, a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, llevando el sistema de temperatura ambiente a 200 °C, manteniendo a esta temperatura, por 2 horas, con el fin de evaporar el agua fisisorbida y gran parte del solvente. Posteriormente, se incrementó la temperatura, a 3 °C/min, hasta alcanzar la temperatura final previamente

determinada, (450, 500, 600 o 700°C), donde se mantuvo el sólido durante 3 horas.

Los sólidos obtenidos, al finalizar los diferentes tratamientos térmicos a diferentes temperaturas y tiempos de duración, se caracterizarán utilizando difracción de rayos X (DRX).

En la figura 3.5, se muestra un esquema resumen del método Pechini utilizado para sintetizar los polvos de TiO_2 utilizados en este trabajo.

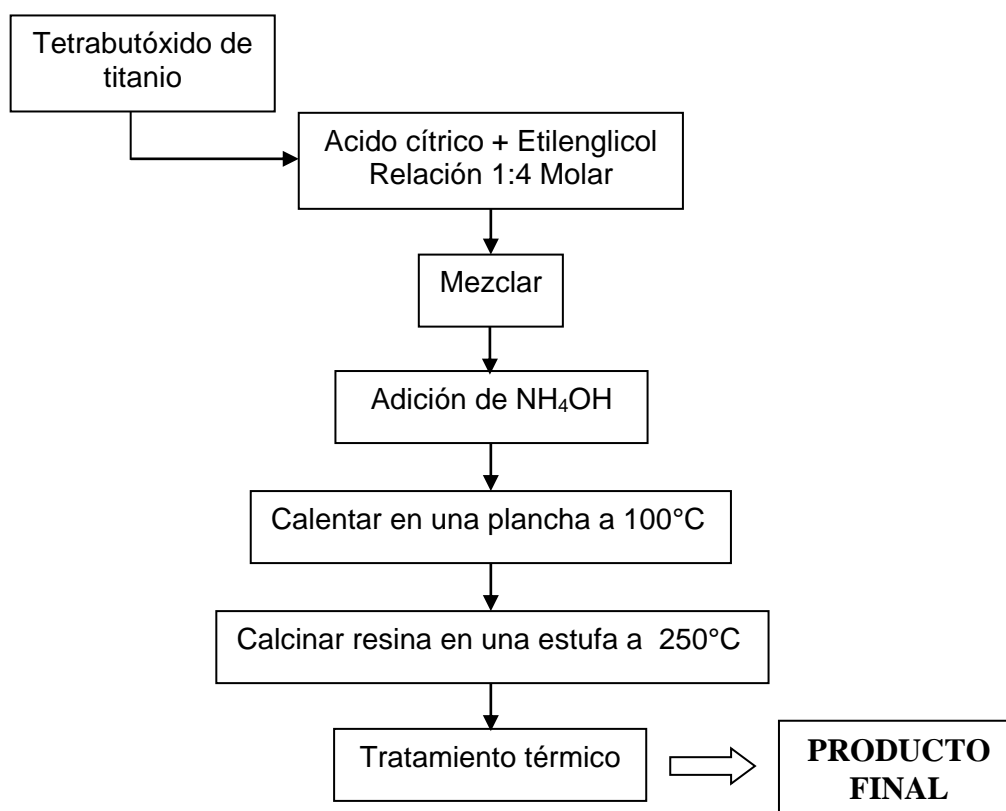


Figura 3.5. Esquema del método de precursor polimérico Pechini utilizado en este trabajo para sintetizar el TiO_2 requerido.

3.3. Técnicas de caracterización

Los polvos cerámicos obtenidos se caracterizaron utilizando diferentes técnicas, principalmente: espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), técnica que se utilizó para determinar cualitativamente los grupos funcionales presentes en los polvos cerámicos de interés; difracción de Rayos X (DRX) que permitió determinar las fases cristalinas presentes en los polvos cerámicos obtenidos y la evolución de las mismas al someter el sólido a diferentes tratamientos térmicos, considerando los resultados previos obtenidos del análisis térmico de ATD/TG. Además se determinó el tamaño, morfología y la homogeneidad de las partículas, constituyentes de los polvos cerámicos, utilizando Microscopia electrónica de Barrido (MEB) y Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).

3.3.1. Espectroscopia Infrarroja con transformada de Fourier FT-IR

La espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier tiene una gran aplicación en el análisis semicuantitativo y cualitativo. El espectro infrarrojo se divide en tres regiones: infrarrojo cercano, medio y lejano, que cubre el intervalo de radiación electromagnética de 0.78 μm a 1000 μm . La mayoría de las aplicaciones en química orgánica se han centrado en la región media del infrarrojo, comprendida entre 2.5 μm hasta 25 μm . Las longitudes de onda λ , en la región infrarroja, se expresan en micras (μm), o en lugar de la frecuencia se utiliza el número de onda ν (cm^{-1}) [38].

La identificación de un compuesto, a partir de un espectro infrarrojo, consta de dos etapas. La primera etapa implica la determinación de los grupos funcionales presentes en la región de frecuencias de grupo, que abarca el intervalo entre 3600 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} . La segunda etapa consiste en una comparación detallada del espectro del compuesto desconocido con los espectros de compuestos puros

que contienen todos los grupos funcionales encontrados en la primera etapa. En este caso es muy importante la región de la huella dactilar, comprendida entre 1200 cm^{-1} y 400 cm^{-1} , debido a que pequeñas diferencias en la estructura y/o en la constitución de una molécula provocan cambios significativos en el aspecto y distribución de las bandas en esta región [39].

Para el análisis cualitativo y semicuantitativo frecuentemente se utiliza la deconvolución de las bandas obtenidas experimentalmente. Esta consiste en “descomponer” las bandas anchas del espectro IR obtenido con el fin de determinar las bandas “fundamentales” que la componen, permitiendo conocer el valor de todas las posibles vibraciones. Este análisis se realiza tomando el espectro infrarrojo en modo absorbancia y seleccionando una región específica para su estudio. De las posibles funciones matemáticas, simétricas o asimétricas (Gaussiana, tipo voigt, pseudovoigt, etc), se toma una de ellas para que, considerando “la superposición” de varias de ellas, permita la reconstrucción del espectro original. Luego, la diferencia entre el espectro experimental y el obtenido “teóricamente” determina la confiabilidad de la deconvolución y por lo tanto las bandas que componen el espectro. La deconvolución se realizó en la región 400 a 1150 cm^{-1} , del espectro IR, mediante funciones de Pseudovoigt (asimétrica).

Los espectros de infrarrojo, presentados en este trabajo, se obtuvieron utilizando el espectrofotómetro Termo Electrón Nicolet IR200 FT-IR (figura 3.6). Las muestras se prepararon mezclando los sólidos en polvo, obtenidos en el trabajo, con KBr, (Fischer 99.9%), en una relación 1:99 de muestra:KBr para formar la pastilla.



Figura 3.6. Espectrómetro de Infrarrojo (FTIR), marca Thermo Nicolet IR200, utilizado en este trabajo.

3.3.2. Análisis térmico diferencial ATD y termogravimétrico TG

Para determinar el comportamiento térmico de los polvos cerámicos sintetizados se utilizó el análisis térmico. Esta técnica comprende un análisis cualitativo y cuantitativo de las temperaturas a las cuales se presentan fenómenos fisicoquímicos importantes en el sistema. Los resultados de los análisis térmicos se registran en curvas donde la temperatura es la variable independiente y la energía liberada o absorbida y la ganancia o pérdida de peso están en función de ella, tal como se muestra en la figura 3.7.

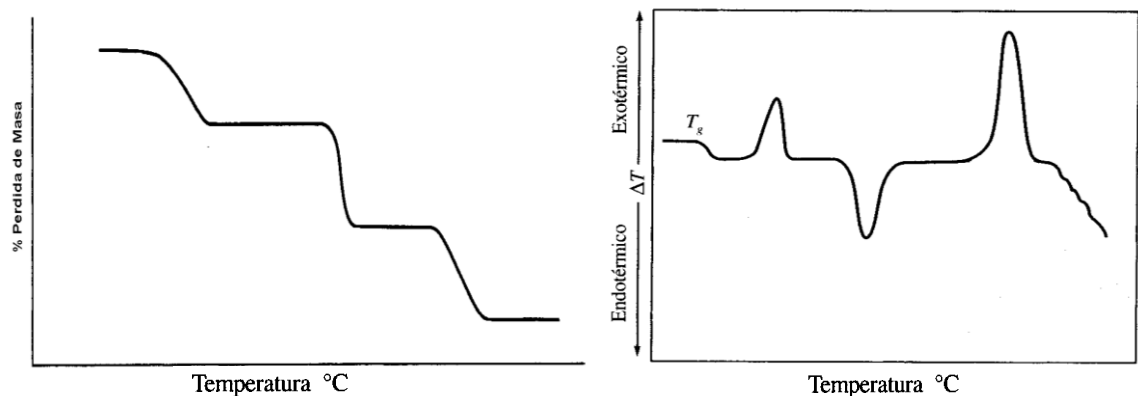


Figura 3.7. Curvas típicas de un análisis (a) termogravimétrico y (b) térmico diferencial.

La información que proporcionan los métodos termogravimétricos es más limitada que la que se obtiene del método térmico diferencial, ya que en el primero una variación de temperatura tiene que causar un cambio en la masa del analito. Por tanto, los métodos termogravimétricos están limitados en su mayor parte a las reacciones de descomposición, y de oxidación, y a procesos tales como evaporación, sublimación y desorción [39].

Por otro lado, en el análisis térmico diferencial se mide la diferencia de temperatura entre la sustancia a analizar y un material de referencia, en función de la temperatura, cuando la sustancia y el patrón se someten a un programa de calentamiento y/o enfriamiento a temperatura controlada. En este análisis se determinan las temperaturas donde ocurren reacciones químicas exotérmicas o endotérmicas. Entre los procesos físicos endotérmicos se destacan la fusión, la evaporación, la sublimación, la absorción y la desorción; la adsorción y la cristalización son exotérmicas [39].

Con la información obtenida, a partir del análisis térmico, se eligió el tratamiento térmico más adecuado al que se debía someter las muestras para obtener el TiO_2 . Para realizar el análisis termogravimétrico (TG) y el análisis térmico diferencial (ATD), a las muestras sintetizadas en este trabajo, se utilizó el equipo DSC Q100 de TA instruments (Universidad de Antioquia).

3.3.3. Difracción de Rayos X

La difracción de rayos X es una técnica muy importante para la caracterización de materiales, de la cual se obtiene información de la estructura atómica de los materiales. Esta técnica proporciona un medio adecuado y práctico para la identificación cualitativa y cuantitativa de las fases cristalinas en un sólido. En este trabajo fue muy importante la aplicación de la difracción de rayos X para obtener información sobre las fases presentes en los materiales obtenidos [39].

El método de rayos X, de polvo cristalino, se basa en el hecho de que cada sustancia cristalina presenta un diagrama de difracción único. Así, si se encuentra una igualdad exacta entre el diagrama de una muestra desconocida y el de una muestra patrón, se puede dar por verificada su identidad química.

Cuando el material se prepara en forma de polvo fino, siempre habrán partículas de polvo cuyos planos (hkl) queden orientados, con un ángulo θ adecuado, para satisfacer la ley de Bragg. Por lo tanto, se producirá un haz difractado, a un ángulo de 2θ con relación al haz incidente, generando un patrón característico de difracción [39].

Para identificar las fases cristalinas presentes en los polvos cerámicos obtenidos, y determinar la evolución de las mismas al someter el sólido a diferentes tratamientos térmicos, se utilizó un difractómetro Philips PW1710 (figura 3.8) y la radiación K_{α} del Cu ($\lambda = 1.54\text{\AA}$), en el intervalo 2θ entre 10° y 70° y a una velocidad de barrido de $0.04^{\circ}\text{s}^{-1}$.



Figura 3.8. Difractómetro de rayos X (DRX), marca Philips PW1710, utilizado en este trabajo.

3.3.4. Microscopia Electrónica de Transmisión

Una de las técnicas experimentales más utilizadas para el estudio de la morfología y tamaño de las partículas es la microscopia electrónica, concretamente la de transmisión. Esta técnica se basa en hacer incidir un haz de electrones, que atraviesa el material, para obtener una imagen detallada de este. Las imágenes permiten observar detalles de la microestructura interna de los materiales; los contrastes de imagen se consiguen por diferencias del haz difractado o dispersado por varios elementos de la microestructura o defecto [40]. En MET se utilizan electrones de alta energía, 100kV o superior, los cuales son transmitidos a través de la muestra y luego dispersados y amplificados para obtener imágenes, con aumentos muy elevados, de una resolución del orden de la longitud de onda de los electrones [40].

Para realizar este análisis se necesita poca cantidad de muestra, la cual se disuelve en un agente dispersante, generalmente alcohol isopropílico, y se somete a agitación para obtener una dispersión homogénea de las partículas; luego se deposita sobre un porta-muestras que contiene una capa de doble adhesión de grafito. Con el microscopio electrónico de transmisión, se logra, aproximadamente, 1'000.000 de aumentos como consecuencia de la corta longitud de onda del haz de electrones [40].

Para las fotografías obtenidas con MET, en este trabajo, las muestras fueron analizadas con un microscopio electrónico de transmisión, JEOL- JEM 1200 EX con un filamento de tungsteno, como fuente de electrones, operando a 120kV (figura 3.9). Las muestras se montaron sobre una rejilla de cobre que contenía una membrana muy delgada. Para manipular la muestra. Se colocó un poco del sólido en etanol, mezclando muy bien, para romper los posibles aglomerados y poder obtener imágenes de las partículas primarias. Luego se colocó una

pequeña gota de la suspensión, sobre la rejilla, y se dejó secar a temperatura ambiente; la rejilla con la muestra se colocó en el portamuestra del equipo.



Figura 3.9. Microscopio electrónico de transmisión (MET), marca JEOL JEM-1200 (Unidad de Microscopia Electrónica – Unicauca), utilizado en este trabajo.

3.3.5. Microscopia Electrónica de Barrido

Para obtener una imagen utilizando microscopia electrónica de barrido, MEB, la superficie de la muestra sólida es barrida mediante un rastreo programado con un haz de electrones, muy fino y de energía elevada, focalizando el haz con una sonda adecuada. El haz de electrones barre la superficie en línea recta, volviendo a la posición inicial y desplazándose hacia abajo un incremento establecido. Este proceso se repite hasta que el área deseada haya sido barrida totalmente. Durante este proceso de barrido se recibe una señal por encima de

la superficie y se almacena en un sistema de cómputo donde luego se convierte en imagen [39].

Al barrer la superficie, independientemente de que esté o no pulida, se producen diversos tipos de señales, entre estas se encuentran los electrones retrodispersados secundarios y Auger; fotones debido a la fluorescencia de rayos X y otros fotones de diversas energías [39].

Las muestras metálicas son más fáciles de analizar, sin embargo se han desarrollado técnicas que permiten obtener imágenes MEB de muestras que no son conductoras, como es el caso de los polvos cerámicos; estos materiales se cubren con una película que suele ser de oro o de grafito. La microscopia electrónica de barrido proporciona información morfológica y topográfica de la superficie de los sólidos a estudiar, además permite obtener información sobre sus propiedades microestructurales.

Las imágenes de microscopia electrónica de barrido de las muestras sintetizadas en este trabajo, se obtuvieron mediante un microscopio PHILIPS XL-30 SCANNING ELECTRON MICROSCOPE.

CAPÍTULO 4

SÍNTESIS DE TiO₂ POR EL MÉTODO SOL-GEL

Utilizando este método de síntesis, para obtener el TiO_2 requerido, se puso especial atención a las reacciones de hidrólisis y condensación que ocurren durante el proceso, tomando como variable importante el efecto del acomplejante, AcacH, incorporado al sistema. Para ello se analizaron diferentes relaciones TBT: AcacH, lo que permitió determinar el efecto de la presencia de este reactivo sobre las características fisicoquímicas del polvo cerámico obtenido.

4.1. Estudio de la formación de los soles

Para estudiar el proceso de conformación del sol, se tomó el espectro IR a cada una de las muestras tomadas de los distintos sistemas a analizar, a diferentes tiempos. Las muestras fueron recolectadas a tiempos cortos de reacción, cada 15 minutos, y a tiempos largos, cada 24 horas, durante los tres días de envejecimiento, lo que permitió estudiar la evolución del sistema en diferentes instantes del proceso.

Conformados los soles, utilizando la metodología descrita en el numeral 3.2.1, se encontró que, dependiendo de la relación molar [Ti:AcacH], el sistema presentaba diferentes coloraciones: un amarillo oscuro para el sistema 2:1 (alta concentración de AcacH), una suave tonalidad amarilla para el sistema 3:1 y un color blanco para la suspensión del sistema sin AcacH.

Después de tomar los espectros IR, a las muestras recolectadas, las bandas presentes en ellos se analizaron utilizando el software FITYK 0.8.6 (Marcin Wojdyr), realizando la deconvolución de las mismas utilizando curvas no simétricas, concretamente la función PseudoVoigt que combina la función Gaussiana y Lorentziana. En las figuras que muestran las bandas deconvolucionadas la línea negra corresponde al espectro experimental, en absorbancia, y las líneas de colores a las bandas que lo compondrían, (la línea

roja muestra la envolvente de las mismas). Esta metodología permitió obtener información sobre cuatro parámetros de interés (centro, área, ancho y altura de la banda “componente”) que se obtuvieron al realizar el proceso de deconvolución. Una cantidad que se derivó de estos datos fue el área integrada (relación entre el área bajo la banda “componente” de interés y el área total de la banda total deconvolucionada) y que da información semicuantitativa de la concentración del grupo funcional correspondiente, asociado a la banda, en la muestra total.

4.1.1. Sistema sin AcacH

En la figura 4.1 se observa la superposición de los espectros Infrarrojos de muestras tomadas en los primeros instantes del proceso, a tiempos de 15 min.

Inicialmente, en todos los espectros IR, se puede observar una banda ancha alrededor de 3380 y las ubicadas a 2960 cm^{-1} ; la primera se puede asociar a la presencia de grupos –OH del agua junto a la situada alrededor de 1640 cm^{-1} que corresponde al modo vibracional de flexión del agua [41].

En la Figura 4.2 se muestran los espectros IR de la zona deconvolucionada, a bajo número de onda, correspondientes a la primer lectura (figura 4.2(a)), 15 minutos (figura 4.2(b)), 30 minutos (figura 4.2(c)), 45 minutos (figura 4.2(d)), y 60 minutos (figura 4.2(e)) de desarrollo del proceso; se indica solo el intervalo entre 400 y 900 cm^{-1} porque es en esta región donde están ubicadas las bandas de mayor interés correspondientes a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C.

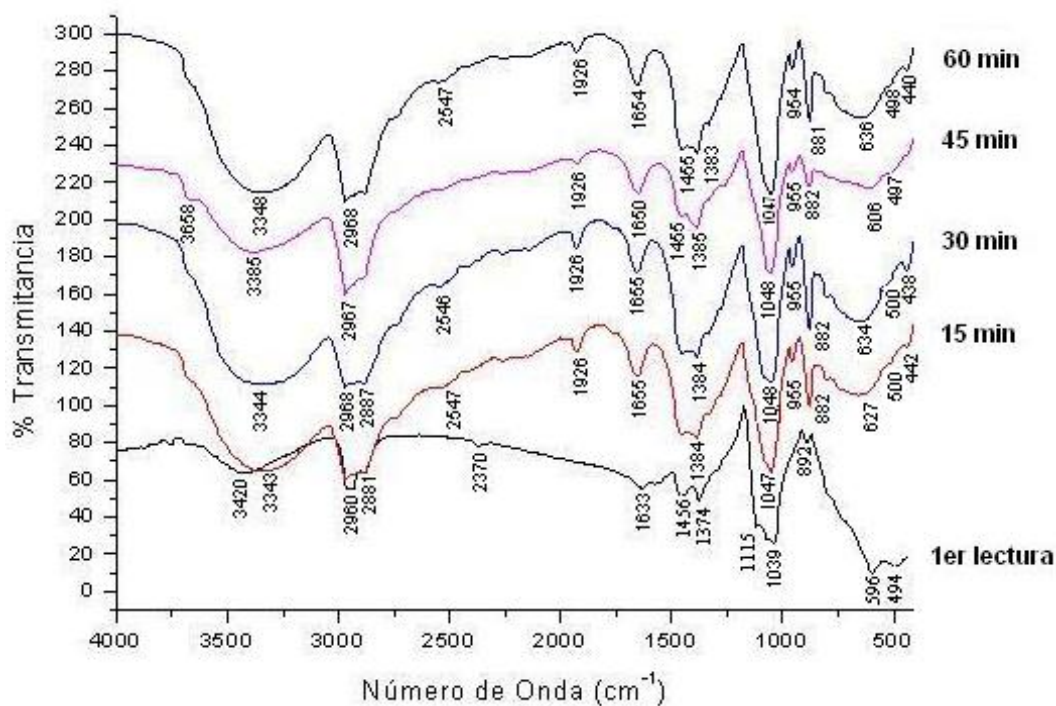
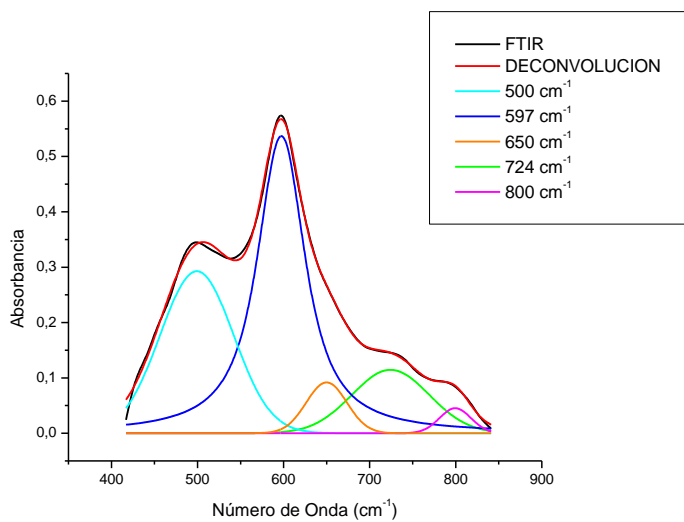
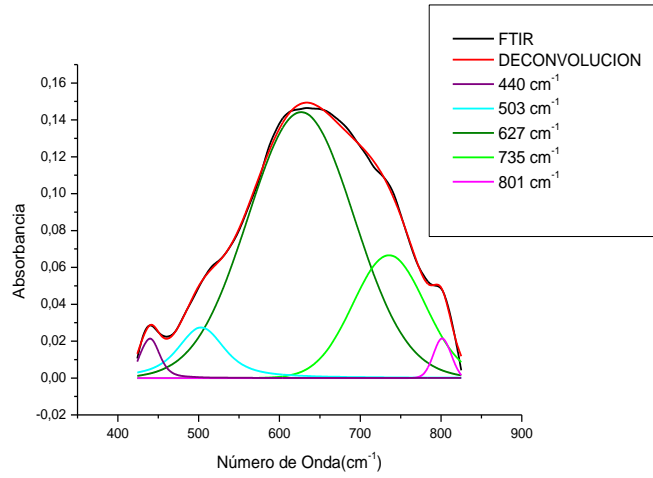


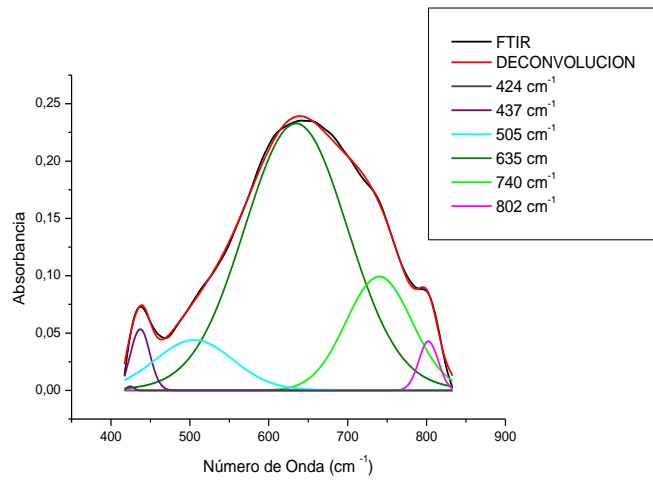
Figura 4.1. Espectros infrarrojos del sistema de titanio sin Aach a tiempos cortos de conformación del sol de titanio.



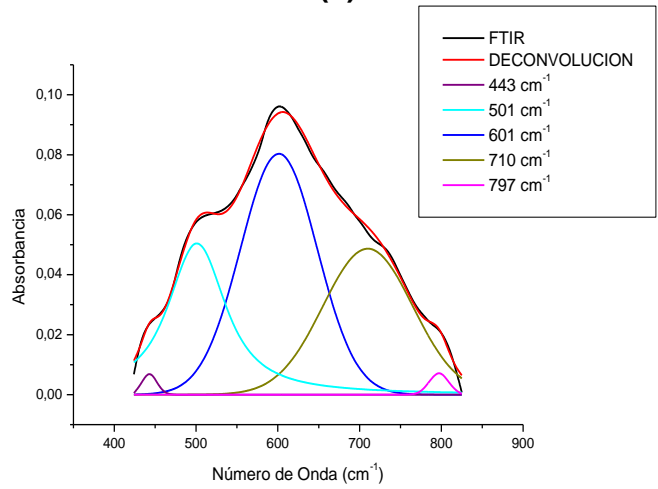
(a)



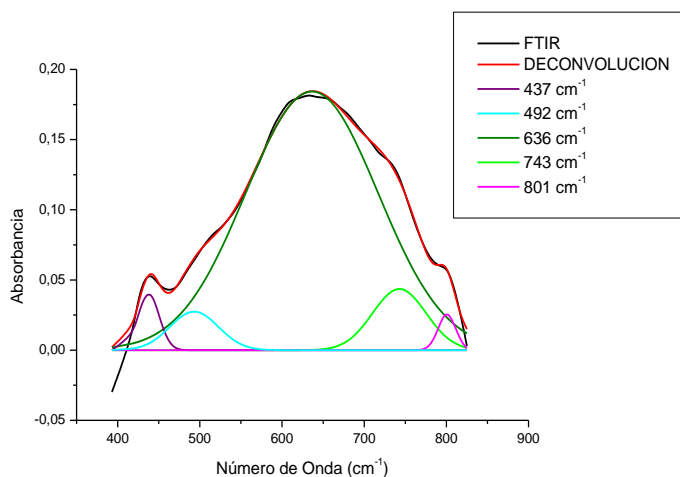
(b)



(c)



(d)



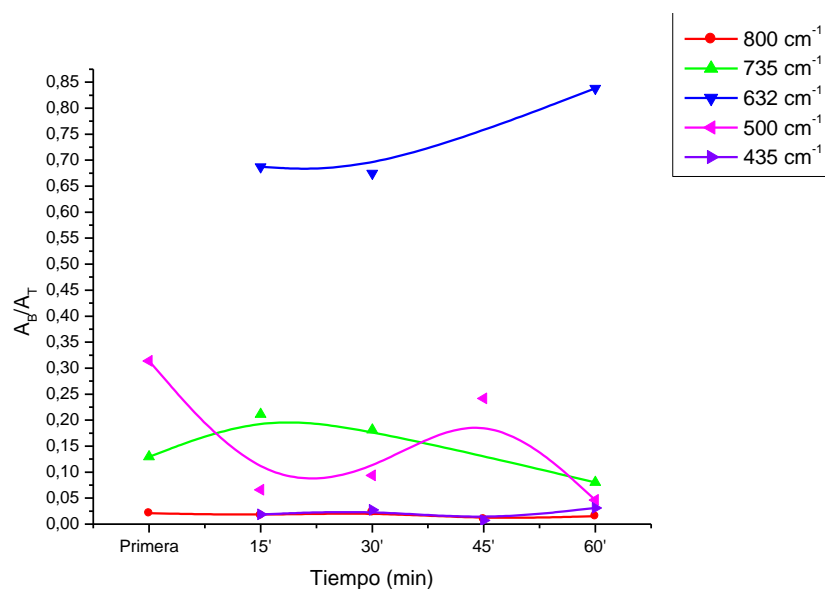
(e)

Figura 4.2. Espectros IR, a tiempos cortos, correspondientes a muestras tomadas a la primer lectura (a), a los 15 minutos (b), a los 30 minutos (c), a los 45 minutos (d) y a los 60 minutos (e), de soles del sistema sin Acach (región entre 400 y 900 cm^{-1}).

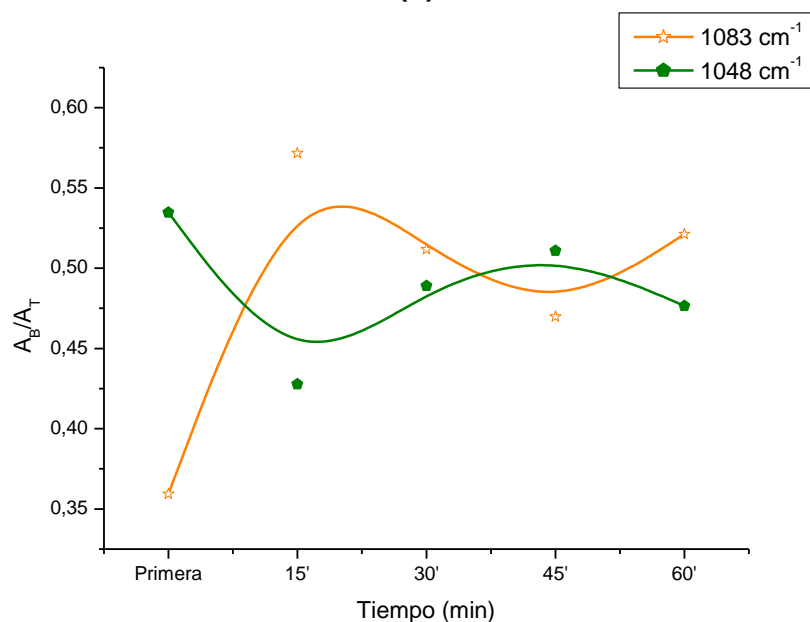
A tiempos cortos, en la figura 4.2, se observa una banda alrededor de 500 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace Ti-O-Ti, producto de la reacción de condensación de los grupos Ti-OH [42], y presenta un valor de área integrada bajo, figura 4.3(a), lo que indica que la presencia de estos enlaces en la muestra no es tan alta. La banda a 632 cm^{-1} se puede asociar a un modo vibracional del enlace Ti-O (Téllez L. et. al. 2004) y presenta un valor de área integrada que varía apreciablemente, incrementándose con el tiempo (figura 4.3(a)), lo que pone en evidencia la formación de dichos enlaces durante el desarrollo de las reacciones de hidrólisis y condensación.

La banda a 800 cm^{-1} se asocia, también, al grupo funcional Ti-OH (F, Babonneau. 1993) tal que su valor de área integrada es bajo, figura 4.3(a), y se mantiene estable hasta el final del análisis. La banda a 880 cm^{-1} corresponde al modo $\nu(\text{C-O})$ (Téllez L. et. al. 2004) y su área integrada aumentó estabilizándose al final del análisis como se puede observar en la superposición de espectros IR de la figura 4.1, al igual que la banda ubicada a 955 cm^{-1} se podría asociar a los

modos $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$ tal que el valor de su área integrada es baja y estable lo que indicaría poca concentración de este grupo funcional en la muestra (Fernández, A. Guzmán, A. 2007 [43]).



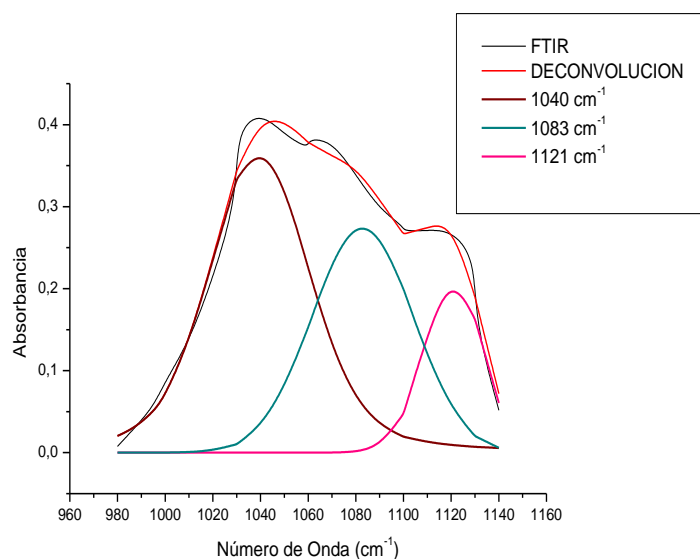
(a)



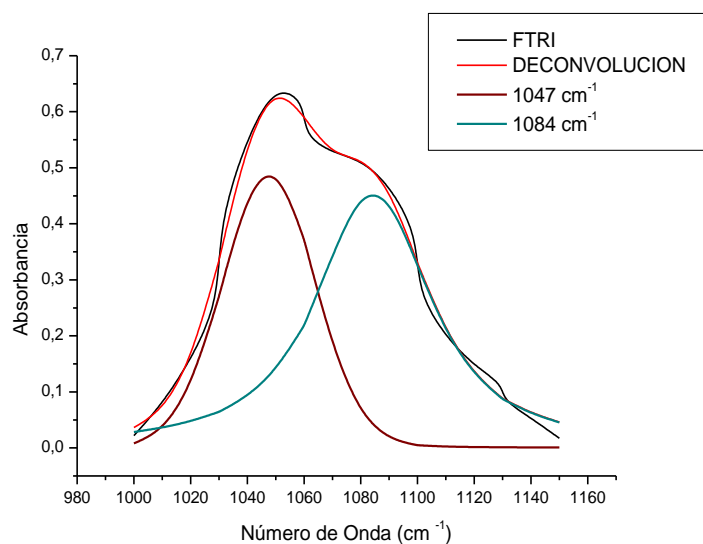
(b)

Figura 4.3. Curvas que muestran la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos cortos, de las bandas a 435, 500, 632, 735 y 800 cm^{-1} (a) y 1048, 1083 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema de titanio sin AcacH, durante la conformación de los soles de titanio.

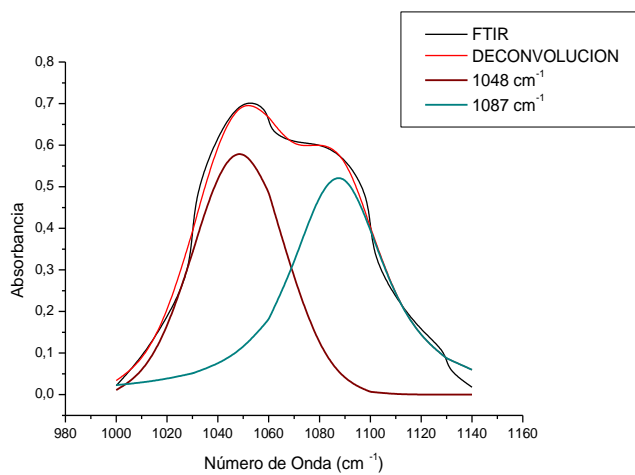
Por otro lado, las bandas a 1048, 1083 y 1125 cm^{-1} , figura 4.4, corresponden a los modos $\nu(\text{Ti-O-C})$ de los grupos butoxi ligados directamente al titanio (J.E. Rodríguez et. al. 2002), y presentaron un valor de área integrada estable (figura 4.3(b)). El valor de área integrada de la banda a 1083 cm^{-1} se incremento en los primeros 15 minutos, mientras que el de la banda a 1048 cm^{-1} decreció, y con el tiempo presentaron un valor de área integrada estable, figura 4.3(b).



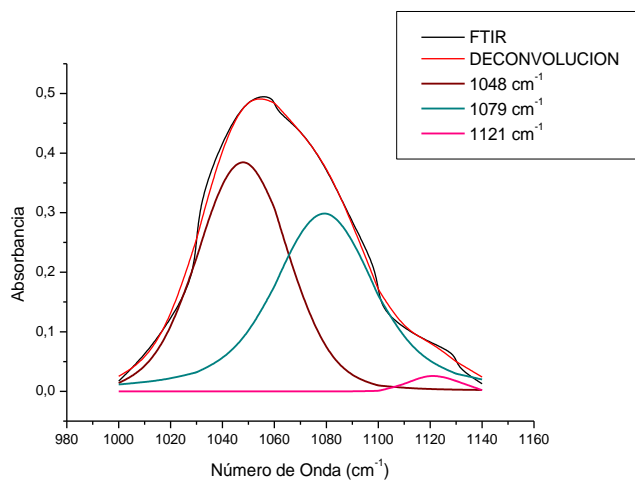
(a)



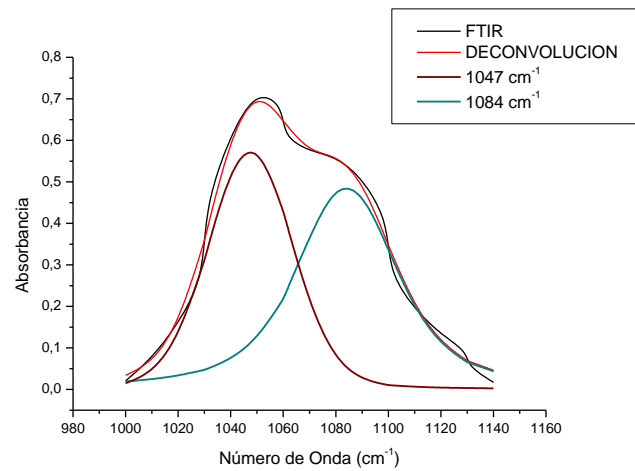
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.4. Espectros IR en la región entre 1000 y 1150 cm^{-1} , para tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e) de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema sin Acach.

En la figura 4.5 se muestran los espectros infrarrojos correspondientes a muestras tomadas a tiempos largos del proceso.

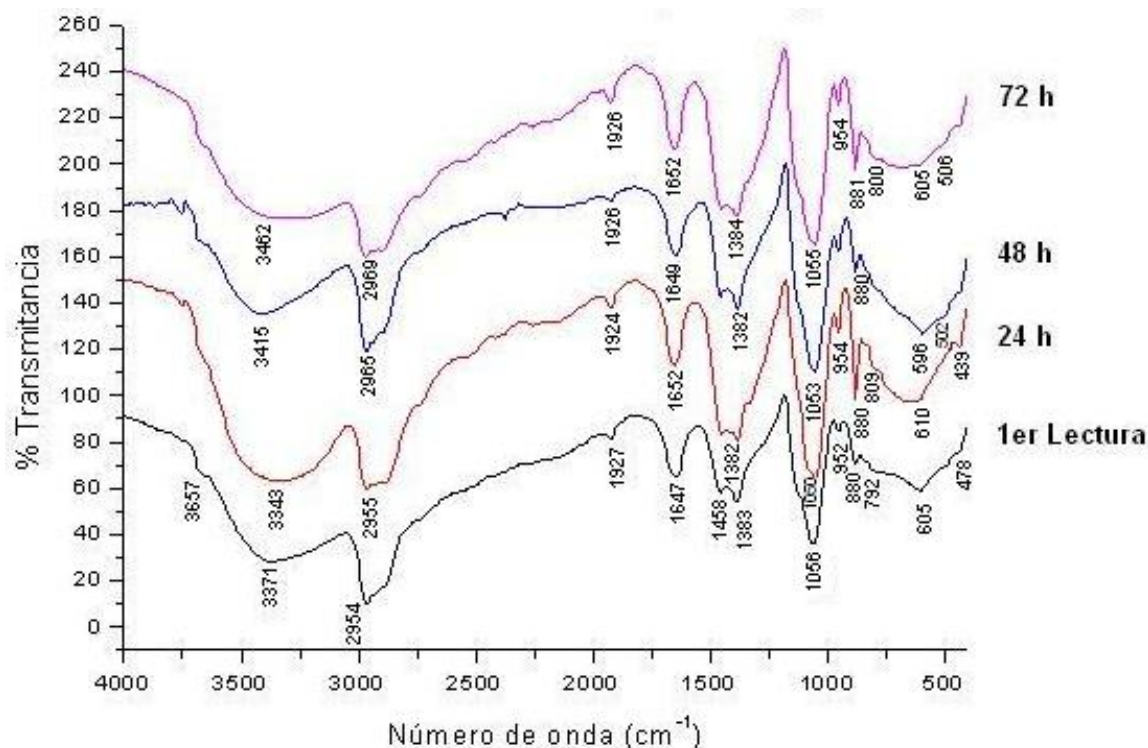
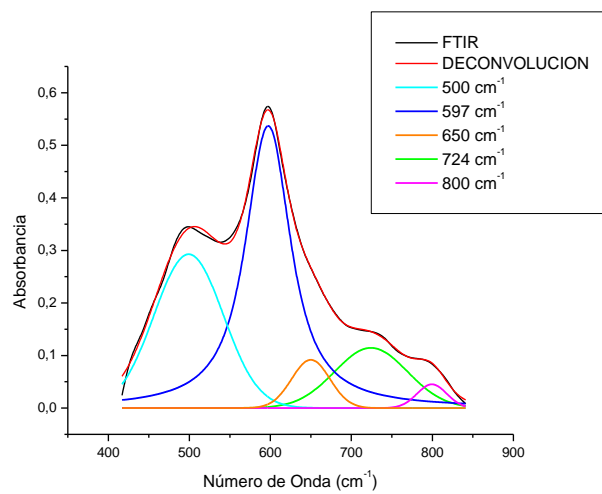
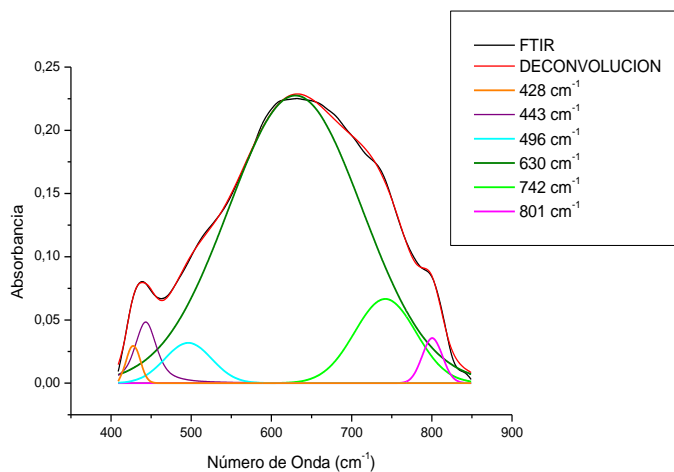


Figura 4.5. Espectros IR correspondientes a muestras del sistema de titanio, sin Acach, para tiempos largos de conformación del sol de titanio.

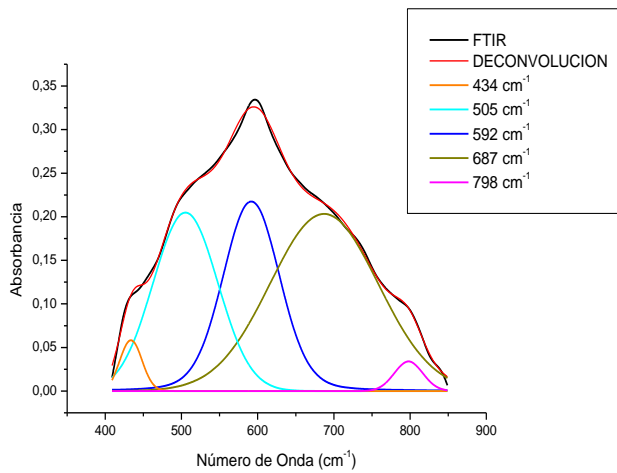
En la Figura 4.6 se muestran los espectros IR correspondientes a la primer lectura, figura 4.6(a), 24 horas, figura 4.6(b), 48 horas, figura 4.6(c), y a las 72 horas, figura 4.6(d), en el intervalo entre 400 y 900 cm^{-1} , región donde se encuentran las bandas de interés correspondientes a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C.



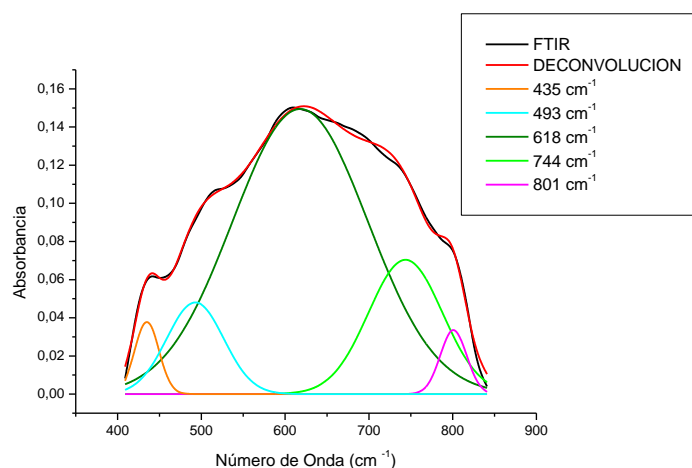
(a)



(b)



(c)

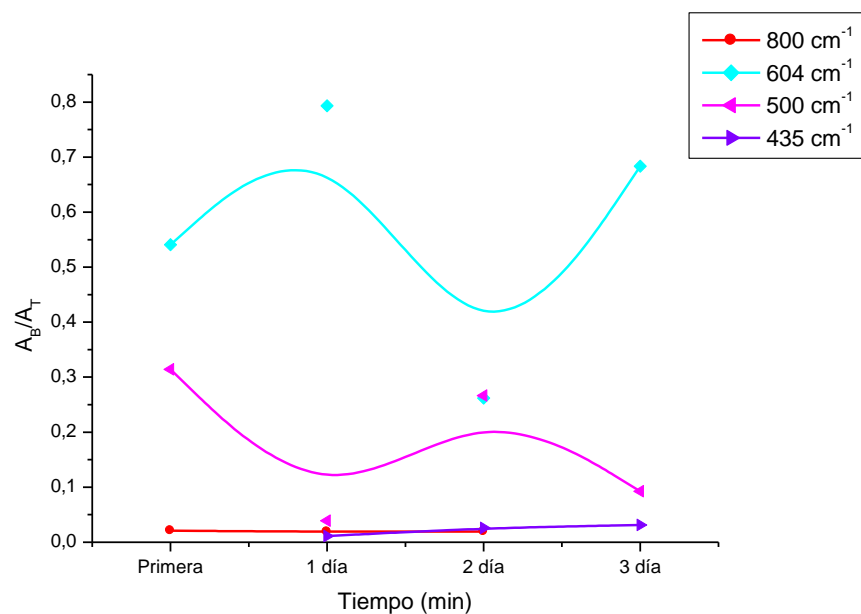


(d)

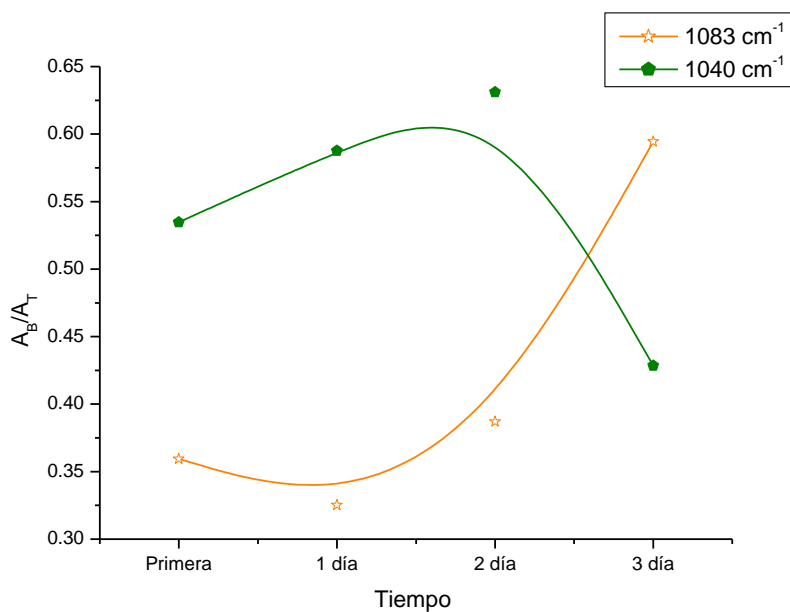
Figura 4.6. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} a tiempos largos correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y a las 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema sin Acach.

A tiempos largos, figura 4.6, se observan las bandas a 500 y 700 cm^{-1} que corresponden a modos vibracionales del grupo funcional Ti-O-Ti y la banda a $\sim 600 \text{ cm}^{-1}$ que se asocia al enlace Ti-O (Fernández, A. Guzmán, A. 2007); la banda a 500 cm^{-1} disminuyó drásticamente su valor de área integrada con el transcurso del tiempo, figura 4.7(a), mientras que la banda a 600 cm^{-1} , que se asocia al grupo funcional Ti-O, mantuvo constante su valor de área integrada, (figura 4.7(a)).

La banda a 800 cm^{-1} , asignada al grupo funcional Ti-OH, presenta con un valor de área integrada bajo y estable (figura 4.7(a)). La banda a 880 cm^{-1} se asocia al modo vibracional $\nu(\text{C-O})$ (Téllez L. et. al. 2004); su área bajo la curva observando la superposición de espectros de la figura 4.5, aumentó inicialmente y al final se estabilizó. La banda ubicada a 950 cm^{-1} corresponde a los modos $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$, (Fernández, A. Guzmán, A. 2007). Para ella se apreció un leve incremento de su área bajo la curva, figura 4.5, aunque mantuvo un valor bajo indicando poca presencia de estos grupos funcionales en el sistema.



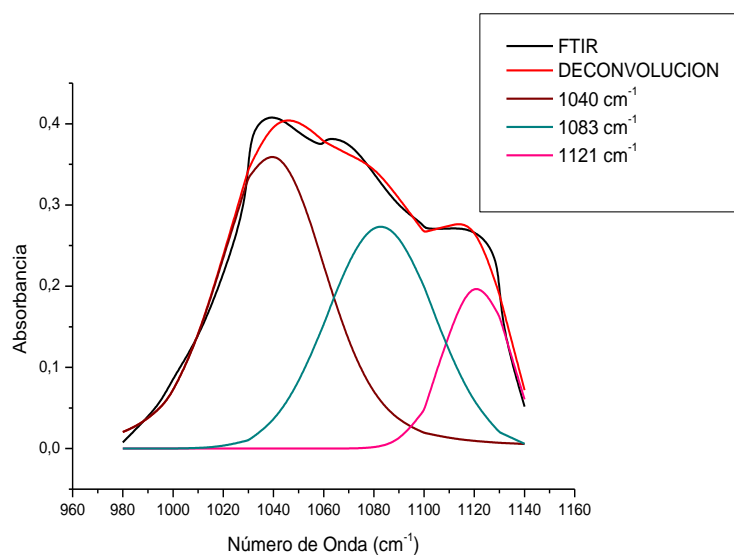
(a)



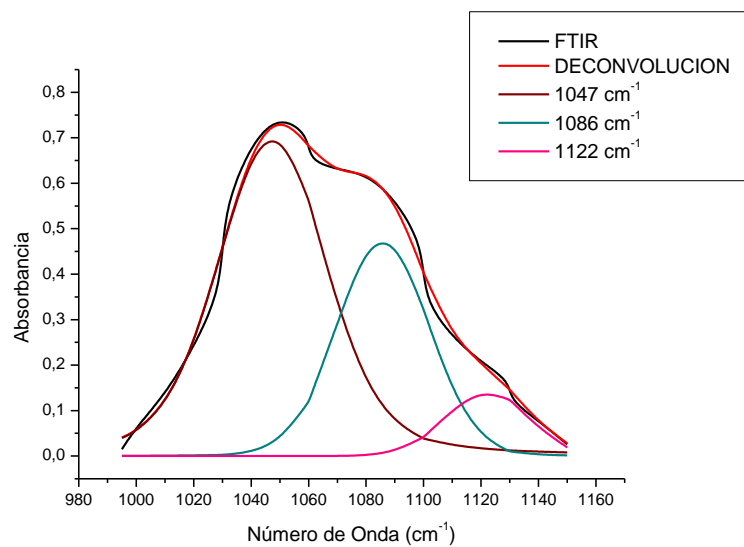
(b)

Figura 4.7. Curvas que muestran la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos largos, de las bandas a 435, 500, 604 y 800 cm^{-1} (a) y 1040, 1083 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema de titanio sin AcacH, durante la conformación de los soles de titanio.

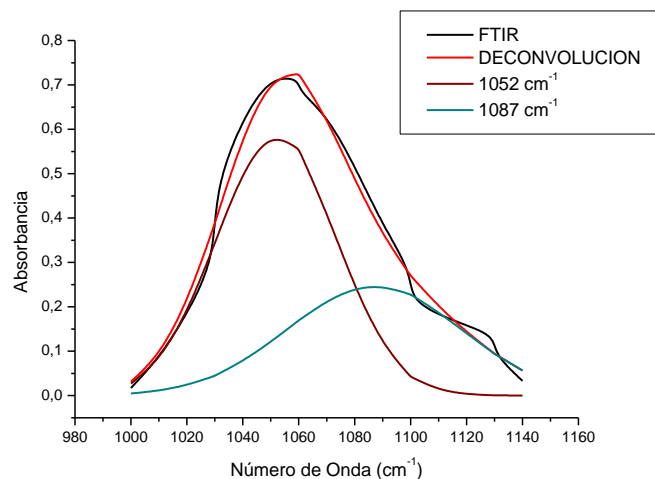
Las bandas a 1040 y 1083 cm^{-1} , figura 4.8, se pueden asociar a modos vibracionales del grupo funcional Ti-O-C, cuando el Ti se une al $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-O}$ (Téllez L. et. al. 2004); la banda a 1040 cm^{-1} presento un leve incremento en el valor de su área integrada durante el primer día, pero con el transcurso del tiempo decreció, mientras que el valor de área integrada de la banda a 1083 cm^{-1} se incremento con el tiempo, figura 4.7(b).



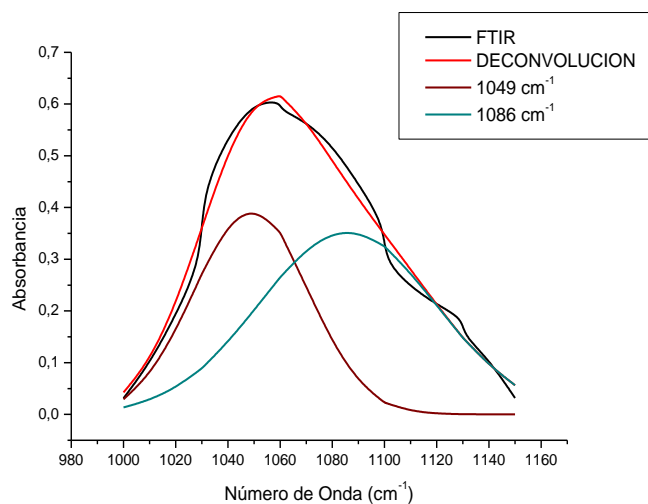
(a)



(b)



(c)



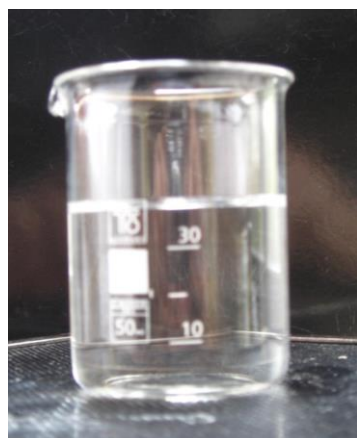
(d)

Figura 4.8. Espectros IR en la región 1000 y 1150 cm⁻¹, a tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c) y a las 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema sin Acach.

Las bandas de interés, para analizar lo que ocurre en el sistema, son las ubicadas entre ~500 y ~700 cm⁻¹ (grupo Ti-O-Ti), 800 cm⁻¹ (grupo Ti-OH), 600 cm⁻¹ (grupo Ti-O) y las bandas a 1040, 1083 y 1125 cm⁻¹ (grupo funcional Ti-O-C). De acuerdo a los valores de la figura 4.7 se puede concluir que los grupos funcionales más importantes en la muestra son el Ti-O (figura 4.7(a)) y el Ti-O-C (figura 4.7(b)) para tiempos largos de conformación del sol.

En la figura 4.9 se muestra la evolución del sistema de titanio, sin Acach, durante la formación del sol de titanio en cada instante del proceso. En estas fotografías se puede observar que la base de partida es totalmente transparente (figura 4.9.a), y va sufriendo cambios apreciables a simple vista, principalmente en color, hasta que se forma el precipitado en el seno del solvente (figura 4.9.i).

Finalmente, la suspensión de titanio se calentó, en una plancha, a una temperatura de 80°C , por 48 horas, para remover el agua y obtener el sólido que se caracterizó y se trató térmicamente, figura 4.10.



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



(f)

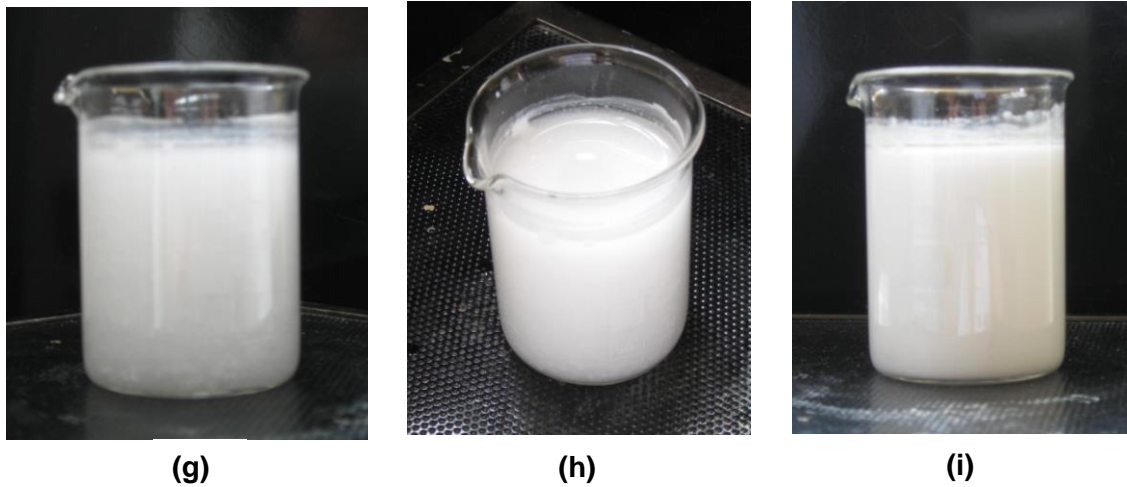


Figura 4.9. Seguimiento de la evolución del sistema de titanio y formación de un precipitado en el seno de la solución. Las fotografías se tomaron cada 20 minutos.



Figura 4.10. Material obtenido al secar a 80° C, la suspensión de titanio obtenida al final del proceso sol – gel.

4.1.2. Sistema con Acach

Para determinar el efecto del Acach como acomplejante se tomaron y analizaron varias relaciones de $[Ti/Acach]$. En el sistema titanio-acach no se observó formación alguna de precipitado.

4.1.2.1 Relación Ti : AcacH = 2:1

La adición del acomplejante, acetilacetona, dio como resultado nuevas bandas en los espectros IR por los enlaces que formó este compuesto con las otras especies que existen en el sistema, además de la modificación de la ubicación de las ya existentes.

En la figura 4.11 se observan la superposición de los espectros IR de muestras tomadas en los primeros instantes del proceso, tiempos cortos, cada 15 minutos.

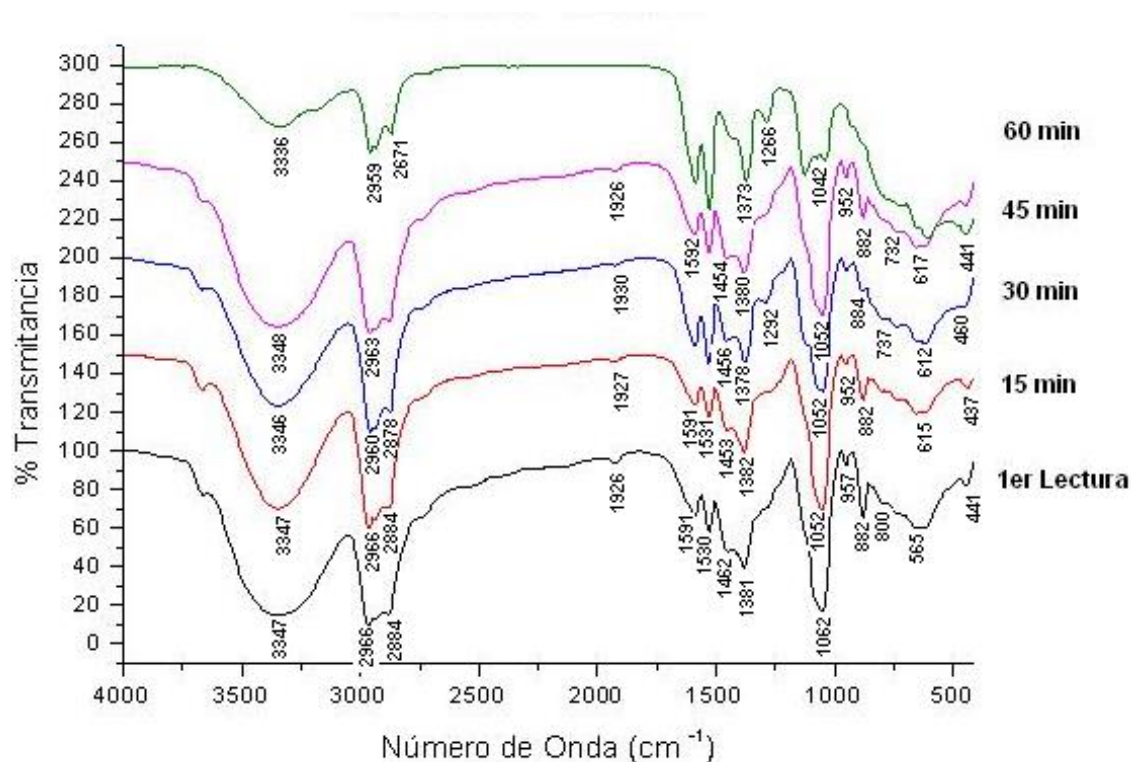
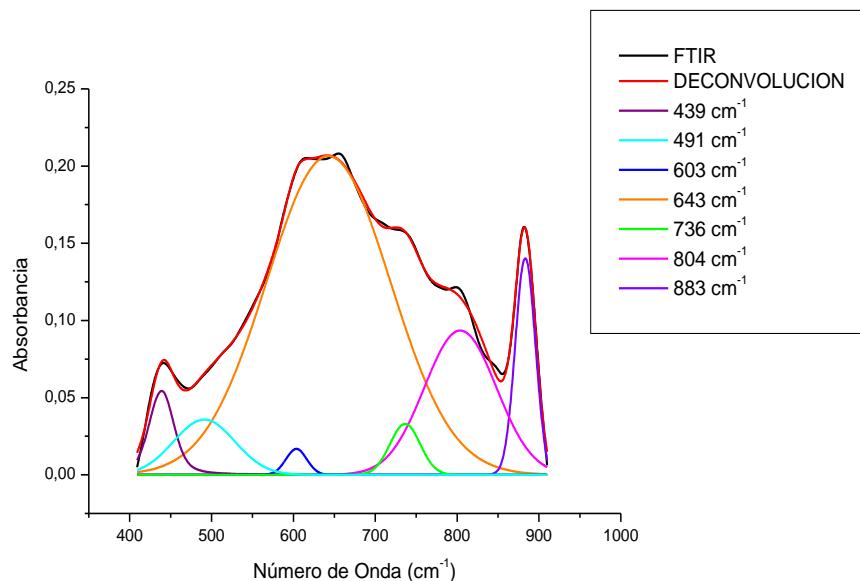


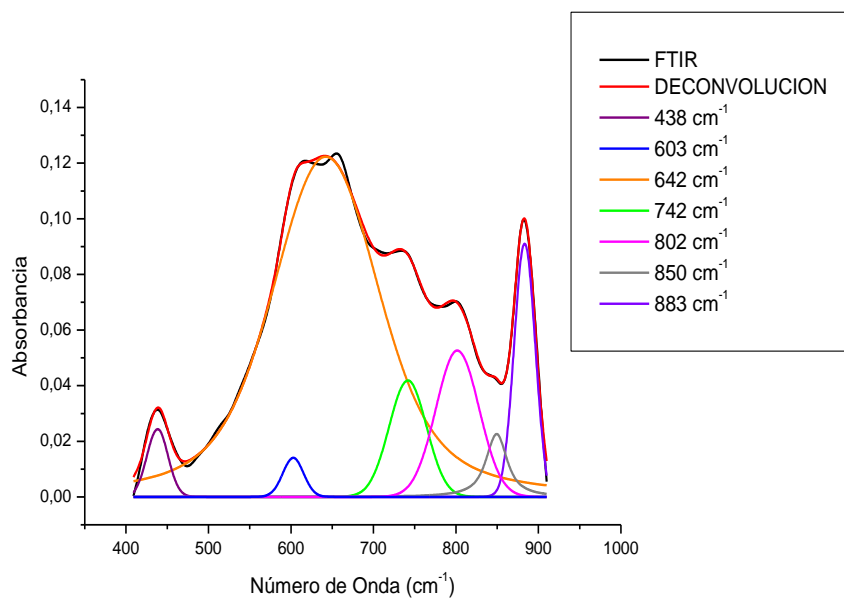
Figura 4.11. Espectros IR del sistema Ti:AcacH= 2:1 en tiempos cortos de la evolución del sol de titanio.

En todos los espectros se puede observar la banda ancha alrededor de 3350 cm⁻¹, que se puede asociar a la presencia de grupos -OH del agua, así como la situada alrededor de 1600 cm⁻¹, flexión del agua.

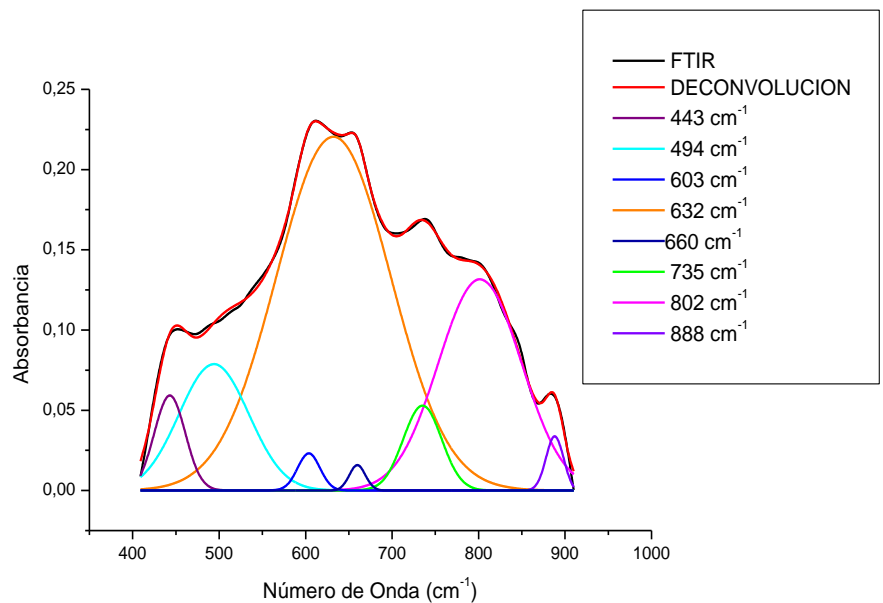
En la figura 4.12 se muestran los espectros IR entre 400 y 900 cm^{-1} porque es la región donde están las bandas de interés correspondientes a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C, correspondientes a la primer lectura, figura 4.12(a), 15 minutos, figura 4.12(b), 30 minutos, figura 4.12(c), 45 minutos, figura 4.12(d), y 60 minutos, figura 4.12(e).



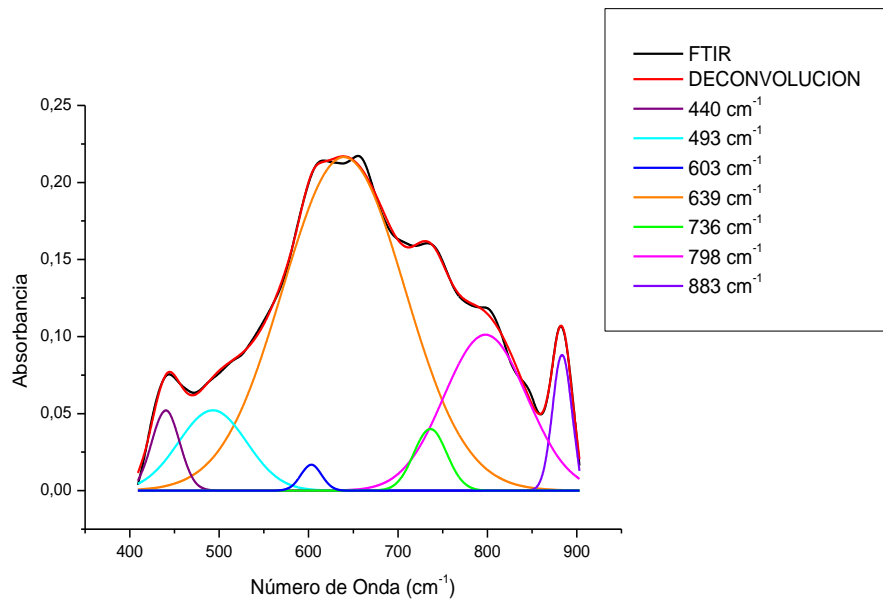
(a)



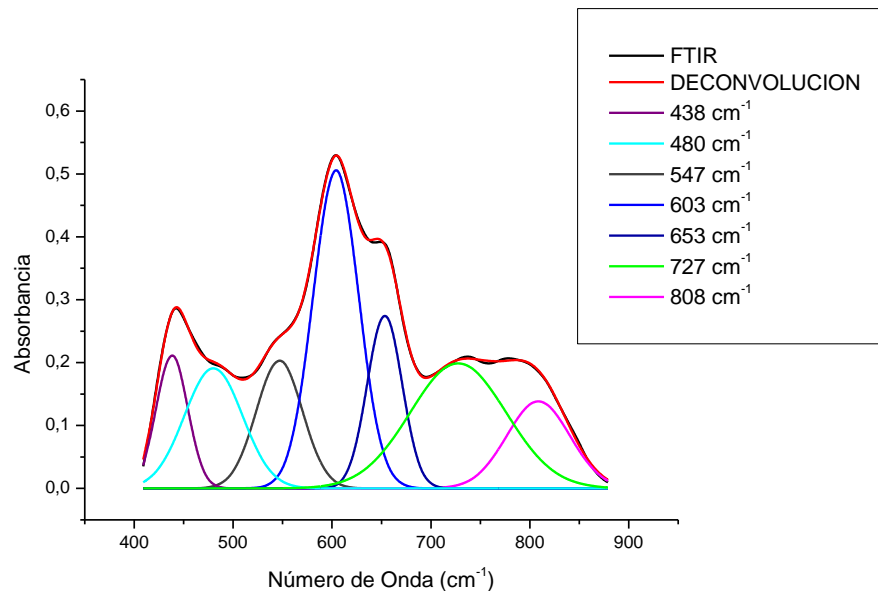
(b)



(c)



(d)



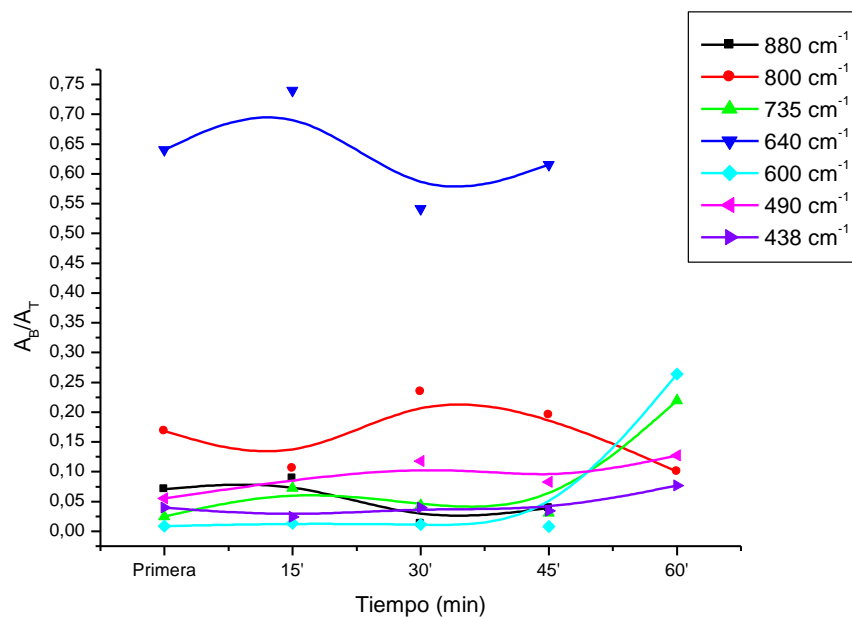
(e)

Figura 4.12. Espectros IR, tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e) de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH= 2:1, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} .

A tiempos cortos, figura 4.12, se observa una banda alrededor de 500 cm^{-1} que se puede asociar a la vibración de los complejos Ti-O-Ti producto de la reacción de condensación de los grupos Ti-OH, esta presenta un valor de área integrada bajo y estable, figura 4.13(a), lo que indica que la presencia de estos enlaces en la muestra no es tan alta. La banda a 600 cm^{-1} se asocia a un modo vibracional del enlace Ti-O y presenta un valor de área integrada bajo, estable, pero después de los 45 minutos se aprecia un incremento poniendo en evidencia la formación de más de estos enlaces, figura 4.13(a).

Alrededor de 640 cm^{-1} se observa una banda que corresponde a un modo vibracional del enlace Ti-AcacH (Fernández, A. Guzmán, A. 2007) cuyo valor de área integrada es relativamente alta, condición que evidencia la gran presencia de estos grupos funcionales en el sistema, figura 4.13(a), algo similar sucede

con la banda a 660 cm^{-1} , que también se puede asociar al grupo funcional Ti-Acach.



(a)

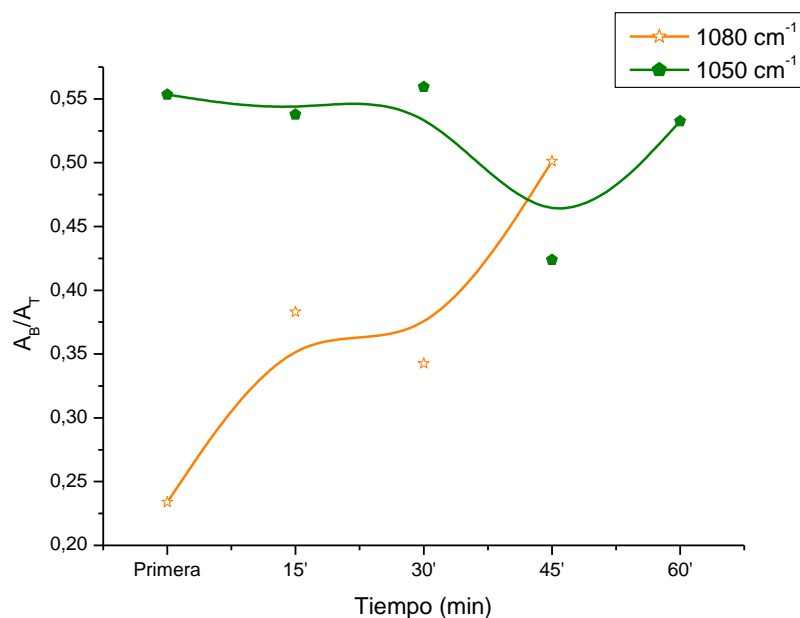


Figura 4.13. Curvas que indican la evolución del área integrada (A_b/A_T), para tiempos cortos, de las bandas a 438, 590, 600, 640, 735, 800 y 880 cm^{-1} (a) y 1050, 1080 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:Acach = 2:1, durante la conformación de los soles de titanio.

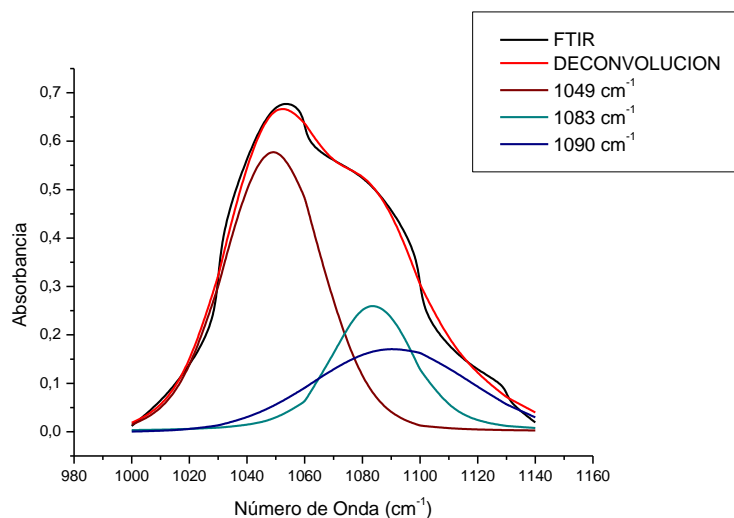
En este sistema también se encuentra una banda a 800 cm^{-1} relacionada al grupo funcional Ti-OH, tal que su área integrada, figura 4.13(a), se mantiene estable hasta el final del análisis. Además aparece una banda a 880 cm^{-1} que se pueden asociar a modos vibracionales del grupo C-O y que tiene valores de área integrada relativamente bajos, pero muy estables con respecto a las anteriores, figura 4.13(a).

De la superposición de infrarrojos, figura 4.11, podemos observar una banda ubicada a 950 cm^{-1} que corresponde a los modos $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$ y presenta un área integrada baja muy estable. Estos resultados reiteran el enlace del AcacH con el Ti, lo que impediría la formación de enlaces Ti-OH (hidrólisis del titanio) (Fernández, A. Guzmán, A. 2007).

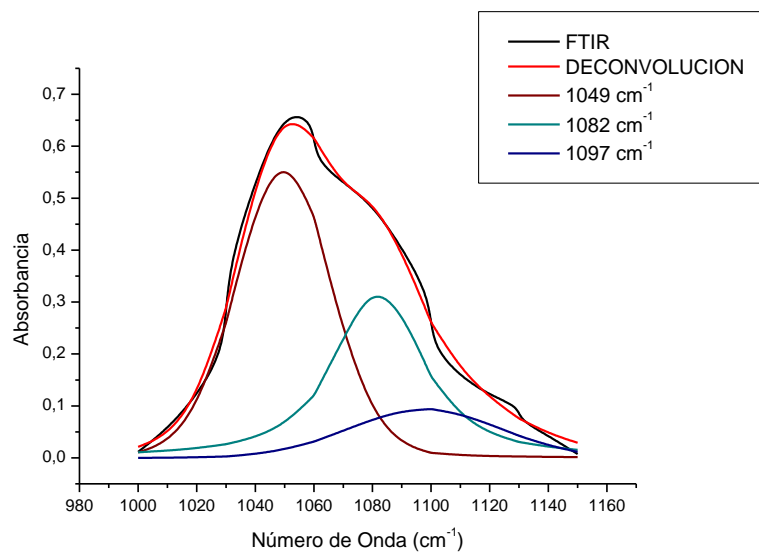
Por otro lado, las bandas a 1050 y 1080 cm^{-1} , figura 4.14, corresponden a las vibraciones (Ti-O-C) de los grupos butoxi ligados directamente al titanio (J.E. Rodríguez et. al. 2002). El valor de área integrada de la banda a 1080 cm^{-1} se incrementa constantemente mientras que el de la banda a 1050 cm^{-1} era bastante alto indicando que este enlace era relevante en el sistema, después de los primeros 30 minutos disminuyó, y al final se estabilizó, figura 4.13(b).

Las bandas de alrededor de 2965 y 2884 cm^{-1} también contienen información del modo $\nu(\text{CH}_3)$ del compuesto titanio-acetilacetona que se debió formar en el sistema. Si existiera AcacH libre en la muestra se debería presentar una banda de absorción ancha alrededor de 1620 cm^{-1} pero, en los espectros de la figura 4.11, no existe esta banda y se presenta una división de las frecuencias de tensión del C-C y C-O representado por las bandas a ~ 1591 y $\sim 1530\text{ cm}^{-1}$, esto es un indicio que los ligandos AcacH están ligados directamente al titanio (J.E. Rodríguez et. al. 2002).

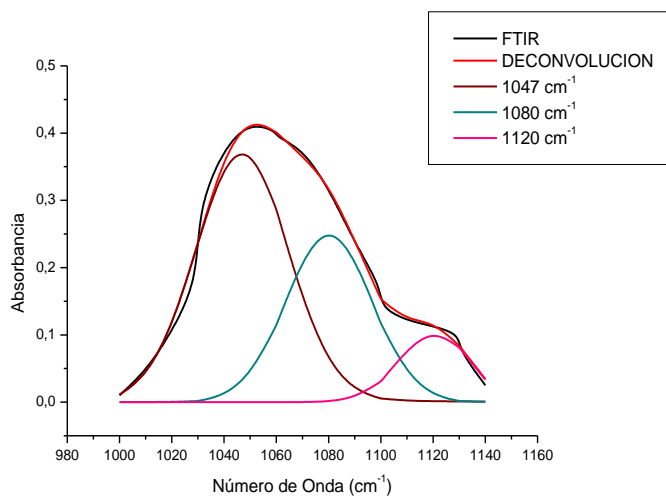
La banda a $\sim 1454 \text{ cm}^{-1}$ corresponde al modo vibracional combinado $\delta(\text{CH})$ y $\nu(\text{C}_-\text{C})$ y la banda intensa a 1381 cm^{-1} al modo $\delta_d(\text{CH}_3)$.



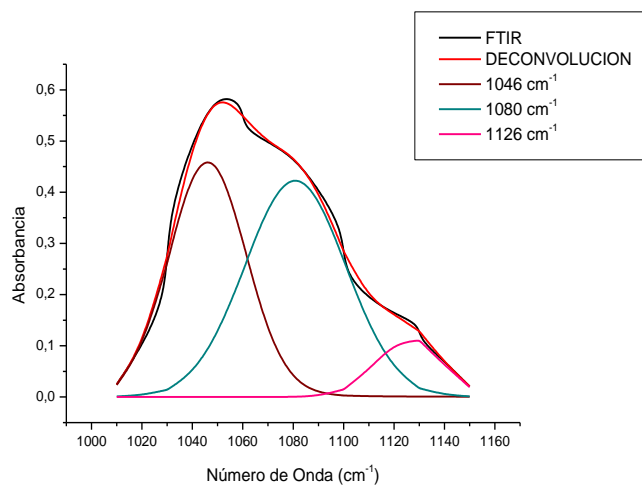
(a)



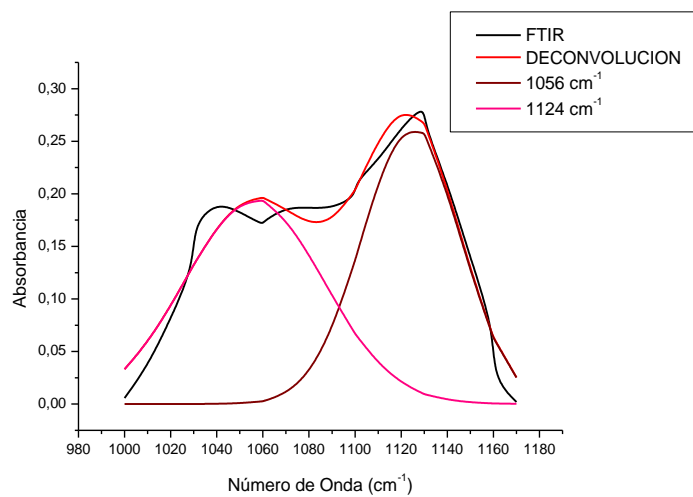
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.14. Espectros IR tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema 2:1, en la región entre 1000 y 1150 cm^{-1} .

En la figura 4.15 se muestran los espectros infrarrojos correspondientes a muestras tomadas a tiempos largos del proceso.

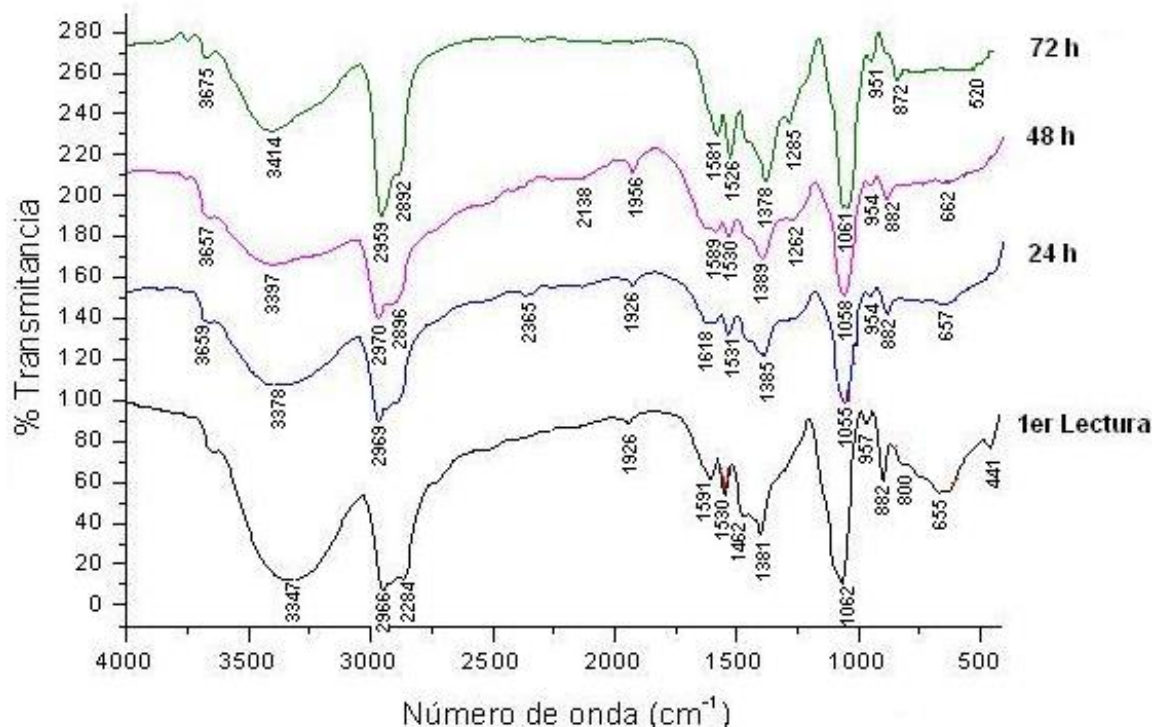
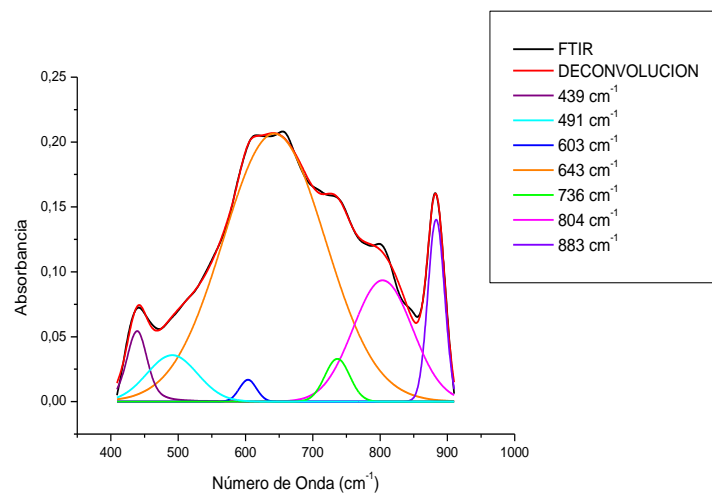
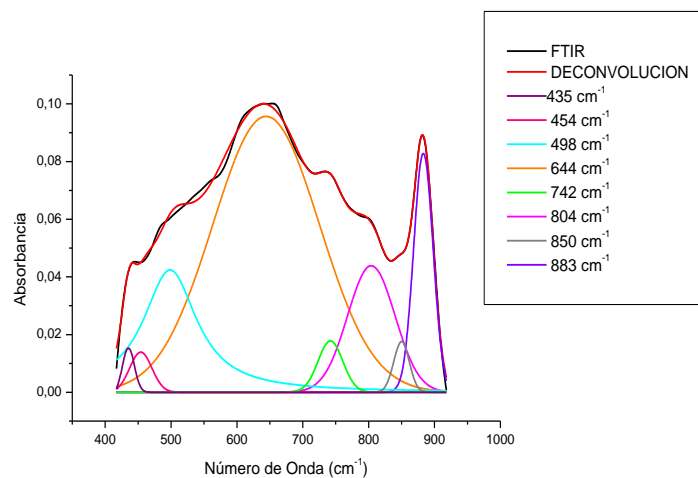


Figura 4.15. Espectros IR del sistema Ti:AcacH = 2:1 para tiempos largos de evolución del sol de titanio.

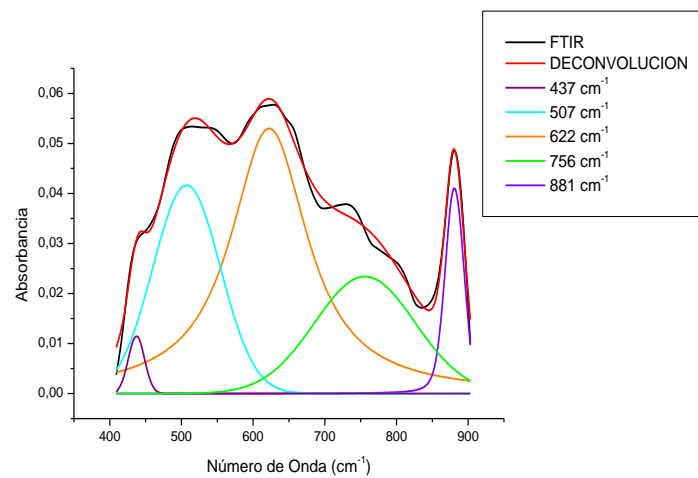
En la Figura 4.16 se muestran los espectros IR, en el intervalo entre 400 y 900 cm^{-1} , correspondientes a la primer lectura, figura 4.16(a), 24 horas, figura 4.16(b), 48 horas, figura 4.16(c), y a 72 horas, figura 4.16(d).



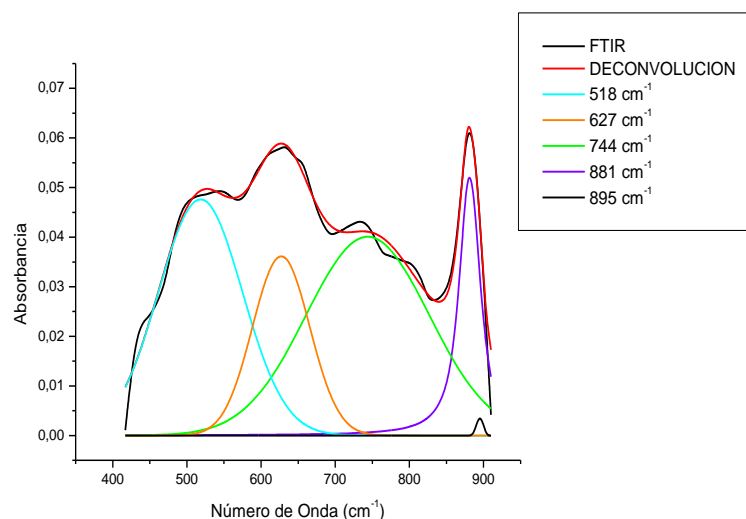
(a)



(b)



(c)

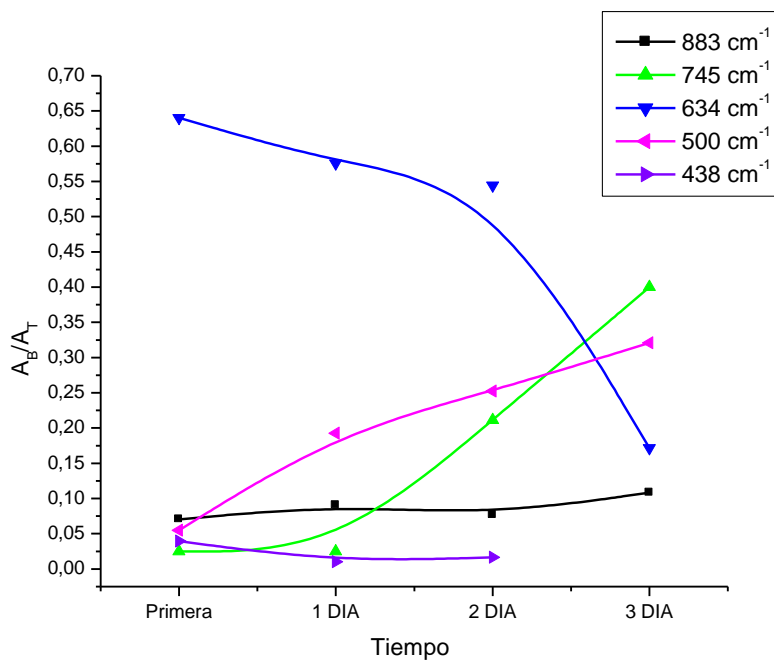


(d)

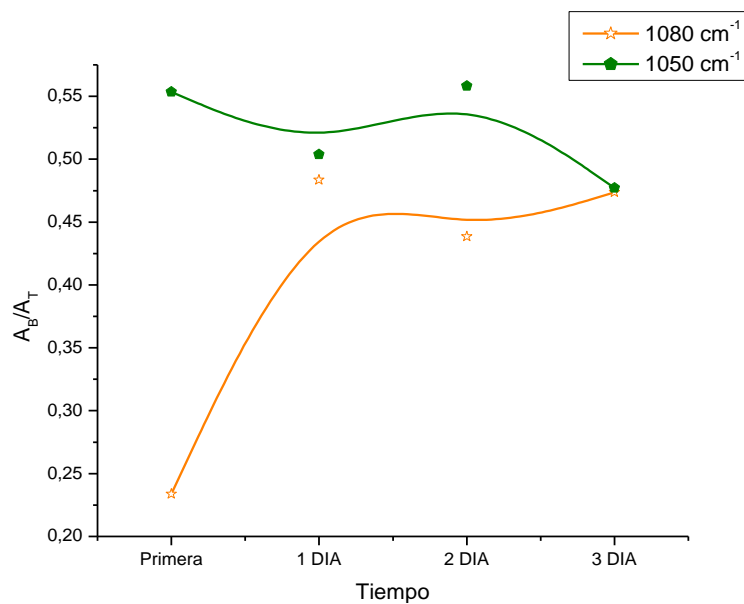
Figura 4.16. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y 72 horas (d) de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:Acach = 2:1.

Observando la figura 4.17, se destacan los valores de las áreas integradas relacionadas con las bandas a 500 cm^{-1} , grupo funcional Ti-O-Ti (Fernández, A. Guzmán, A. 2007) la cual presenta un incremento durante todo el análisis, y a $\sim 634 \text{ cm}^{-1}$, que corresponde a un modo vibracional del enlace Ti-Acach (Fernández, A. Guzmán, A. 2007), tal que sus valores de área integrada era alta, resultados que indican la gran presencia de estos grupos funcionales en el sistema (figura 4.17(a)).

La banda a 883 cm^{-1} , que se puede asociar a modos vibracionales del (C-O), presenta un valor bajo de área integrada indicando poca presencia de estos grupos funcionales en el sistema, figura 4.17(a). De la superposición de infrarrojos, figura 4.15, se observa la banda ubicada a 950 cm^{-1} , asociada a modos vibracionales de los grupos $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$, (Fernández, A. Guzmán, A. 2007).



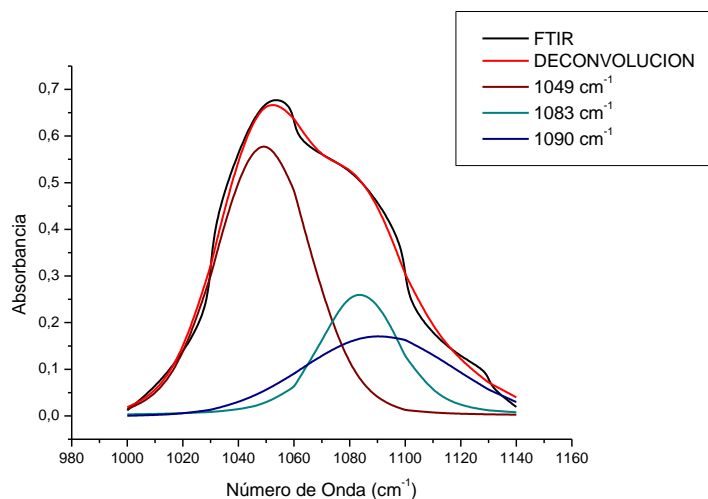
(a)



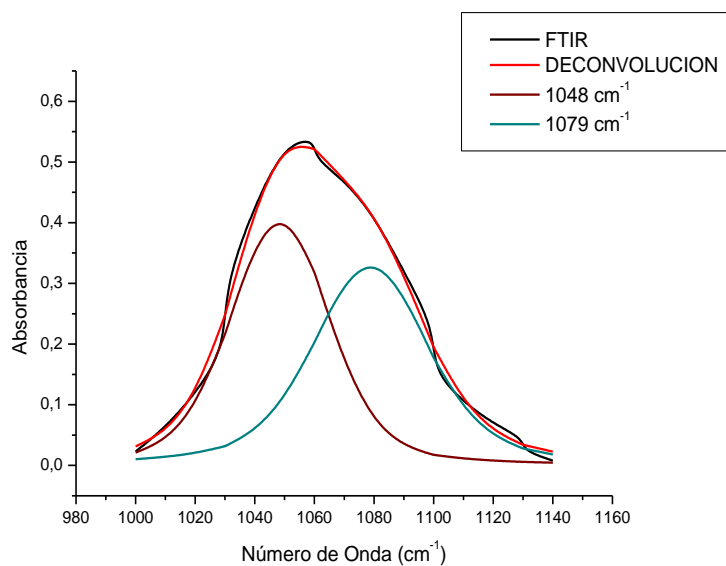
(b)

Figura 4.17. Curvas que indican la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos largos, de las bandas a 438, 500, 634, 745 y 883cm⁻¹ (a) y 1050, 1080 cm⁻¹ (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:Acach = 2:1, durante la conformación de los soles de titanio.

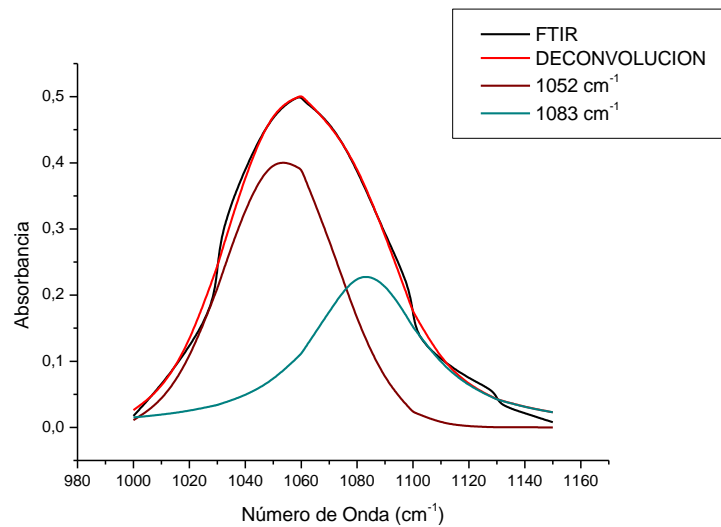
Por otro lado, en estas muestras siguen presentes las bandas a 1050 y 1080 cm^{-1} , figura 4.18, con valores relativamente altos de área integrada, figura 4.17(b); estas bandas se asocian a modos vibracionales del grupo funcional Ti-O-C.



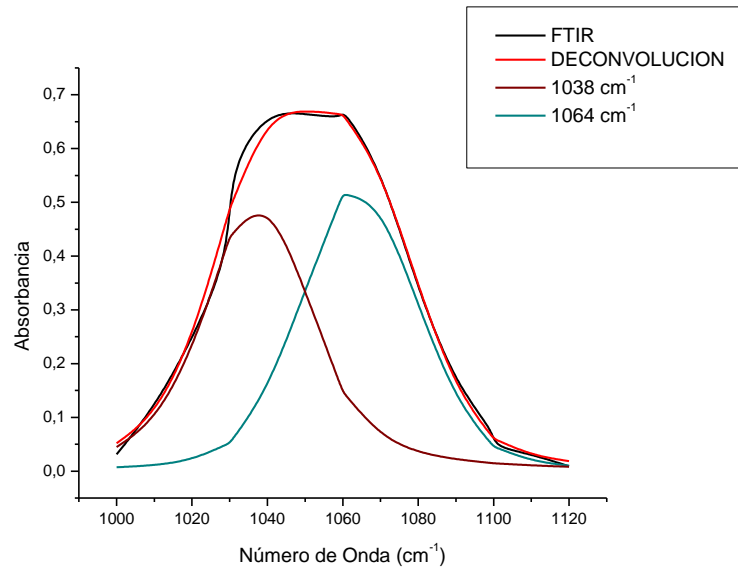
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.18. Espectros IR, en la región 1000 y 1150 cm⁻¹ tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y a 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 2:1.

4.1.2.2. Relación Ti : AcacH = 3:1

En la figura 4.19 se observa la superposición de los espectros IR de muestras tomadas en los primeros instantes del proceso, tiempos cortos de 15 min.

En la Figura 4.20 se muestran los espectros IR, rango entre 400 y 1000 cm^{-1} donde están las bandas de interés correspondientes a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C, correspondientes a la primer lectura, figura 4.20(a), 15 minutos, figura 4.20(b), 30 minutos, figura 4.20(c), 45 minutos, figura 4.20(d), y a 60 minutos, figura 4.20(e).

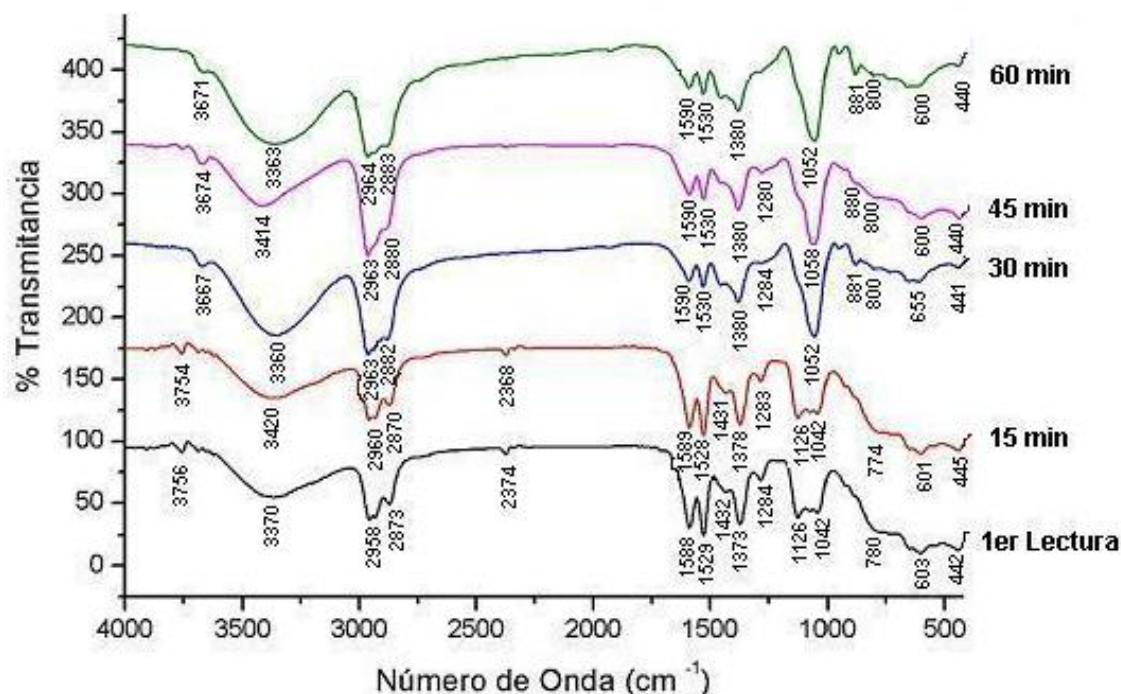
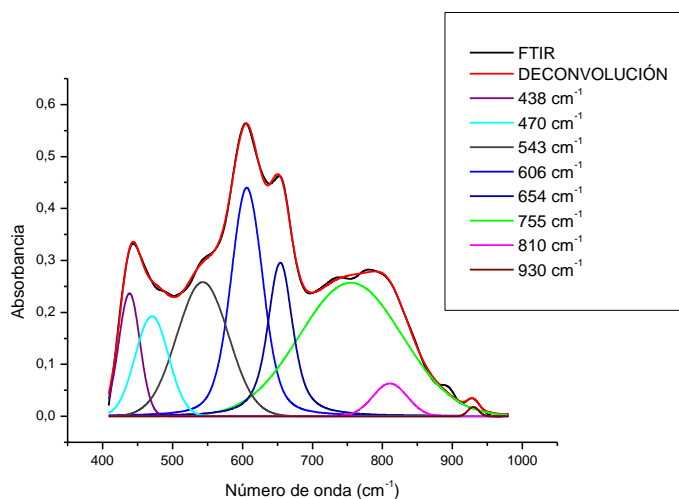
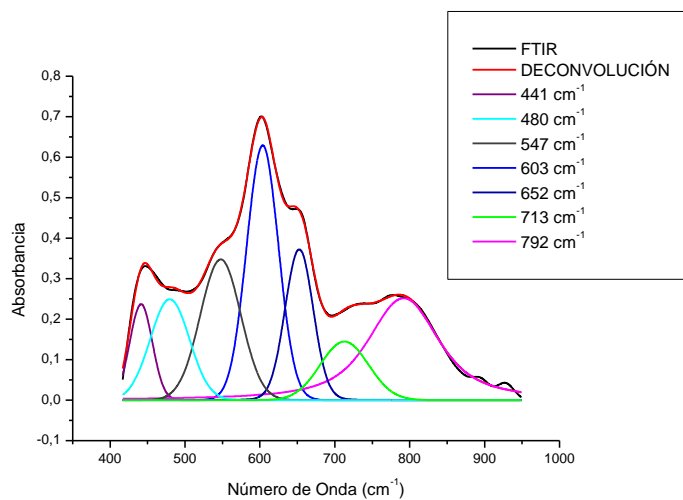


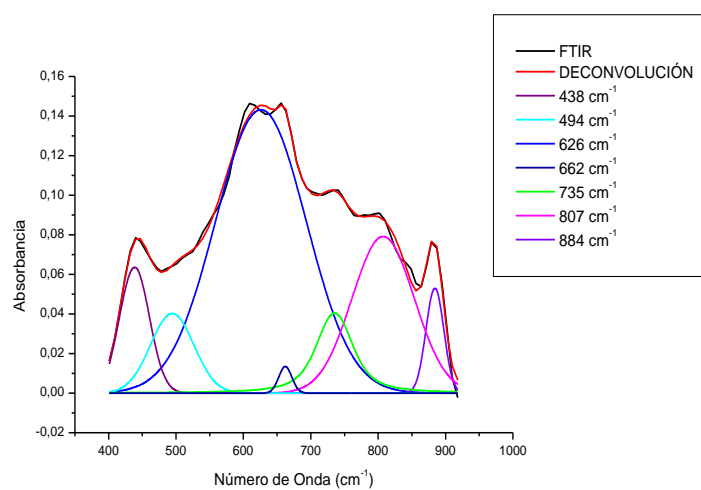
Figura 4.19. Espectros IR del sistema Ti:AcachH = 3:1 a tiempos cortos de evolución del sol de titanio.



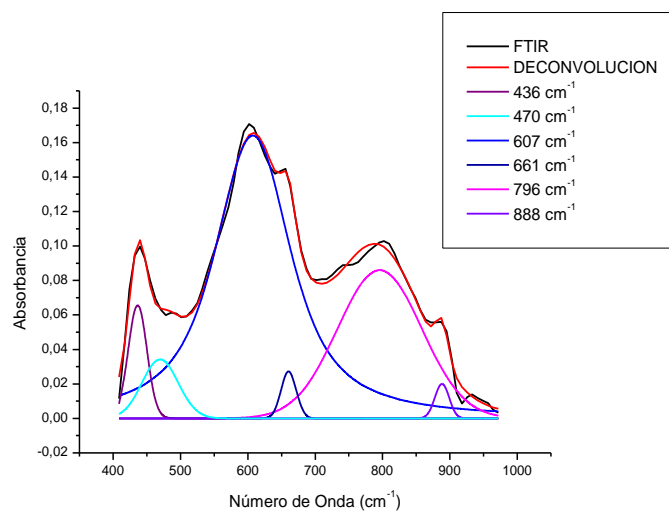
(a)



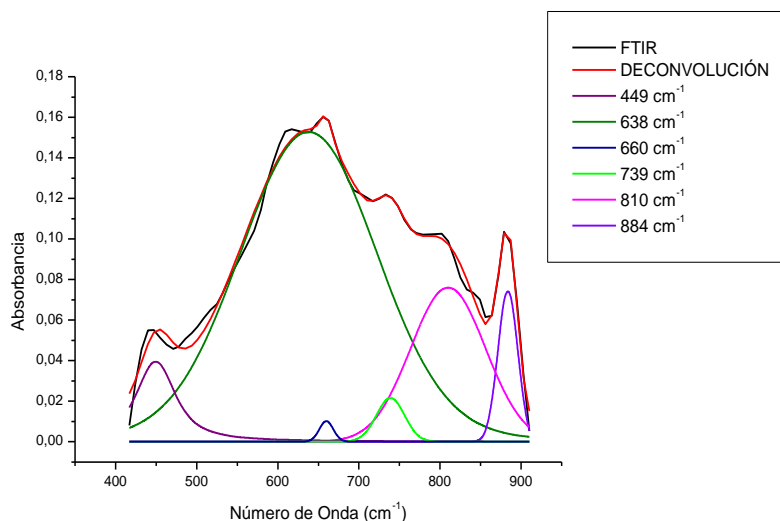
(b)



(c)



(d)



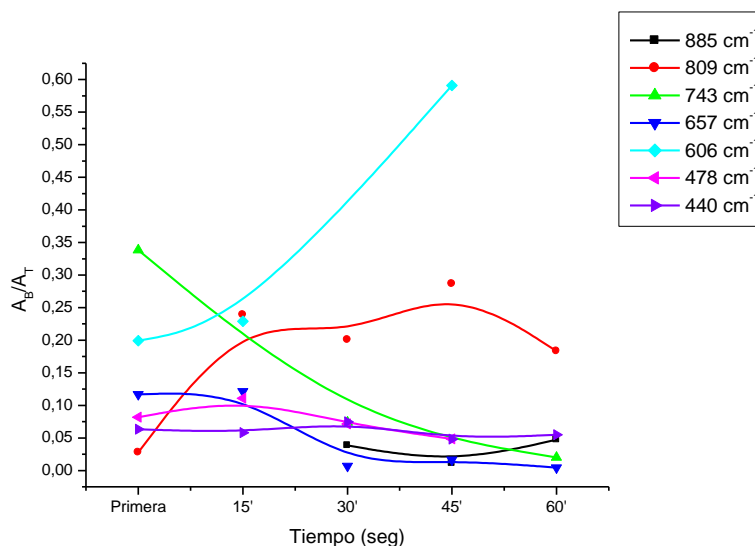
(e)

Figura 4.20. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1.

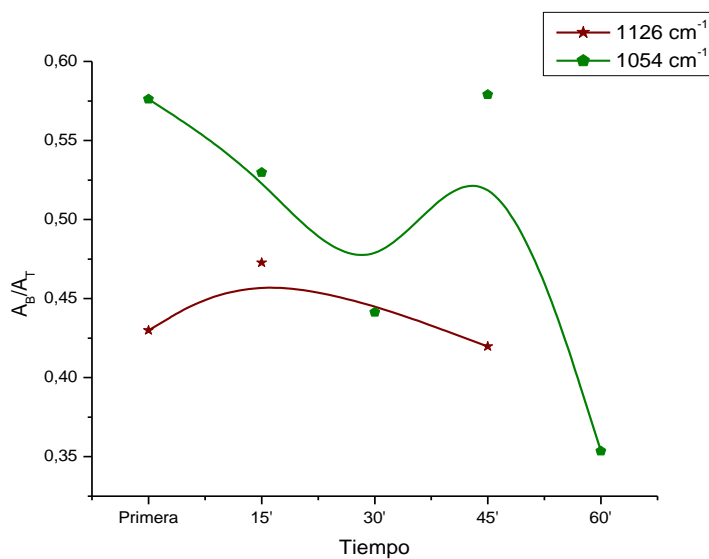
Para tiempos cortos, figura 4.20, la banda de 480 cm^{-1} , correspondiente a la vibración Ti-O-Ti, presentó un área integrada bajo y estable, figura 4.21(a), por lo que indica que este grupo funcional no existe en gran cantidad en el sistema. La banda a 606 cm^{-1} , que corresponde al modo vibracional Ti-O, presentó un valor de área integrada que se incrementó inmediatamente después de la primera lectura y adquirió un valor de área integrada relativamente alto, figura 4.21(a), resultado que pone en evidencia la gran formación de estos enlaces.

Alrededor de 657 cm^{-1} se observa una banda que corresponde a un modo vibracional del enlace Ti-AcacH (Fernández, A. Guzmán, A. 2007) cuyo valor de área integrada fue bajo, figura 4.21(a), denotando poca presencia de estos grupos funcionales en el sistema; esta banda aumentó su intensidad al incrementar la concentración de acetilacetona. En este sistema también se encuentra una banda a 809 cm^{-1} , relacionada al grupo funcional Ti-OH, tal que su área integrada se incrementó a partir de los 15 minutos, luego se mantuvo

estable hasta el final del análisis. Además, aparece una banda a 885 cm^{-1} que se puede asociar a modos vibracionales del grupo C-O y que tiene un área integrada relativamente baja pero muy estable con respecto a las anteriores, figura 4.21(a).



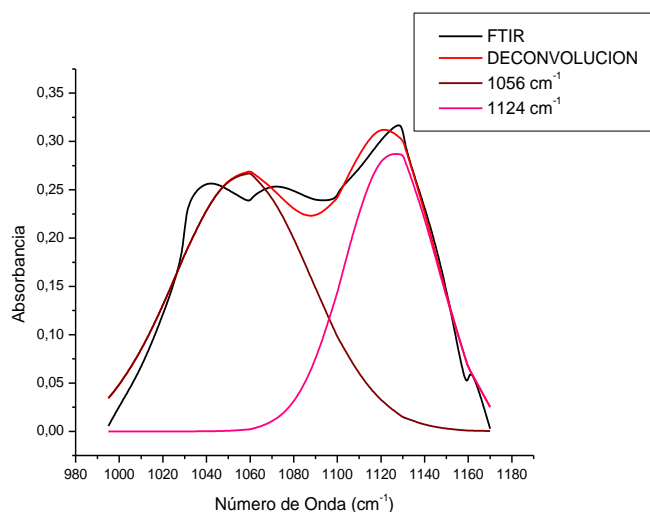
(a)



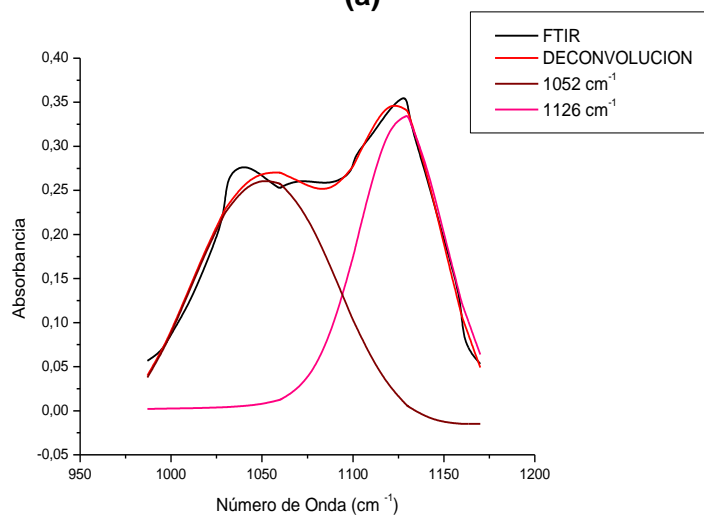
(b)

Figura 4.21. Curvas que indican la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos cortos, de las bandas a 440, 478, 606, 657, 743, 809 y 885 cm^{-1} (a) y 1054, 1126 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema $\text{Ti:AcacH} = 3:1$, durante la conformación de los soles de titanio.

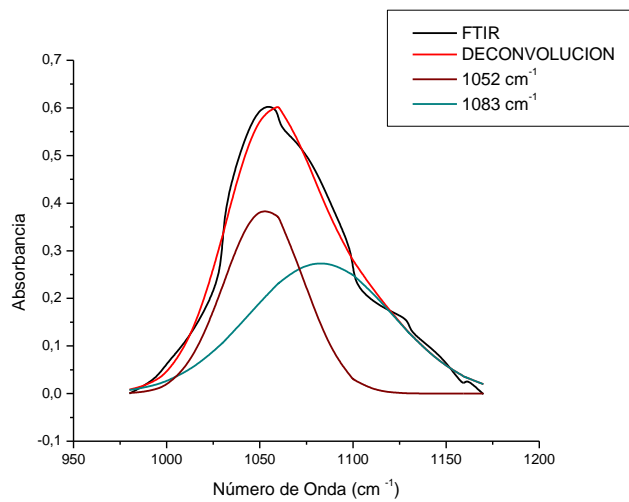
Por otro lado, las bandas a 1054 y 1126 cm^{-1} (figura 4.22), corresponden a los modos $\nu(\text{Ti-O-C})$, unido al $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-O}$, y presentan valores de área integrada que varían continuamente. La banda a 1054 cm^{-1} (figura 4.21(b)) presenta un área integrada que decreció durante todo el análisis, alcanzando un valor bajo, mientras que el área integrada de la banda a 1126 cm^{-1} es muy estable (figura 4.21(b)).



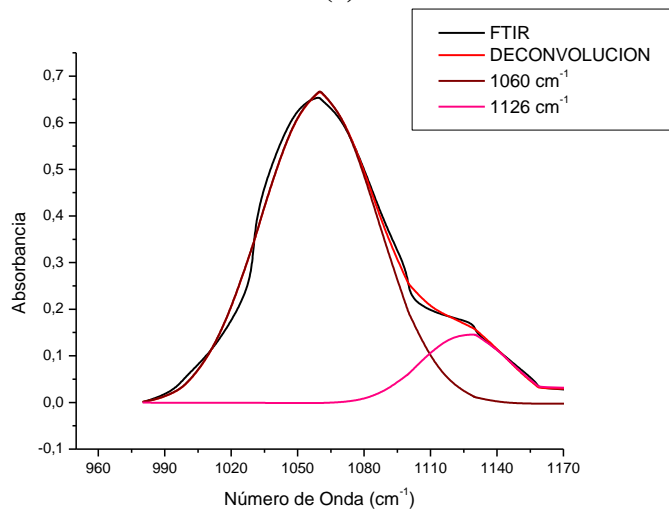
(a)



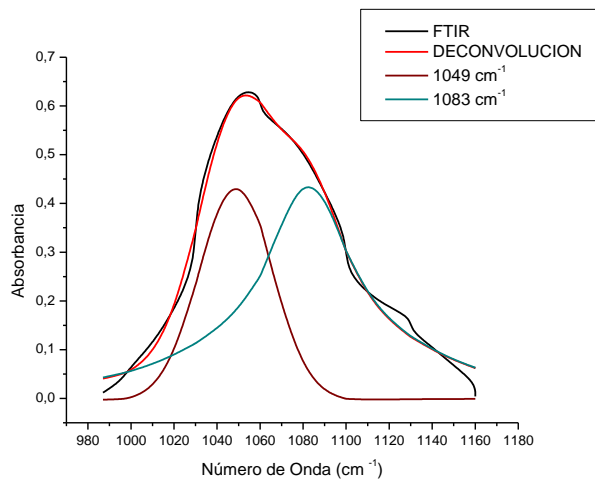
(b)



(c)



(d)



(e)

Figura 4.22. Espectros IR, en la región entre 1000 y 1150 cm^{-1} tiempos cortos, correspondientes a la primer lectura (a), 15 minutos (b), 30 minutos (c), 45 minutos (d), y 60 minutos (e), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1.

En la figura 4.23 se muestran los espectros infrarrojos correspondientes a muestras tomadas a tiempos largos del proceso de obtención del sol estable.

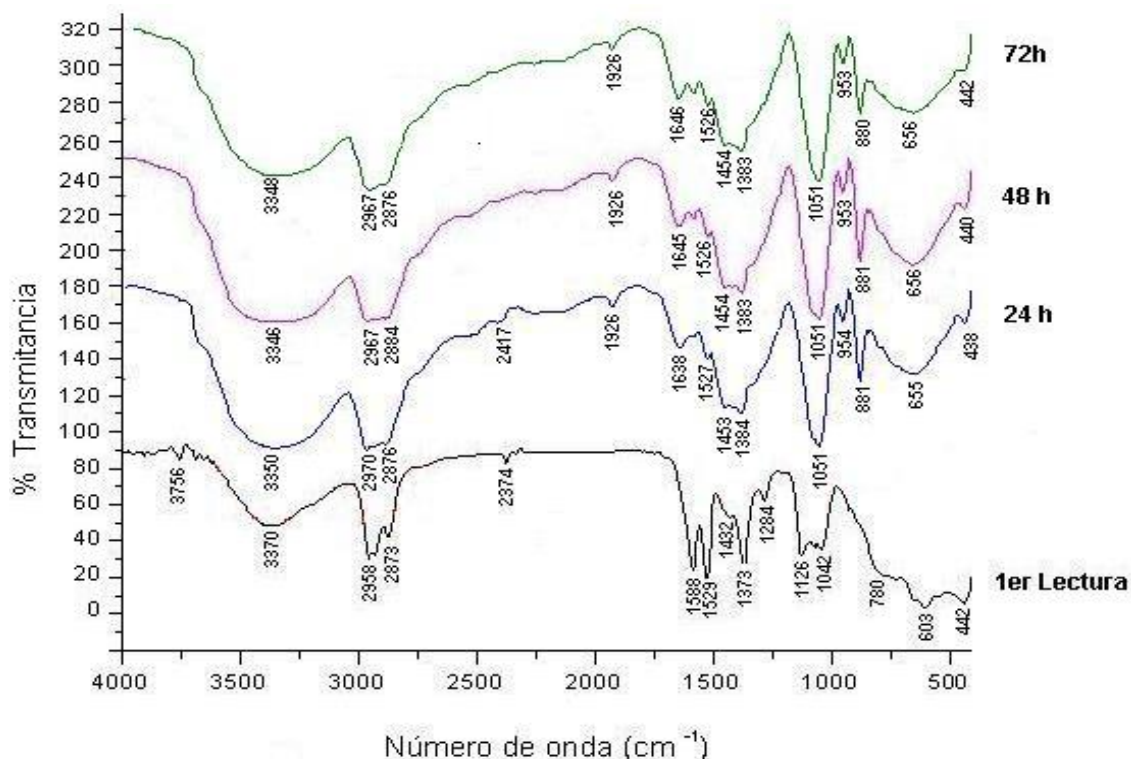
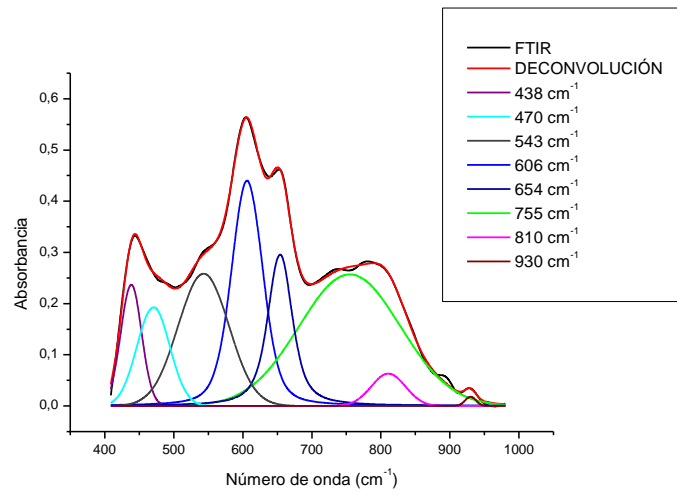
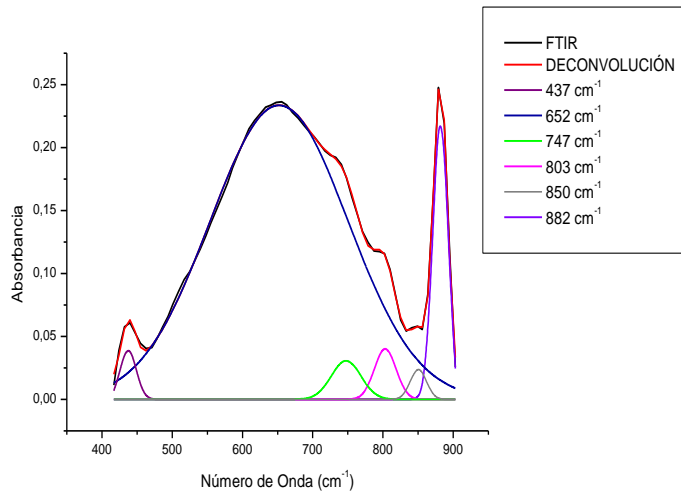


Figura 4.23. Espectros infrarrojos del sistema Ti:AcacH = 3:1 a tiempos largos de evolución del sol de titanio.

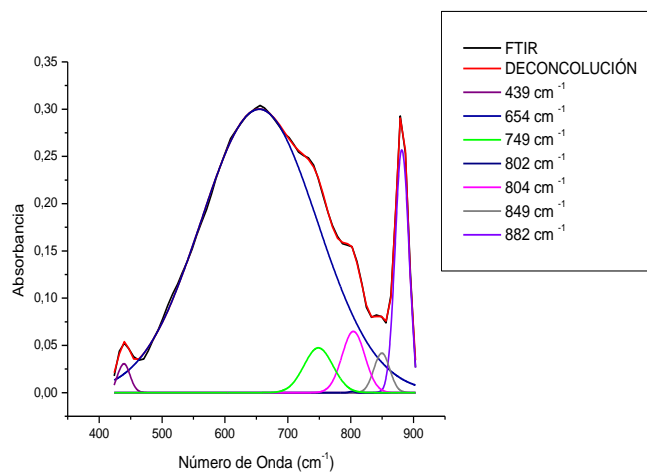
En la figura 4.24 se muestran los espectros IR, en un intervalo entre 400 y 900 cm^{-1} , correspondientes a la primer lectura, figura 4.24 (a), 24 horas, figura 4.24(b), 48 horas, figura 4.24(c), y 72 horas, figura 4.24(d).



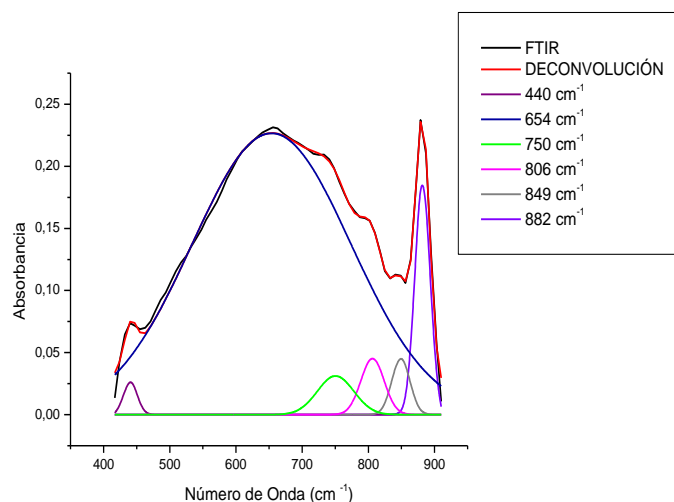
(a)



(b)



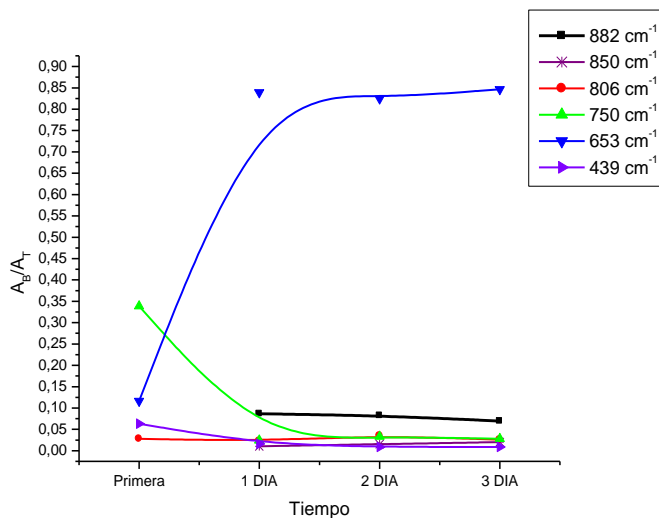
(c)



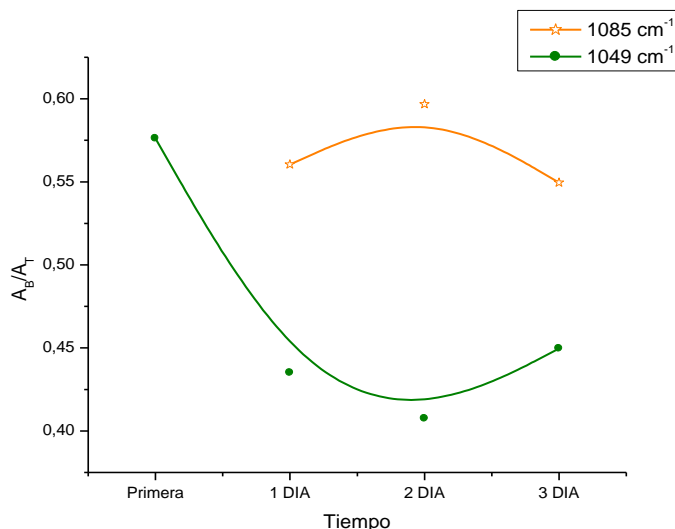
(d)

Figura 4.24. Espectros IR, en la región entre 400 y 900 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1.

El comportamiento de este sistema se asemeja más a aquel que no contenía AcacH (figuras 4.2 y 4.6). Observando la figura 4.24, tiempos largos para el sistema 3:1, no son evidentes las bandas a 500 cm^{-1} (Ti-O-Ti) y 600 cm^{-1} (Ti-O). Se destaca el área integrada de la banda a 653 cm^{-1} , asociada al modo vibracional del enlace Ti-AcacH (Fernández, A. Guzmán, A. 2007), cuyo valor es alto y muy estable, figura 4.25(a), resultado que evidencia la gran presencia de estos grupos funcionales en el sistema.



(a)

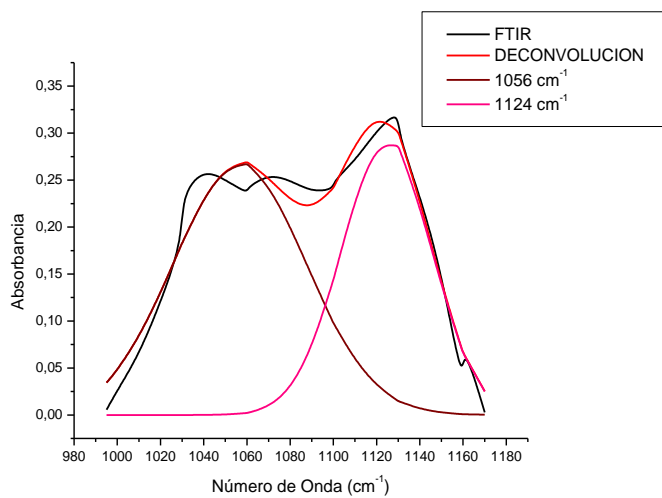


(b)

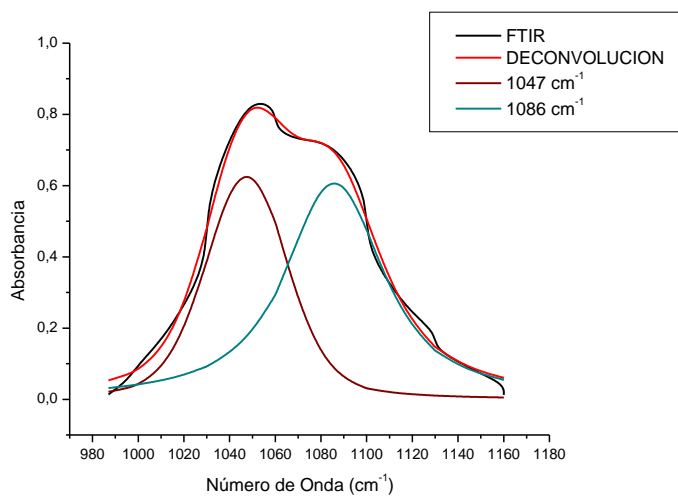
Figura 4.25. Curvas que muestran la evolución del área integrada, A_b/A_T para tiempos largos, de las bandas a 439, 653, 750, 806, 850 y 882 cm^{-1} (a) y 1049, 1088 cm^{-1} (b), correspondientes a los espectros IR de muestras extraídas del sistema Ti:AcacH = 3:1, durante la conformación de los soles de titanio.

Para esta suspensión vuelve a ser evidente la presencia de la banda a 806 cm^{-1} relacionada al grupo funcional Ti-OH, tal que su área integrada mantiene un valor bajo y estable hasta el final del análisis, figura 4.25(a). Las bandas a 850 y 882 cm^{-1} se pueden asociar a modos vibracionales del (C-O), bandas que presentan un valor bajo de área integrada indicando poca presencia de estos grupos funcionales en el sistema, figura 4.25(a).

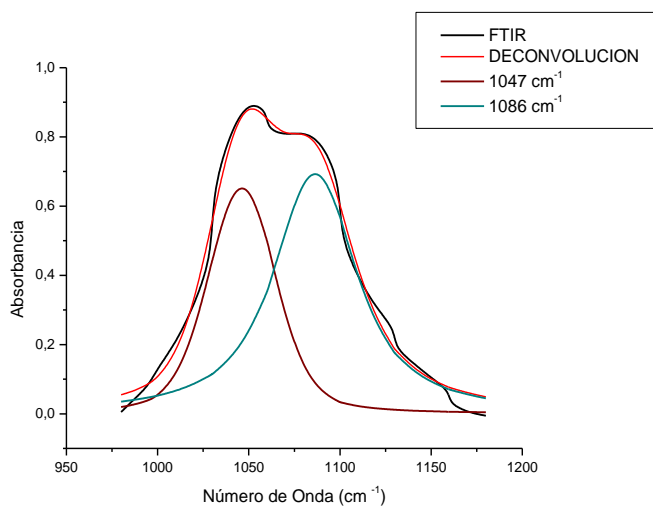
En la figura 4.26, se muestra el proceso de deconvolución de las bandas a 1049 y 1085 cm^{-1} . Estas bandas se asocian a los modos $\nu(\text{Ti-O-C})$ y la primera presentó un valor de área integrada que disminuyó con el transcurso de los días, mientras que el valor de área integrada de la banda a 1085 cm^{-1} presentó un valor alto y estable, figura 4.25(b).



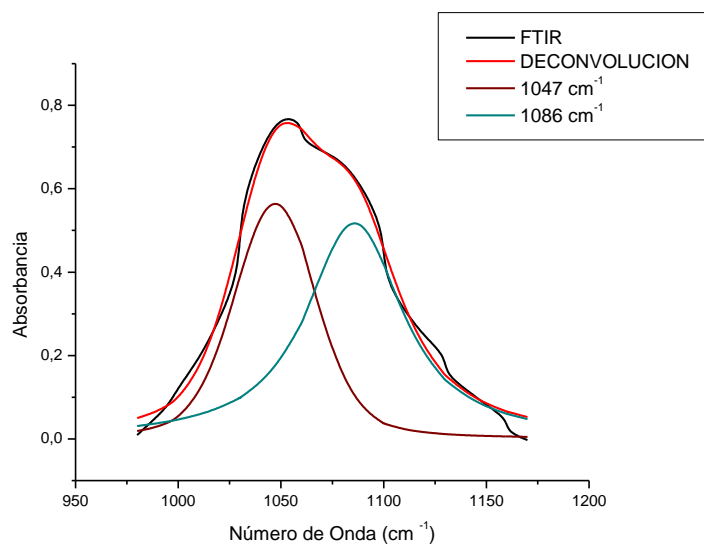
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.26. Espectros IR, en la región 1000 y 1150 cm^{-1} tiempos largos, correspondientes a la primer lectura (a), 24 horas (b), 48 horas (c), y 72 horas (d), de los soles obtenidos por el método sol-gel, sistema Ti:AcacH = 3:1.

4.2. Caracterización de los polvos obtenidos por el método sol – gel

Después de obtener los polvos cerámicos utilizando el método sol-gel estos se caracterizaron para determinar su naturaleza química, estructura cristalina, morfología, tamaño de partícula y su comportamiento frente a tratamientos térmicos. Las caracterizaciones realizadas a las muestras en polvo, se realizaron utilizando técnicas como: análisis térmico diferencial y termogravimétrico ATD/TG, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de transmisión (MET) y barrido (MEB). El material que se utilizó para estos ensayos fué el que se obtuvo después de secar la suspensión a 80°C , obtenida al final del proceso de síntesis (figura 4.10).

4.2.1 Análisis térmico

4.2.1.1. Sistema sin Acach

En la figura 4.27 se muestran las curvas de ATD/TG obtenidas para el polvo obtenido del secado del sistema sin acach. Teniendo en cuenta el análisis térmico diferencial, ATD, figura 4.27 (línea negra), se observa un pico endotérmico ancho alrededor de 100°C, que corresponde a la salida del agua adsorbida en el material. Además presenta dos picos exotérmicos: uno alrededor de 235°C que se puede asociar a la descarbonización del sistema de titanio y al inicio de la formación del oxido. El otro pico exotérmico a 390°C corresponde a la formación del oxido y a su cristalización.

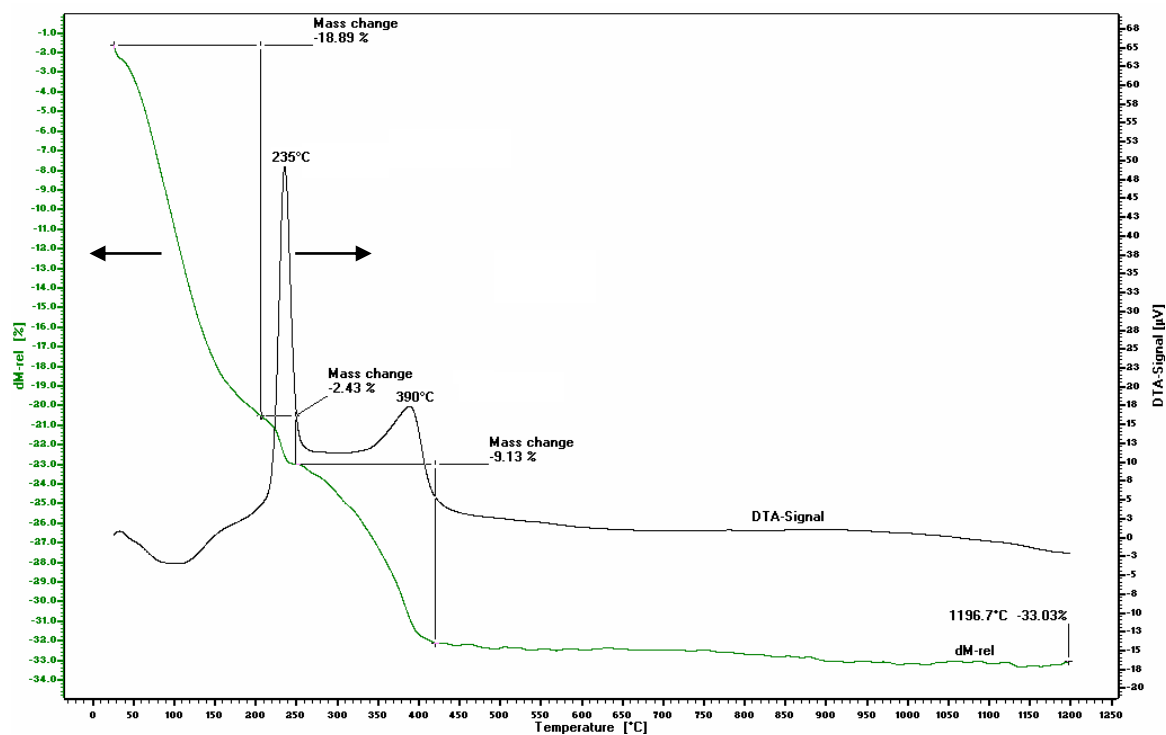


Figura 4.27. Curvas de ATD/TG correspondientes al sólido obtenido del proceso de secado del sistema sin acach.

En el termograma TG, figura 4.27 (línea verde), se observa que el peso de la muestra a 205°C se ha reducido en el 18.89%, debido a la pérdida de agua y a 420°C se observa otra pérdida de peso del 9.13 %; para temperaturas mayores a 450°C la pérdida de peso es menos evidente y tiende a mantenerse constante, obteniéndose a 1196.7°C una pérdida total de peso del material del ~33.03% con respecto al peso inicial del material.

4.2.1.2. Sistema Ti:Acach =2:1

En la figura 4.28, se muestran las curvas de ATD/TG obtenidas para el polvo cerámico obtenido al secar el sistema Ti:Acach = 2:1 básico.

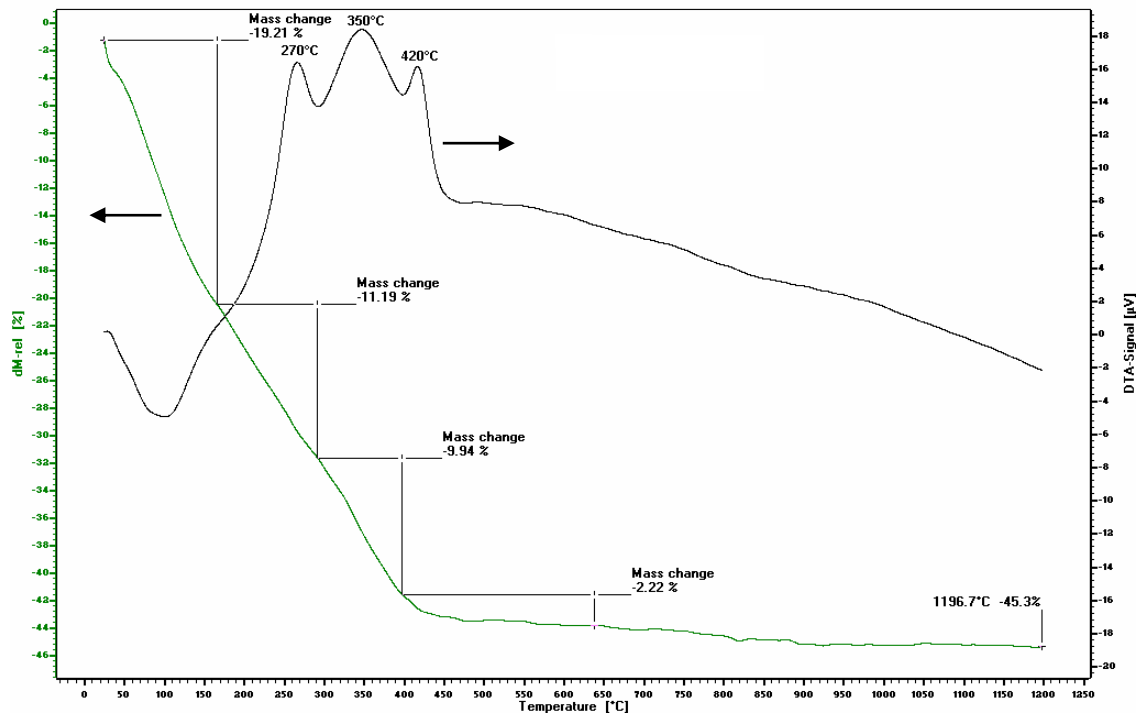


Figura 4.28. Curvas de ATD/TG correspondientes al material obtenido del proceso de secado del sistema Ti:Acach = 2:1 en medio básico.

Los resultados para este sistema pone en evidencia la presencia del acomplejante. En el análisis térmico diferencial (ATD), figura 4.28 (línea negra), se observa un pico endotérmico ancho alrededor de 100°C que debe

corresponder a la salida del agua adsorbida en el material. Se evidencia la presencia de tres picos exotérmicos: el pico a 270°C se relaciona con la oxidación de la parte orgánica del enlace titanio-butóxido mientras que el ubicado a 350°C, estaría relacionado con la descarbonización de la parte orgánica del enlace Ti-AcacH; un último pico a 420°C estaría relacionado con la formación y la cristalización del óxido de titanio.

En el termograma TG de la figura 4.28 (línea verde), se puede observar una constante pérdida de peso de la muestra; a los 170°C la muestra ya había reducido su peso en el 18.89% y a 400°C la pérdida era del 9.94% de peso. Para temperaturas mayores a 400°C, la pérdida de peso fue menos evidente tendiendo a un valor constante del peso tal que a 1196.7°C la pérdida total de peso era del ~45.3% con respecto al peso inicial de la muestra.

En las figura 4.29, se muestran las curvas de ATD/TG obtenidas para el polvo cerámico obtenido del sistema Ti:AcacH = 2:1 en medio ácido. Los resultados fueron muy similares al del sistema anterior, figura 4.27, pero se aprecia un desplazamiento de los picos exotérmicos hacia altas temperaturas.

En el análisis térmico diferencial (ATD), figura 4.29 (línea negra), nuevamente se observa el pico endotérmico ancho, alrededor de 105°C, que corresponde a la salida del agua del material. Están presentes los tres picos exotérmicos: el ubicado a 250°C relacionado con la oxidación de la parte orgánica del enlace Ti-butóxido, el pico a 360°C, relacionado con la descarbonización del enlace Ti-AcacH, por ultimo el ubicado a 500°C que indica que la cristalización del óxido ocurre a una mayor temperatura con respecto al sistema anterior.

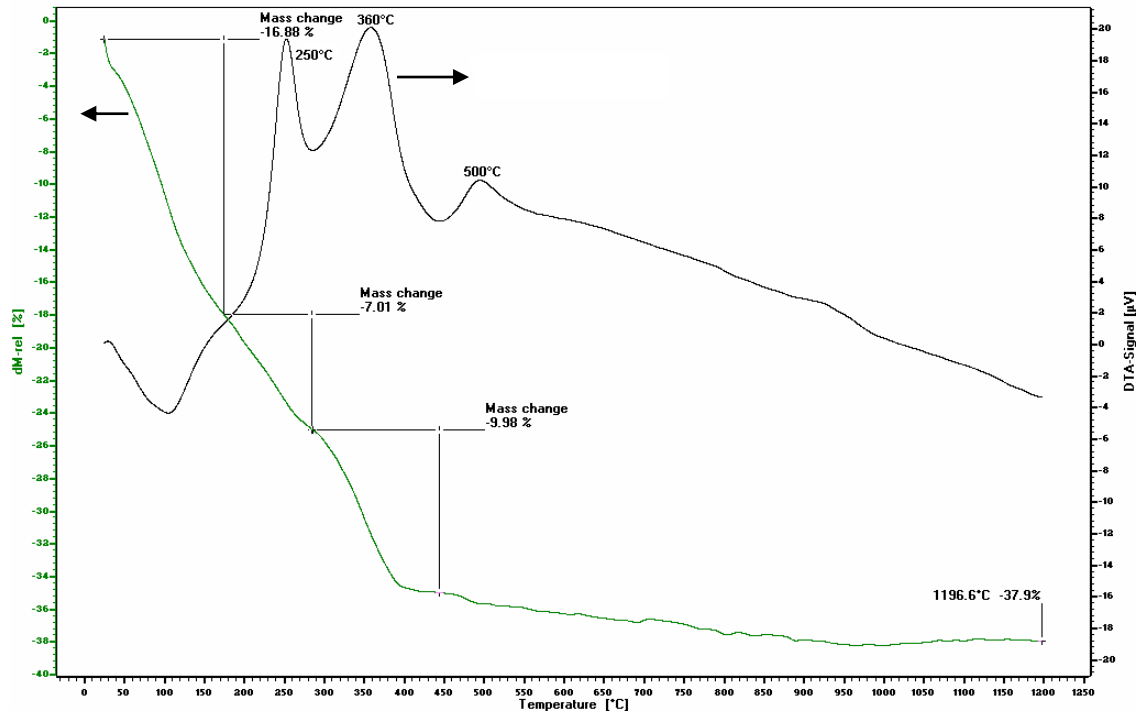


Figura 4.29. Curvas de ATD/TG para el material obtenido del proceso de secado del sistema Ti:AcacH = 2:1 medio ácido.

Además, en el termograma, figura 4.29 (línea verde), también se pudo observar una constante pérdida de peso de la muestra, alcanzando a 1196.6°C una pérdida total de peso del ~37.9% con respecto al peso inicial de la muestra.

4.2.1.3. Sistema Ti:AcacH =3:1

En las figura 4.30 se muestran las curvas de ATD/TG obtenidas para el polvo cerámico obtenido al secar el sistema Ti:AcacH = 3:1. En el análisis térmico diferencial (ATD), figura 4.29 (línea negra), también se observó un pico endotérmico ancho alrededor de 100°C.

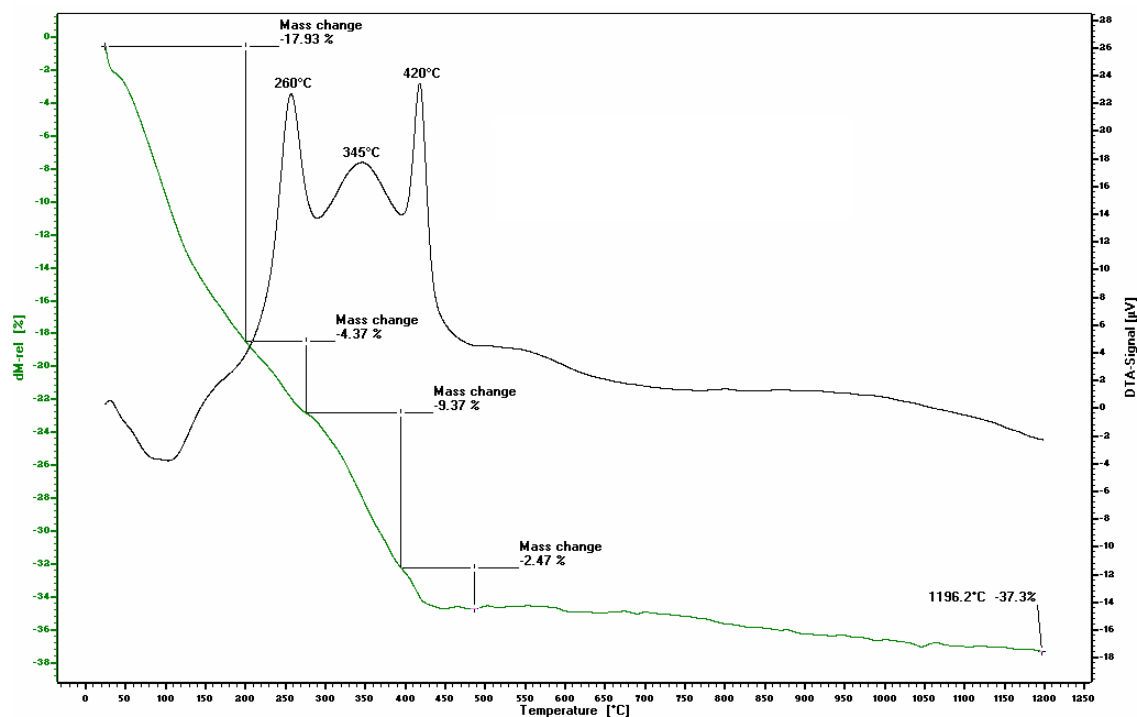


Figura 4.30. Curvas de ATD/TG para el material obtenido del proceso de secado del sistema Ti:AcacH = 3:1.

Se evidenciaron tres picos exotérmicos: a 260°C, 345°C, y a 420°C, y el pico correspondiente a la descarbonización del enlace Ti:AcacH fue menos intenso, que para el sistema 2:1, debido a que la cantidad utilizada de AcacH fue menor; la cristalización se alcanzó a la misma temperatura que en el sistema 2:1 medio básico (figura 4.28).

En este sistema el termograma (TG), figura 4.30 (línea verde), muestra grandes pérdidas de peso: del 17.93% a una temperatura de 200°C y otras de menor porcentaje, a 275°C del 4.37%, y a 400°C 9.37%. A partir de esta última temperatura, la pérdida de peso fue menos evidente y su tendencia fue a mantenerse constante.

Con base en los resultados del análisis térmico se concluyó que se podría obtener el TiO₂ a temperaturas iguales o mayores a 450°C, temperatura a partir

de la cual el peso de las muestras tienden a permanecer constante para los sistemas sin acach, 2:1 medio básico y 3:1. Para la muestra 2:1 medio ácido, la muestra adquiere un peso constante a partir de los 600°C. En la figura 4.31 se esquematiza el tratamiento térmico, a una velocidad de calentamiento lo suficientemente baja para garantizar la eliminación total de los compuestos mencionados, utilizado para obtener el TiO₂ empleado en este trabajo.

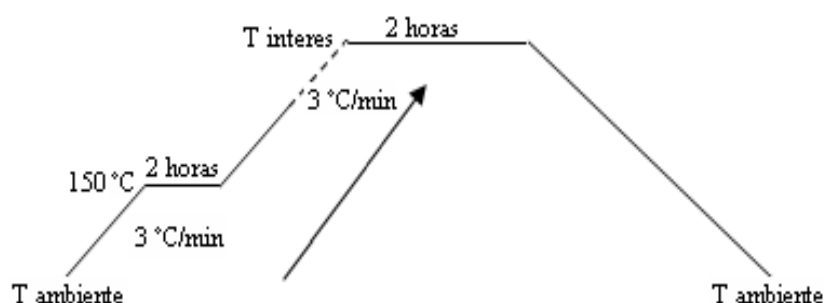


Figura 4.31. Rampa de tratamiento térmico utilizado para obtener los polvos cerámicos de TiO₂ obtenidos por el método sol-gel.

Las temperaturas de interés, para obtener el TiO₂, fueron mayores a 450°C pero para estudiar la evolución del sistema, en general, también se utilizaron temperaturas de 200, 300, 400°C. A estas temperaturas se obtuvo un polvo cerámico de color amarillo claro, muy fino, como lo demostraron las caracterizaciones microestructurales.

4.2.2. Espectroscopia Infrarroja

4.2.2.1. Espectros IR de las muestras obtenidas después del secado.

En la figura 4.32 se muestran los espectros IR del material obtenido después del secado, a 80°C, de los sistemas sin acach, 2:1 (básico), 2:1 (ácido) y 3:1, respectivamente.

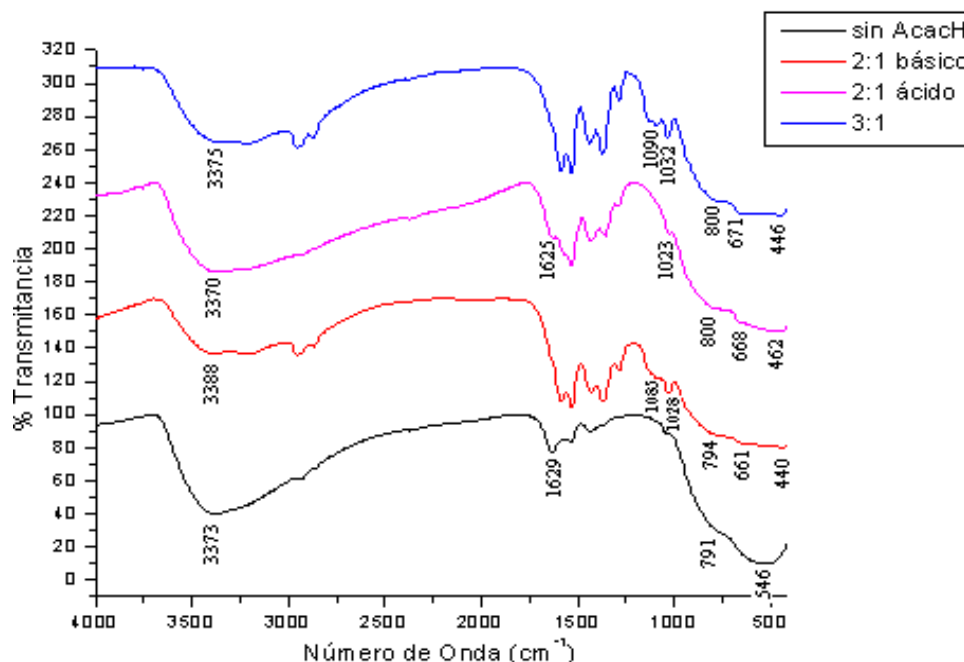


Figura 4.32. Espectros IR del material secado a 80°C de los sistemas de titanio: sin acacH, relación 2:1 medio básico, relación 2:1 medio ácido y relación 3:1, obtenidos por el método sol-gel.

En estos espectros se pueden observar bandas muy similares que corresponden a las vibraciones del agua, a $\sim 3380\text{ cm}^{-1}$, y a 1630 cm^{-1} (flexión del H-O-H).

Observando la región $1000 - 400\text{ cm}^{-1}$, en todos los espectros, esta presenta una banda ancha y sus bandas características ubicadas principalmente, a $\sim 670\text{ cm}^{-1}$, asociada al modo vibracional del enlace Ti-acacH, y $\sim 800\text{ cm}^{-1}$, relacionada al grupo funcional Ti-OH. Las bandas a ~ 1030 y 1085 cm^{-1} se asocian a los modos vibracionales del enlace $\gamma(\text{Ti-O-C})$,

4.2.2.2. Espectros IR del sistema de titanio sin AcacH

Se analizaron polvos cerámicos tratados a temperaturas de 200°C, 300°C, 400°C y 450°C por 2 horas cuyos espectros IR se muestran en la figura 4.33.

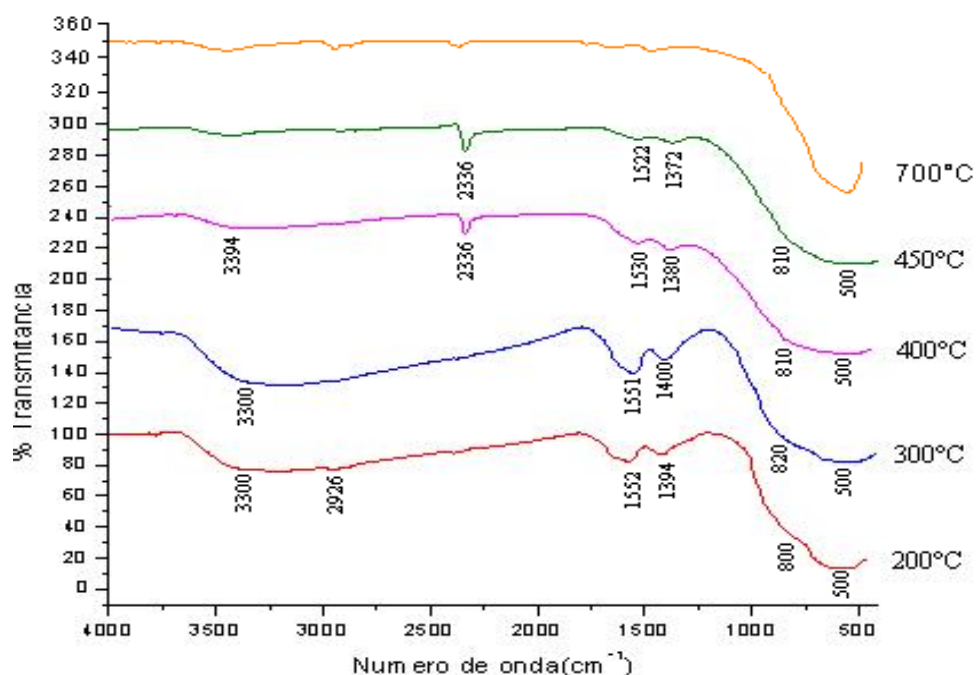


Figura 4.33. Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema sin AcacH obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas.

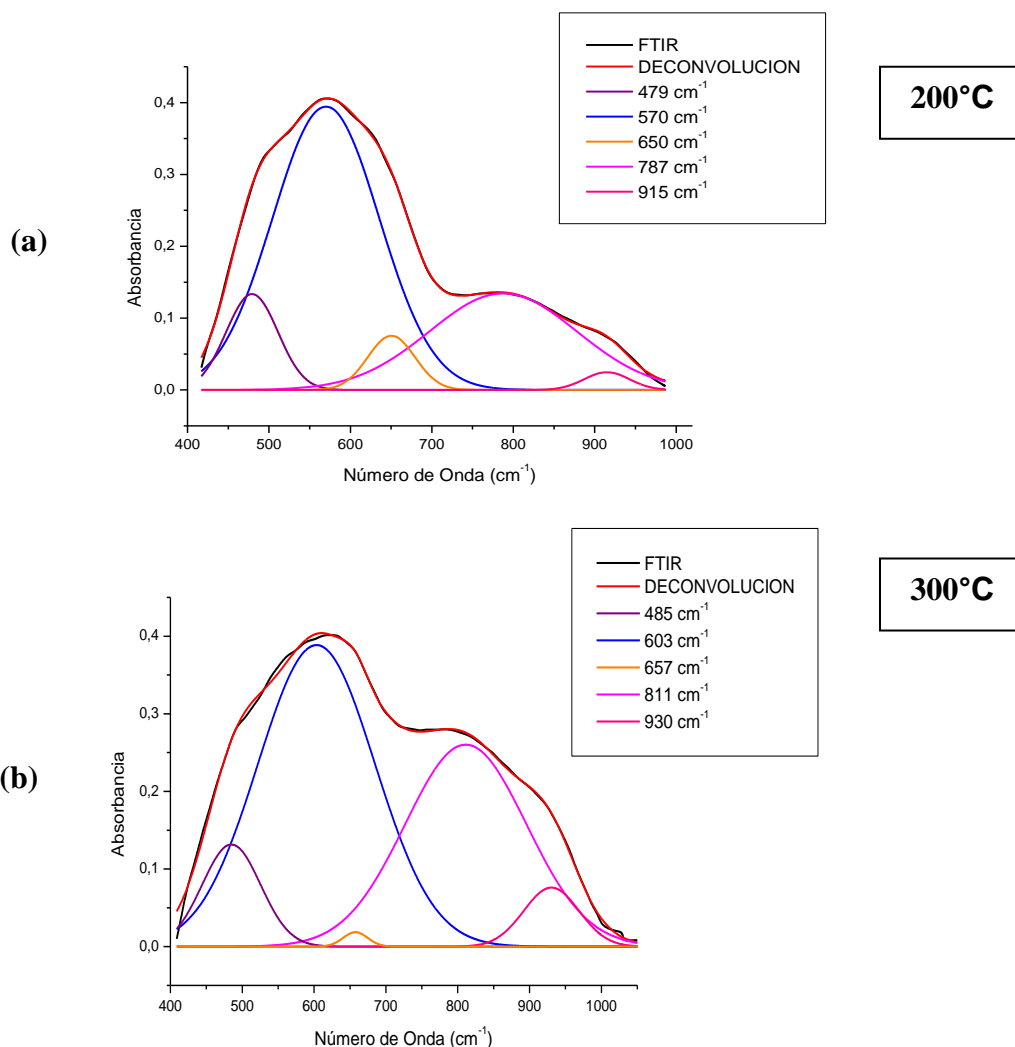
La banda ancha, típica del agua, aparece en los espectros, de las muestras tratadas a 200°C y 300°C, a $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$, y se hace cada vez menos evidente a medida que se aumenta la temperatura.

La banda alrededor de 2930 cm^{-1} , para el sólido tratado a 200°C, se puede asociar a la vibración del grupo "OH", mientras que la banda a $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ se podría asociar a la vibración de grupos orgánicos C-H residuales (J.E. Rodríguez et. al. 2002). Observando específicamente la región del espectro entre 1000 y 400 cm^{-1} , ella presenta una banda de área grande y se va definiendo a medida que se aumenta la temperatura. En todos los espectros IR de la figura 4.33 se encuentran las bandas correspondientes a las vibraciones Ti-O-Ti, a 500 cm^{-1} , Ti-O, a 600 cm^{-1} , y la característica del TBT a 800 cm^{-1} .

Con el fin de realizar un análisis más detallado de las bandas características del TiO_2 , se hizo una deconvolución a las bandas presentes entre 400 y 1000 cm^{-1} de

los espectros IR, en absorbancia (figura 4.33). La deconvolución de estos espectros se muestran en la figura 4.34. En ellos la línea negra corresponde al espectro IR experimental, las líneas de colores a las bandas fundamentales que lo compondrían, y la línea roja a la mejor aproximación del proceso de deconvolución.

Según la literatura [44], las bandas encontradas a través del proceso de deconvolución, en la región de la huella dactilar de los espectros, corresponden a las siguientes vibraciones Ti-C, Ti-O-Ti, Ti-O y Ti-OH.



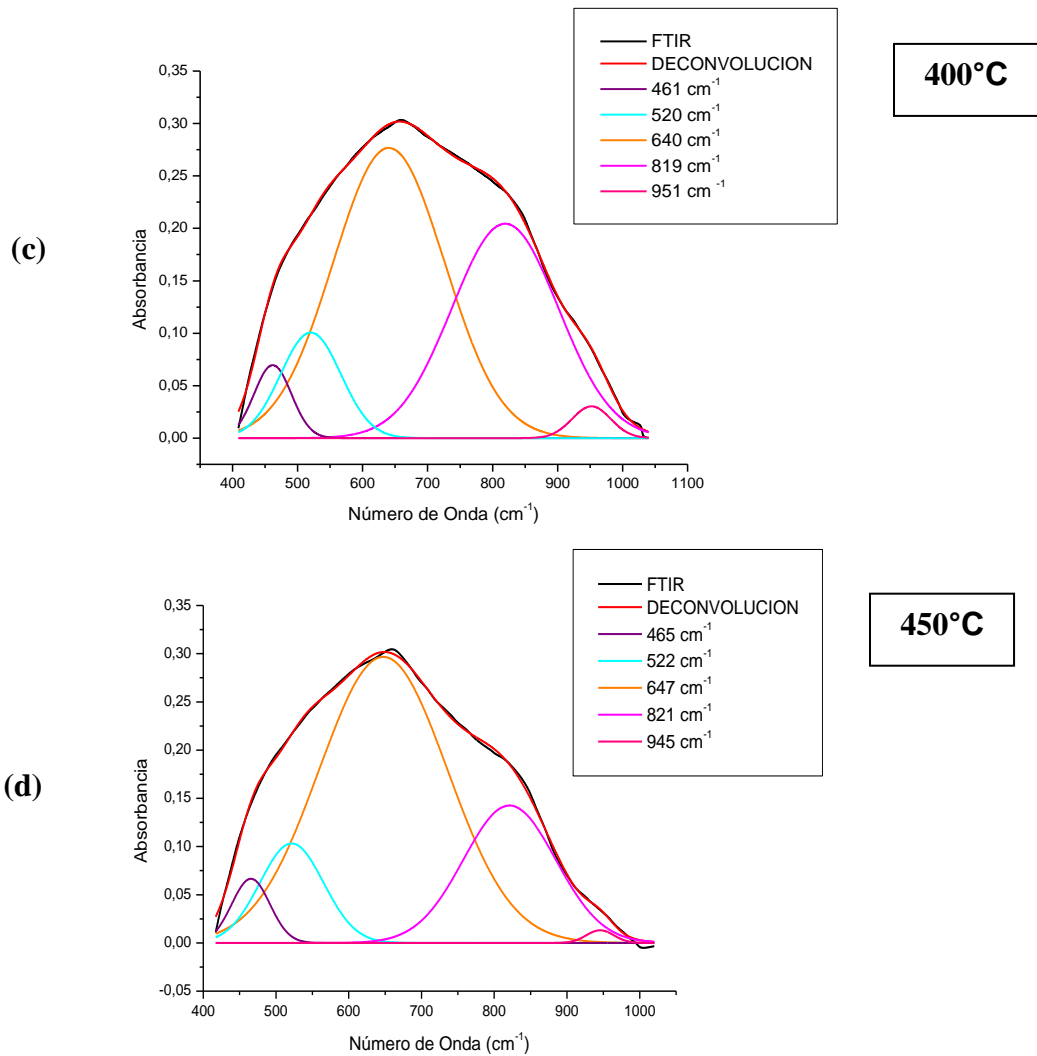


Figura 4.34. Deconvolución de los espectros IR, región de 400 a 1000 cm^{-1} , de muestras sólidas del sistema de titanio sin acach sintetizado por el método sol-gel y tratadas térmicamente por dos horas a: (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C y(d) 450°C.

En la figura 4.34 se puede observar que las bandas asociadas a las vibraciones del TiO_2 van apareciendo a medida que se aumenta la temperatura de tratamiento del sólido. Particularmente, se puede observar un desplazamiento de dichas bandas, hacia valores más altos de número de onda, al aumentar la temperatura. Además van apareciendo otras bandas, por ejemplo la ubicada a $\sim 520 \text{ cm}^{-1}$, por el desplazamiento de la banda ubicada inicialmente a $\sim 480 \text{ cm}^{-1}$,

o la ubicada a $\sim 640\text{ cm}^{-1}$ como resultado del desplazamiento de la banda inicial a $\sim 603\text{ cm}^{-1}$.

La banda ubicada a 480 cm^{-1} , figura 4.34, corresponde al enlace Ti-C y las ubicadas a 520, 522 y $\sim 650\text{ cm}^{-1}$ se pueden asociar a los enlaces formados entre el oxígeno y el titanio Ti-O-Ti (Fernández, A. Guzmán, A. 2007). A 600 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente al enlace Ti-O y a 787 cm^{-1} la del enlace C-H alcano, modo de balanceo (F, Babonneau. 1993). A partir de 300°C aparece una banda a $\sim 800\text{ cm}^{-1}$ característica del TBT, la banda ubicada a 955 cm^{-1} se podría asociar a los modos $\nu(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$.

4.2.2.3. Espectros IR del sistema de titanio 2:1

En la figura 4.35 se muestran los espectros IR correspondientes a polvos cerámicos del sistema de titanio 2:1, tratadas a diferentes temperaturas por 2 horas.

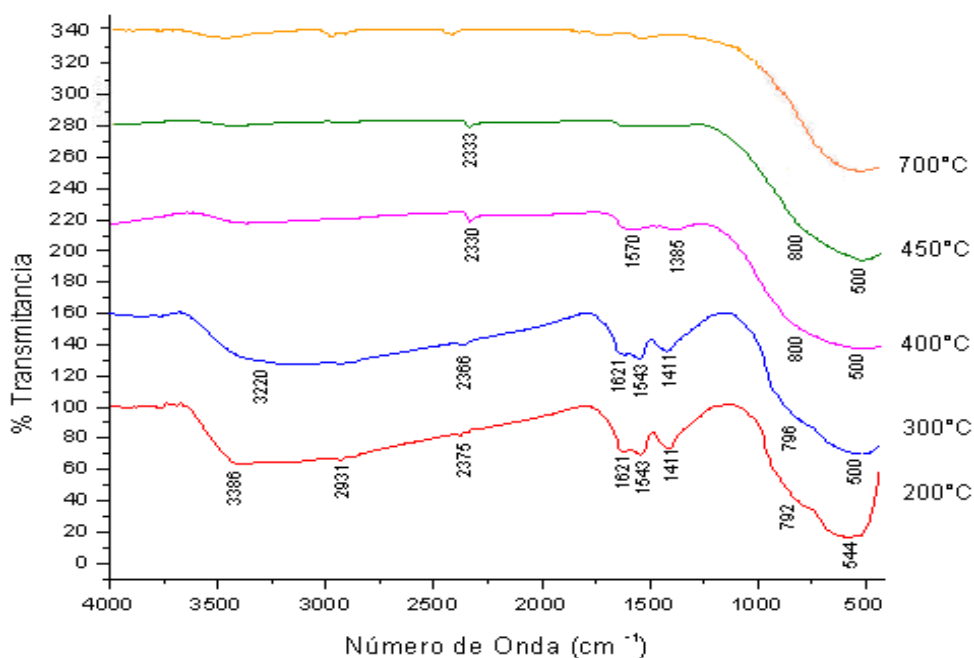
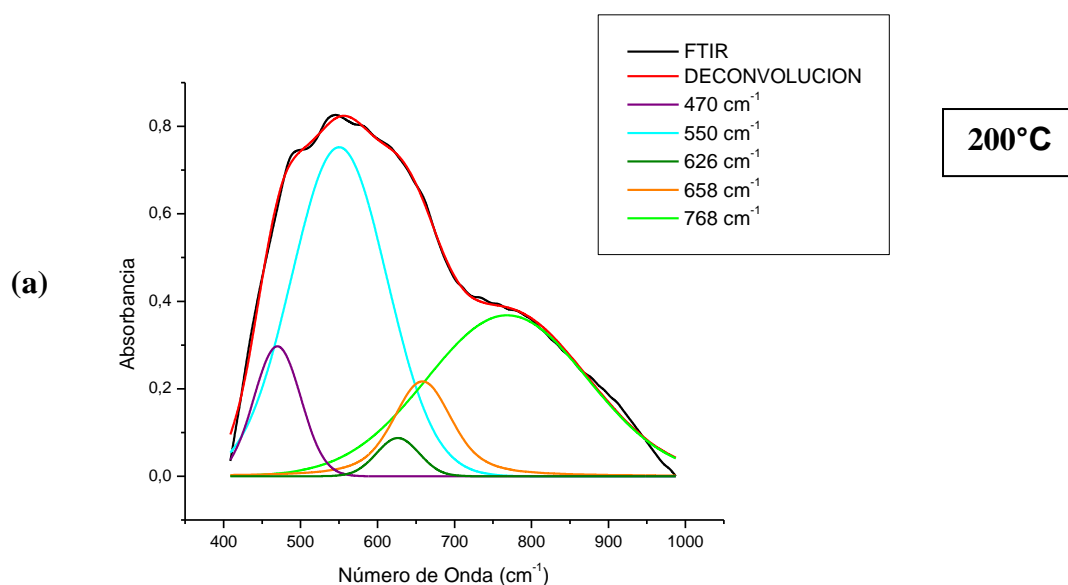


Figura 4.35. Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema de titanio 2:1 obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas.

En estos espectros IR, figura 4.35, son nuevamente evidentes las bandas del agua, a $\sim 3386\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1630\text{ cm}^{-1}$, además de la banda a 2930 cm^{-1} , a la temperatura de 200°C , que se puede asociar al grupo funcional C-H. Las bandas a 544 cm^{-1} y 792 cm^{-1} , en el espectro IR de la muestra tratada a 200°C , a 500 cm^{-1} y 796 cm^{-1} , en el espectro IR de la de 300°C , y las situadas a 500 cm^{-1} y 800 cm^{-1} , en los espectros IR de muestras a 400°C y 450°C , se pueden asociar a las vibraciones del óxido de titanio (F, Babonneau. 1993).

Para obtener una información más detallada de cada uno de los espectros IR, se realizó la deconvolución en la zona del espectro, entre 400 a 1000 cm^{-1} , correspondiente a la huella digital del material. Los resultados se muestran en la figura 4.36.



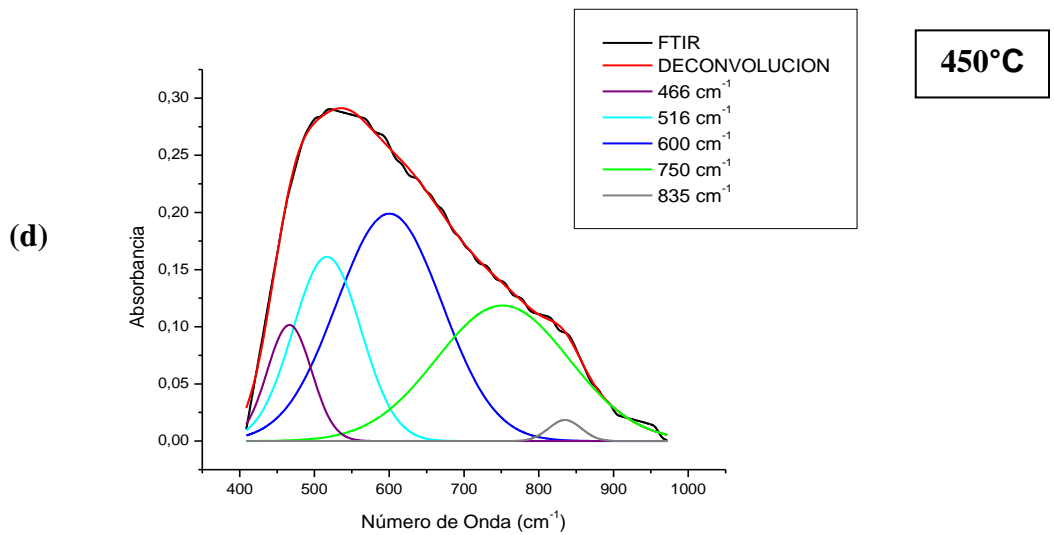
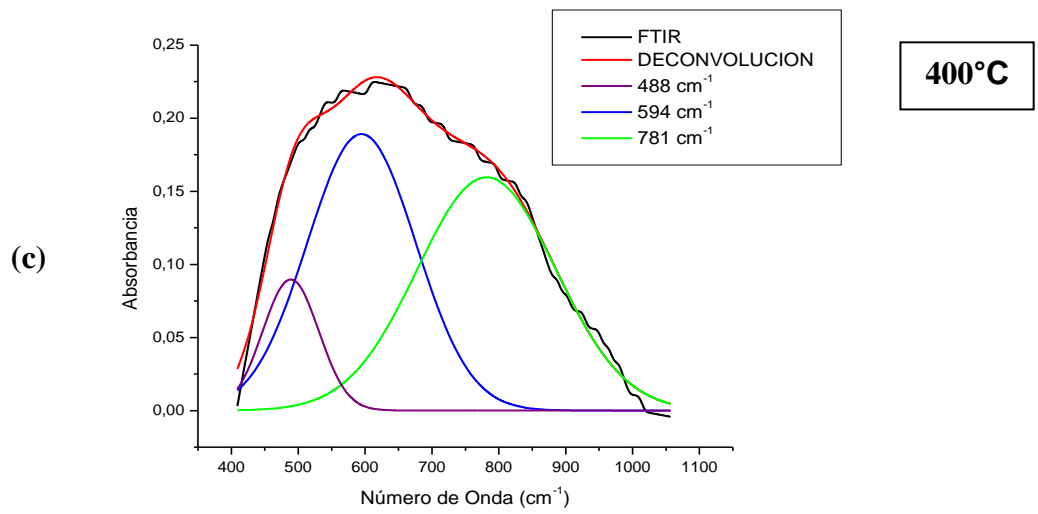
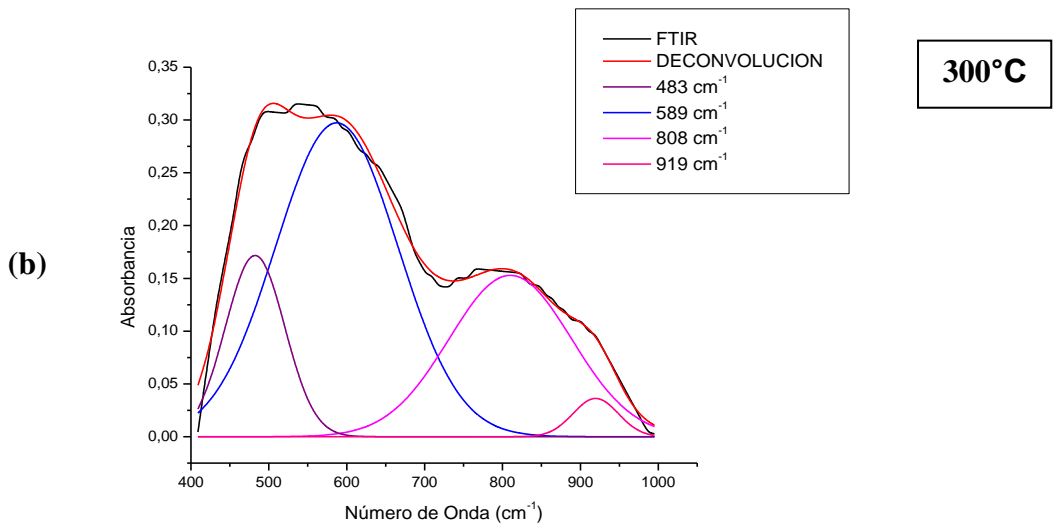


Figura 4.36. Deconvolución de los espectros IR, región entre 400 a 1000 cm^{-1} , de sólidos del sistema de titanio 2:1, sintetizado por el método sol-gel y tratadas térmicamente por dos horas a temperaturas de: (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C y(d) 450°C.

En estos espectros IR se observan las vibraciones del Ti-C, a 480 cm^{-1} en los espectros de 250°C a 400°C; además se observan las vibraciones del Ti-O-Ti, asignadas a las bandas entre 500- 550 cm^{-1} (Fernández, A. Guzmán, A. 2007). La banda del Ti-O se encuentra situada a 590 cm^{-1} y las bandas a 626 cm^{-1} , 658 cm^{-1} y 920 cm^{-1} se pueden asociar a modos vibracionales del enlace Ti-Acach. La banda característica del TBT se encuentra ubicada a 808 cm^{-1} (figura 4.36).

4.2.2.4. Espectros de IR del sistema de titanio 3:1

En la figura 4.37 se muestran los espectros IR correspondientes a polvos cerámicos del sistema de titanio 3:1, tratadas térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas.

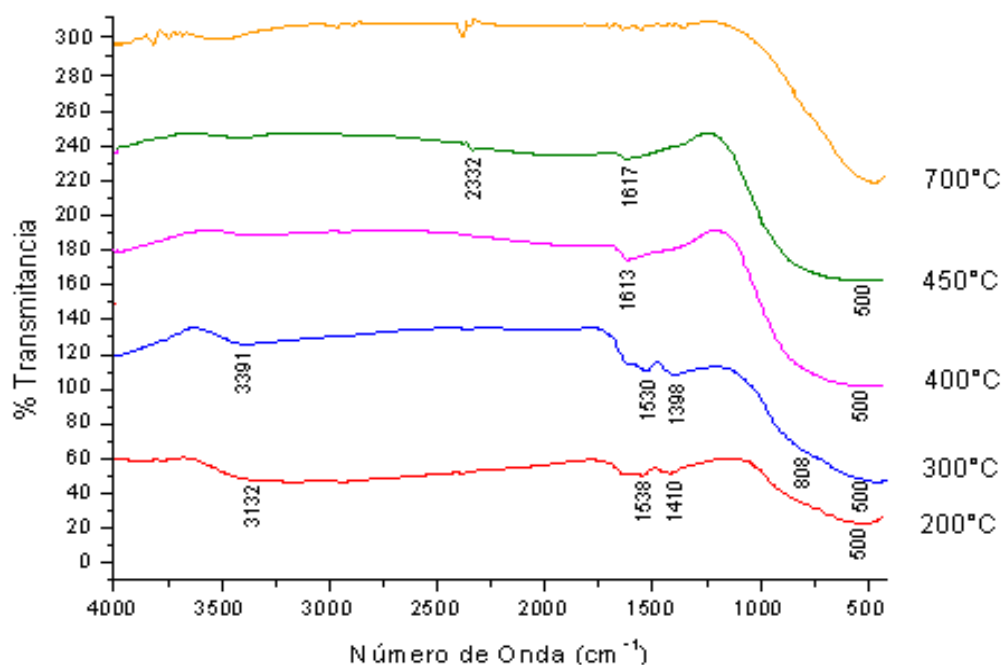
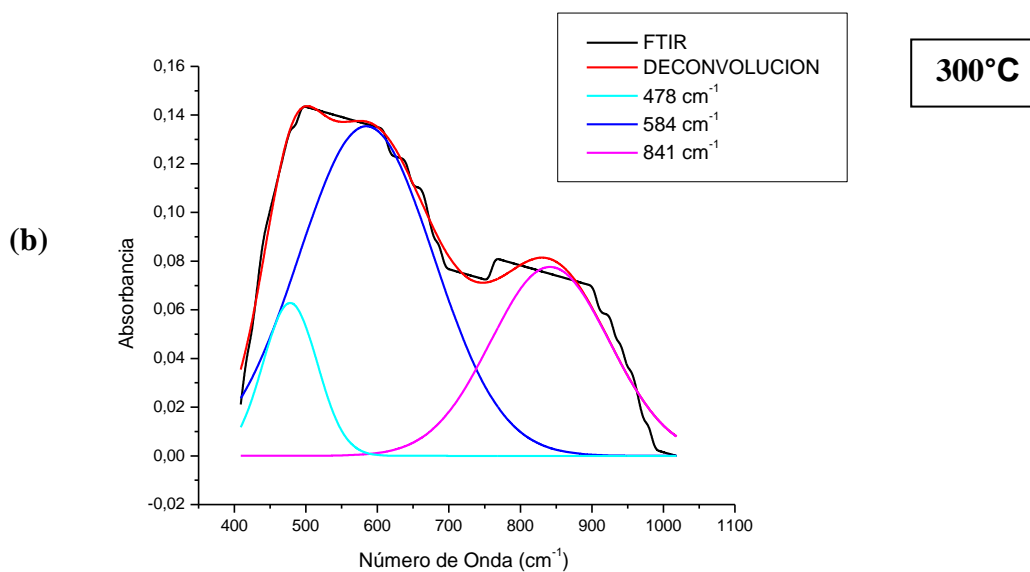
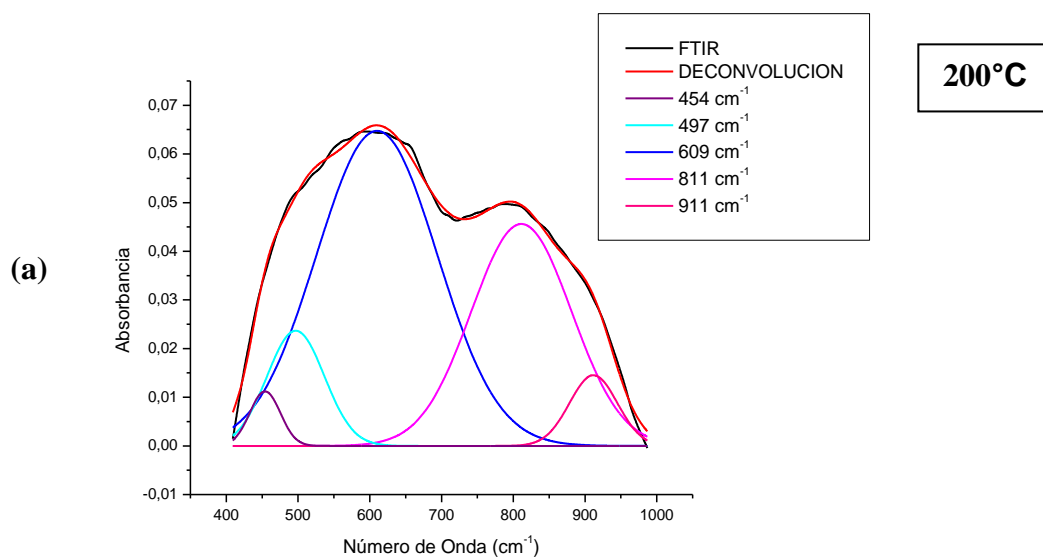


Figura 4.37. Espectros IR correspondientes a sólidos del sistema de titanio 3:1 obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por dos horas.

En la figura 4.38 se muestran los resultados del proceso de deconvolución realizado a los espectros IR de la figura 4.37, en la región 400 a 1000 cm^{-1} correspondiente a la huella digital del material.



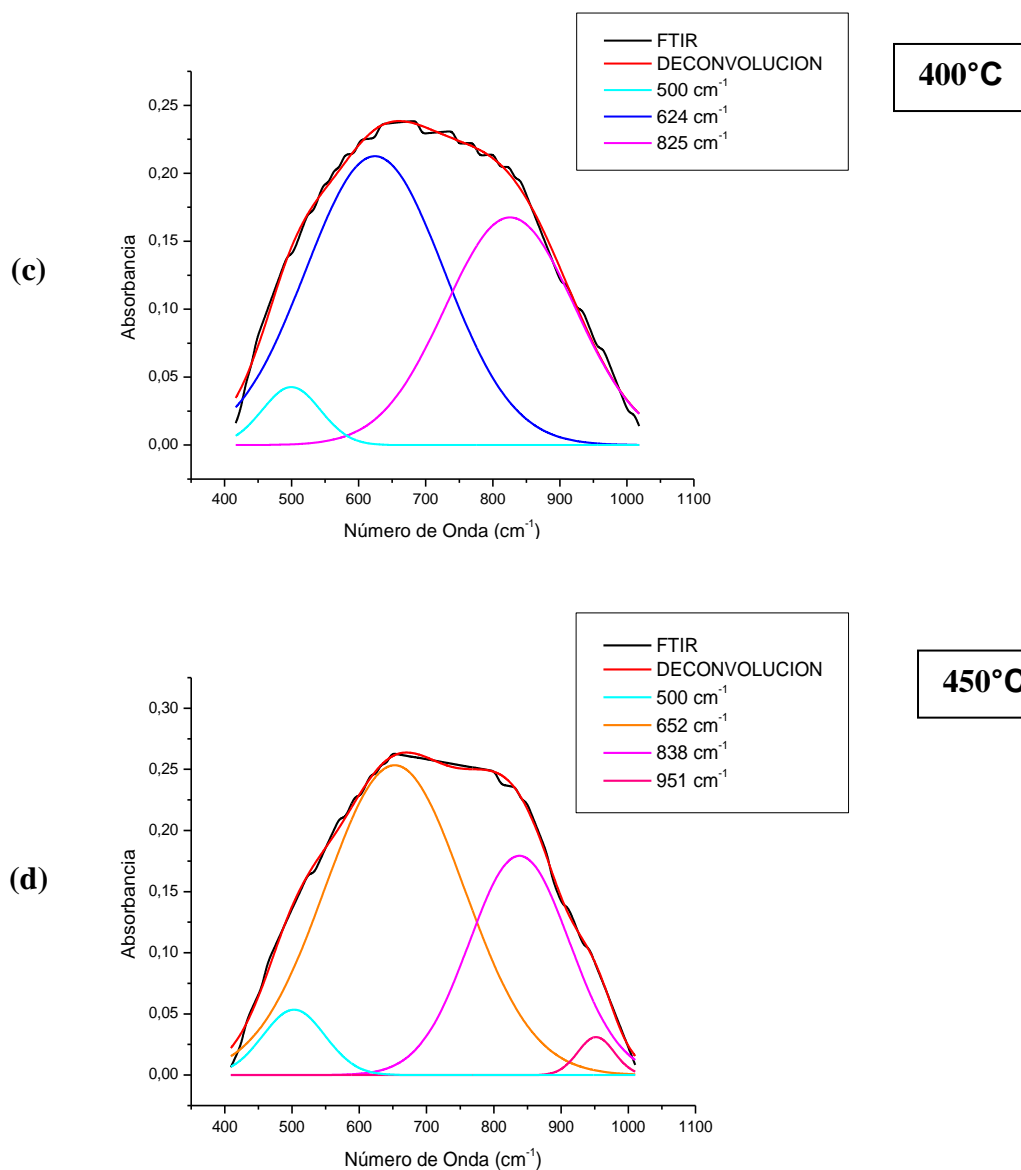


Figura 4.38. Deconvolución de los espectros IR, región de 400 a 1000 cm^{-1} , correspondiente a sólidos del sistema de titanio 3:1, sintetizado por el método sol-gel, y tratadas térmicamente por dos horas a temperaturas de: (a) 200°C, (b) 300°C, (c) 400°C y(d) 450°C.

En estos espectros se observan principalmente las bandas asociadas a las vibraciones del TiO_2 (Ti-C, Ti-O-Ti, Ti-O). Las vibraciones del Ti-C se observan a 478 cm^{-1} , las vibraciones del Ti-O-Ti se ubican a 500 cm^{-1} , y la del enlace Ti-O asignadas a las bandas entre 584-609 cm^{-1} . Aunque este sistema tiene una concentración menor de acomplejante, con relación al sistema anterior, también

se pueden apreciar las bandas correspondientes a los modos vibracionales del enlace Ti-AcacH a 624 cm^{-1} , 652 cm^{-1} , 911 cm^{-1} y 951 cm^{-1} .

4.2.3. Difracción de rayos X

4.2.3.1. Difractogramas del material obtenido del secado

A continuación se muestran los difractogramas de rayos X correspondientes a sólidos de los sistemas de titanio sin acacH, sistemas 2:1 y sistemas 3:1.

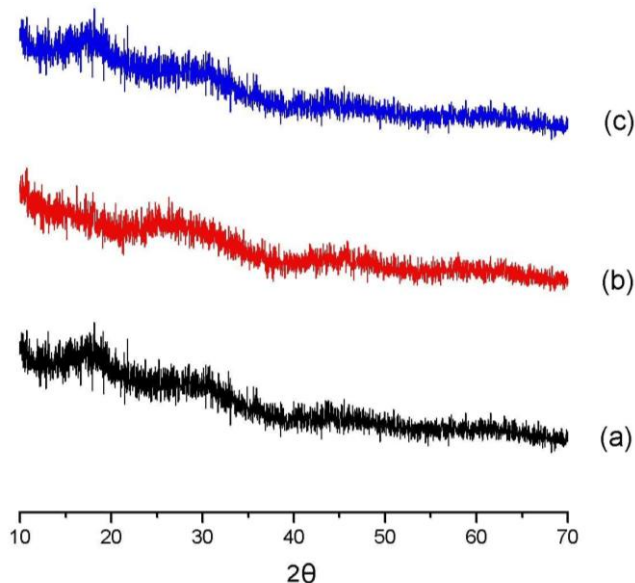


Figura 4.39. Difractogramas de rayos X de las muestras sólidas secadas a $80^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ de los sistemas de titanio: (a) sin acacH, (b) Ti:AcacH = 2:1 y (c) Ti:AcacH = 3:1.

En los difractogramas de rayos X de la figura 4.39 se puede observar que el material secado, a 80°C , era amorfo, independientemente del sistema. Esto está totalmente en concordancia con los resultados de FTIR, figura 4.32, donde hay una alta cantidad de fase orgánica tal como lo indican las bandas que aparecen en estos espectros, lo que no favorece la presencia de fases cristalinas en el material.

4.2.3.2. Difractogramas de las muestras del sistema de titanio sin Acach

Los sólidos obtenidos, al secar las muestras a 80°C, fueron sometidos a tratamientos térmicos definidos con base en los resultados del análisis térmico previamente realizado (figuras 4.27 a 4.30); las temperaturas utilizadas para el tratamiento fueron: 350°C, 450°C y 500°C durante 2 horas.

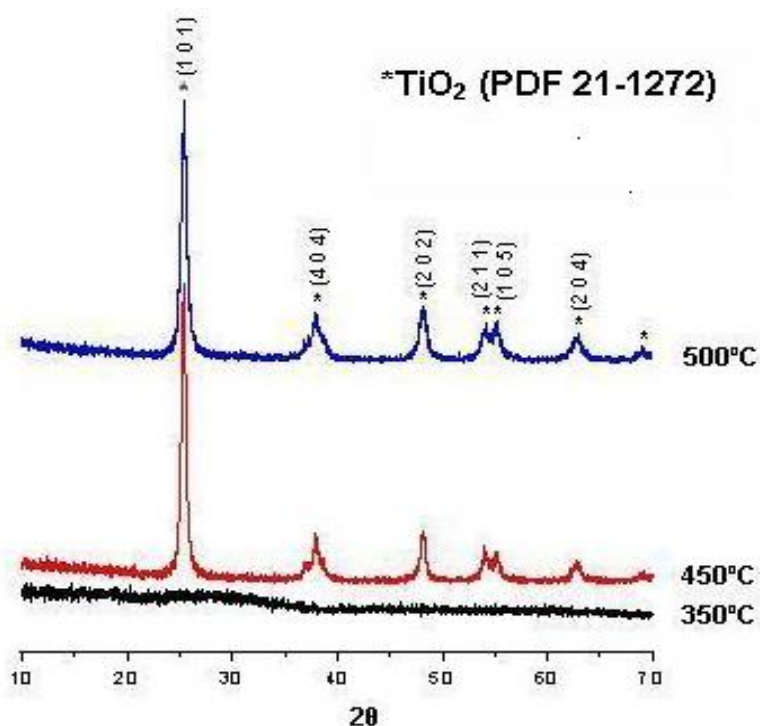


Figura 4.40. Difractogramas de rayos X correspondientes a los sólidos del sistema de titanio sin acach, obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas.

En la figura 4.40 se muestran los difractogramas de rayos X correspondientes a sólidos del sistema de titanio, sin acomplexante, ellos indican que los sólidos eran amorfos, aún a una temperatura de 350°C. Al tratar la muestra a 450°C se logró su cristalización obteniéndose como fase cristalina principal TiO₂ anatasa (PDF 21-1272); la muestra tratada a 500°C, durante 2 horas, siguió presentando el TiO₂ fase anatasa como principal fase cristalina.

4.2.3.3. Difractogramas de las muestras del sistema de titanio 2:1

En la figura 4.41 se muestran los difractogramas de rayos X del polvo cerámico que contiene acomplejante, en una relación 2:1, y que fue tratado térmicamente a 350°C, 450°C y 500°C por 2 horas. Estos difractogramas indican que al tratar el sólido a 350°C, su estructura es amorfa y que al hacerlo a 450°C cristalizó el sólido obteniéndose como principal fase cristalina el TiO₂ anatasa. Igual que para el caso anterior, la muestra tratada a 500°C, durante 2 horas, presentó como principal fase cristalina el TiO₂-anatasa (PDF 21-1272).

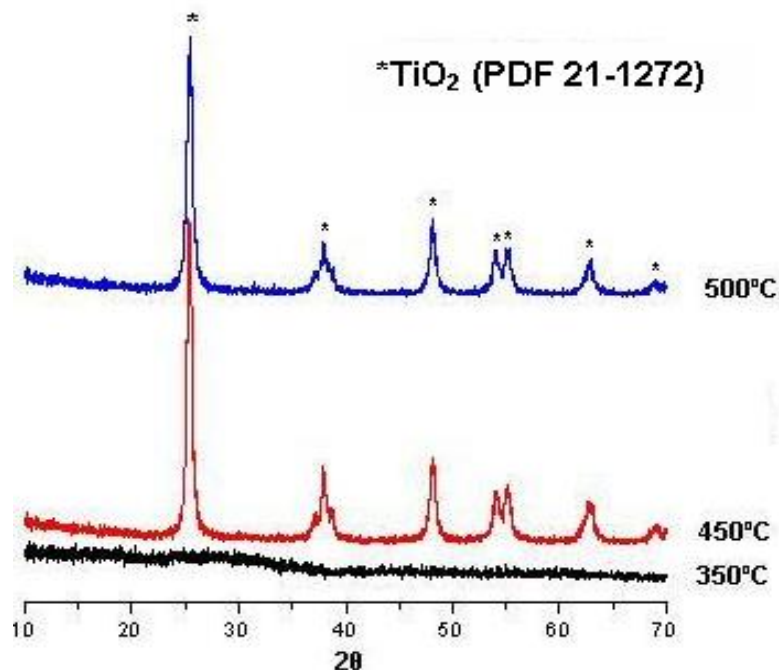


Figura 4.41. Difractogramas de rayos X de los sólidos del sistema de titanio 2:1, obtenidos por sol-gel y tratados térmicamente a diferentes temperaturas por 2 horas.

4.2.3.4. Difractogramas de las muestras del sistema de titanio 3:1

El difractograma de rayos X de la figura 4.42, correspondiente al sólido obtenido de un sistema con acomplejante (relación 3:1) y tratado térmicamente a 450°C

durante 2 horas, presentó como fase cristalina principal el TiO_2 – anatasa (PDF 21-1272).

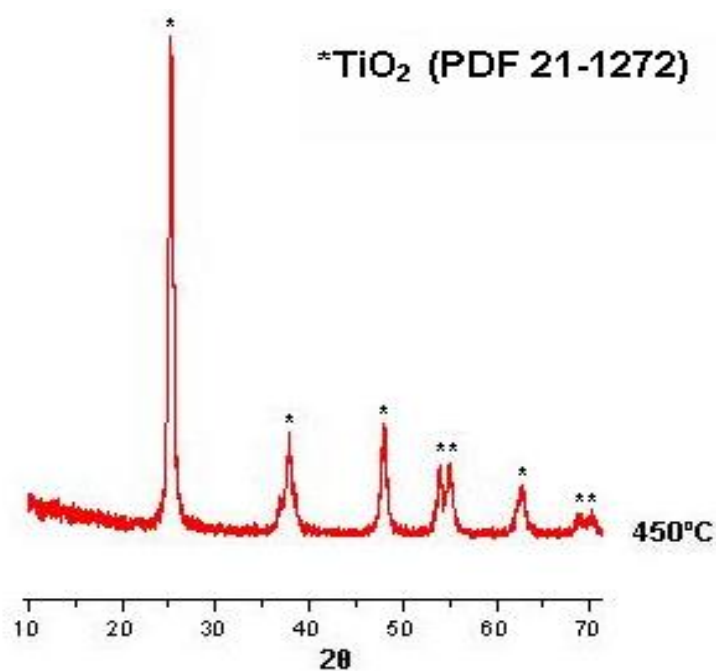


Figura 4.42. Difractograma de rayos X correspondiente al sólido del sistema de titanio 3:1 obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/ 2h.

4.2.4. Microscopia Electrónica de Transmisión

4.2.4.1. Fotografías MET de muestras del sistema de titanio sin Acach

En la figura 4.43, se muestran las fotografías tomadas con MET del polvo cerámico sintetizado por sol-gel, sistema sin Acach, tratado a 100°C, 450°C y 700°C, durante 2 horas.

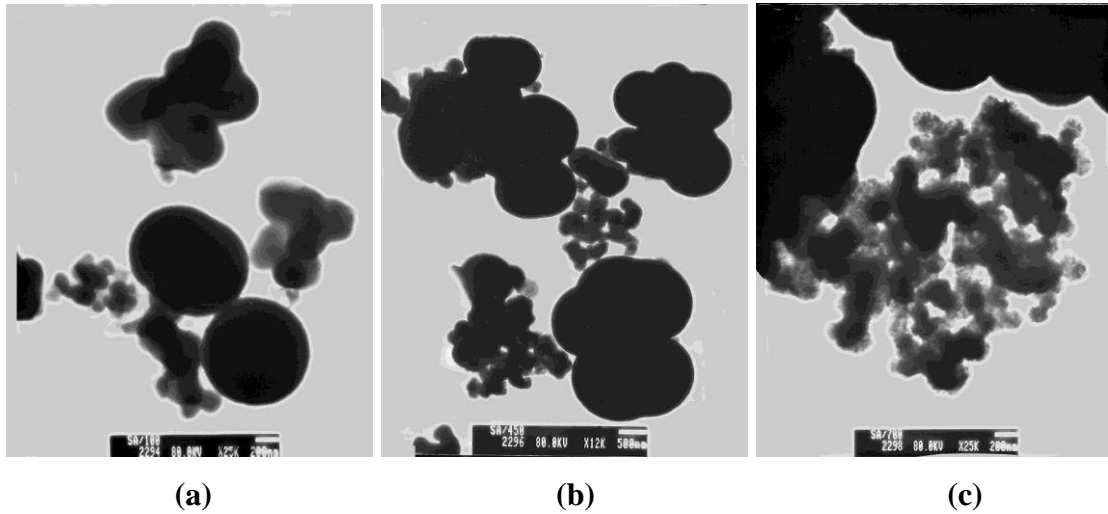


Figura 4.43. Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, del sistema sin AcacH, obtenido por el método sol-gel y tratado térmicamente a: (a) 100°C; (b) 450°C/2h y (c) 700°C /2h.

En las fotografías de la figura 4.43 se observan partículas con formas esferoidales, con un tamaño promedio de 100 nm y otras que superan los 500 nm de diámetro. Se puede apreciar que, a medida que se aumenta la temperatura a la que es tratada la muestra, las partículas se iban uniendo, formando cuellos entre ellas, generando partículas de mayor tamaño, figura 4.43(a) y 4.43(b), favoreciendo la sinterización de las partículas primarias. En la figura 4.43(c) se observan partículas esféricas irregulares de alrededor de ~ 100 nm que podrían estar relacionadas con la presencia de una nueva fase cristalina en el sólido, fase rutilo.

4.2.4.2. Fotografías MET de muestras del sistema de titanio 2:1

En la figura 4.44 se observan las fotografías tomadas con MET de muestras sólidas del sistema Ti:AcacH=2:1. En este sistema se encuentran partículas con forma irregular y bordes agudos, con un tamaño mayor a 200 nm; el tamaño de partícula se redujo en comparación con el sistema anterior. Al incrementar la temperatura se observó la formación de aglomerados de alrededor de 700 nm.

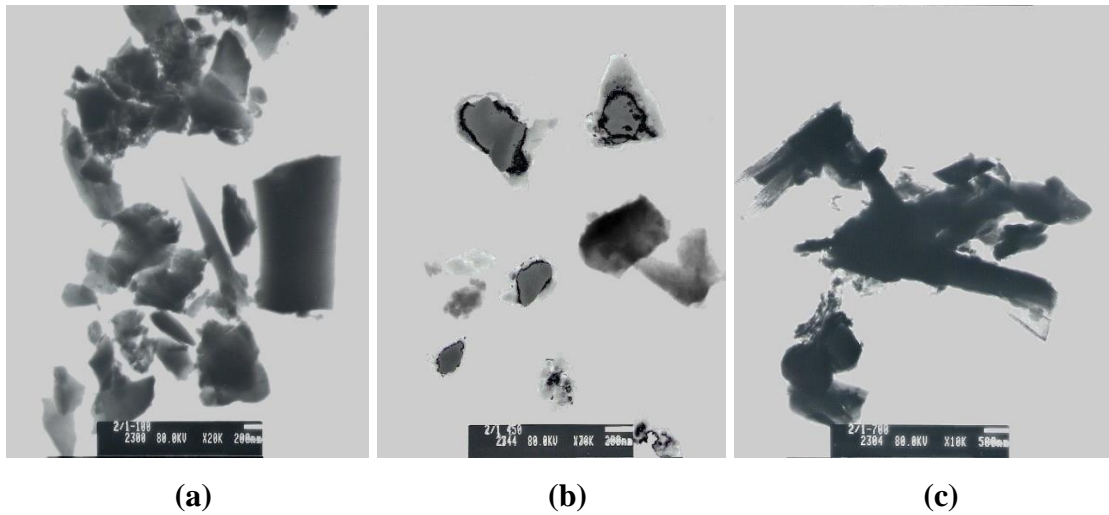


Figura 4.44. Fotografías tomadas con MET del material en polvo obtenido del sistema de titanio 2:1 sintetizado por sol-gel y tratado a: (a) 100°C; (b) 450°C/2h y (c) 700°C/2h.

4.2.4.3. Fotografías MET de muestras del sistema de titanio 3:1

En la figura 4.45 se observan las fotografías de muestras del sistema Ti:AcacH=3:1. En la figura 4.44(a) se ven partículas de forma irregular, con tamaños superiores a los 100nm. Por otro lado, las figuras 4.44(b) y 4.44(c) muestran que a medida que la temperatura se aumentaba, se formaron aglomerados que contenían partículas pequeñas, con forma irregular, de un tamaño aproximado de 10nm.

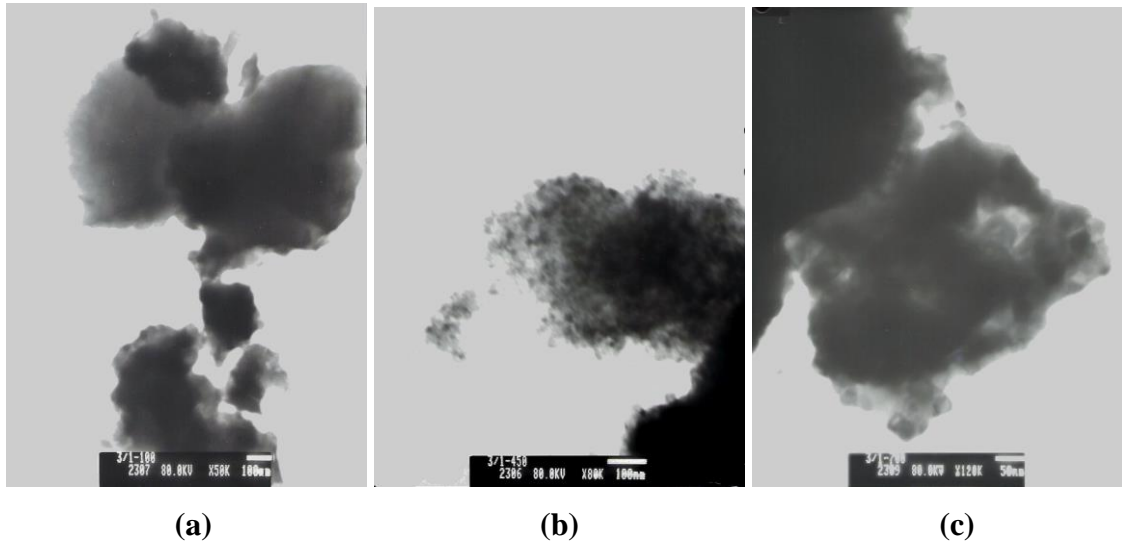


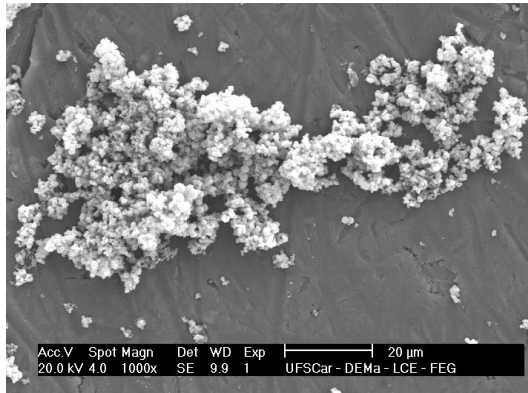
Figura 4.45. Fotografías obtenidas con MET de material en polvo, del sistema de titanio 3:1, obtenido por sol-gel y tratado a: (a) 100°C; (b) 450°C/2h y (c) 700°C/2h.

4.2.5. Microscopia Electrónica de Barrido

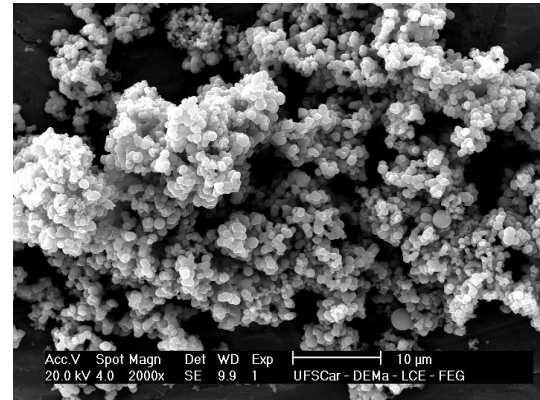
4.2.5.1. Fotografías obtenidas con MEB de muestras sólidas del sistema de titanio sin AcacH y sistema 2:1

En las figuras 4.46 y 4.47 se muestran las fotografías obtenidas con MEB de sólidos del sistema sin AcacH y sistema 2:1, respectivamente, tratadas a 450°C por 2 horas. En ellas se observó la presencia de aglomerados mayores a 10 μm , compuesta de partículas menores a 1 μm .

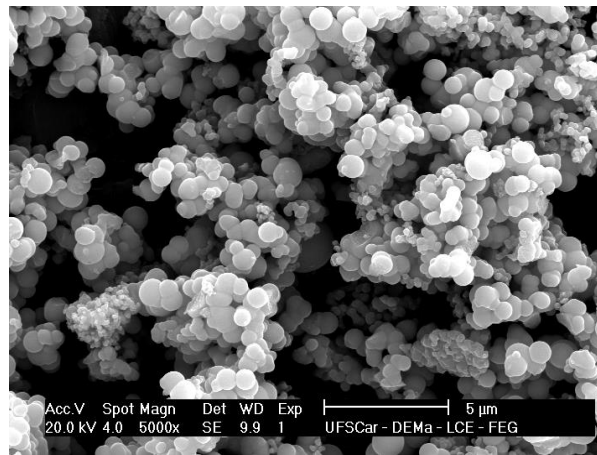
Comparando las partículas obtenidas en los dos sistemas, se puede observar que la presencia del acomplejante, figura 4.47, reduce un poco la formación de aglomerados; en el sistema sin AcacH, figura 4.46, se obtuvieron aglomerados de gran tamaño.



(a)

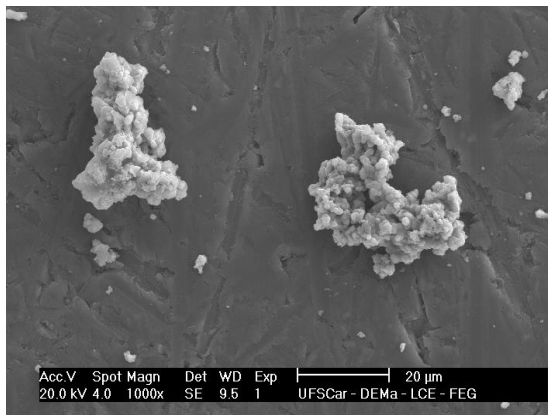


(b)

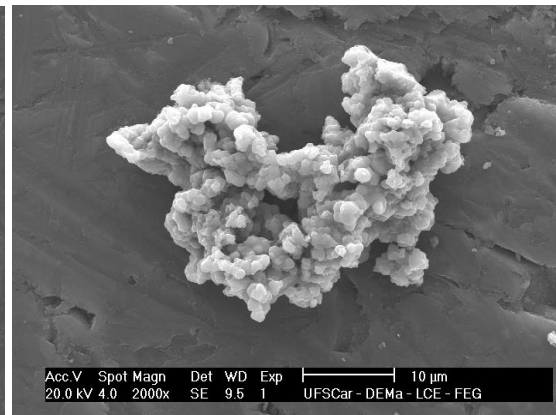


(c)

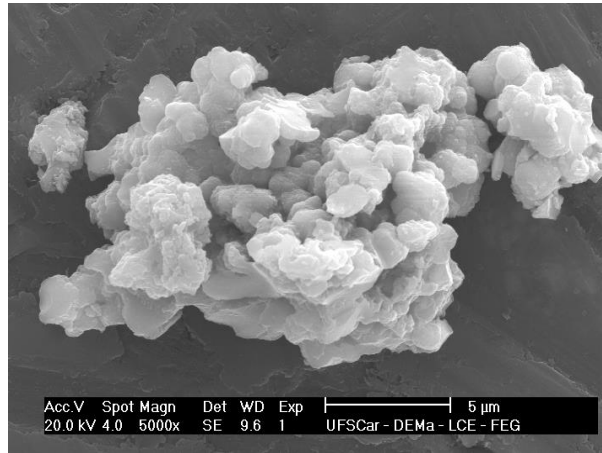
Figura 4.46. Fotografías obtenidas con MEB del sólido del sistema de titanio sin Acach obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/2h [aumentos (a) 1000X, (b) 2000X y (c) 5000X].



(a)



(b)



(c)

Figura 4.47. Fotografías obtenidas con MEB del sólido del sistema de titanio 2:1 obtenido por sol-gel y tratado térmicamente a 450 °C/2h [aumentos (a) 1000X, (b) 2000X y (c) 5000X].

CAPÍTULO 5

SÍNTESIS DE TiO₂ POR EL MÉTODO PECHINI

En una de las etapas del método Pechini se obtiene una resina polimérica donde se encuentran inmersos los cationes de interés. En la figura 5.1 se ilustra la evolución de la formación de la resina en cada instante del proceso. En estas fotografías se puede observar que la solución de partida, figura 5.1(c), es totalmente transparente y homogénea, y va sufriendo cambios apreciables a simple vista, tanto en el color como en viscosidad, hasta que se forma la resina, figura 5.1(j). Finalmente, la resina se calcinó a una temperatura de 250 °C por 24 horas y se obtuvo el material de partida para realizar las siguientes etapas del proyecto, figura 5.2.



(a)



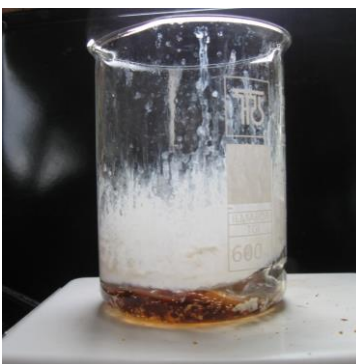
(b)



(c)



(d)



(e)



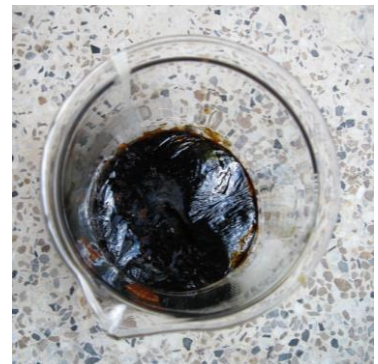
(f)



(g)



(h)



(i)



(i)

Figura 5.1. Fotografías que ilustran de la evolución y formación de la resina polimérica durante el desarrollo del proceso Pechini.



Figura 5.2. Material pre-calcinado que se obtuvo durante el desarrollo del proceso Pechini.

5.1. Caracterización de los polvos obtenidos por el método Pechini

El material pre-calcinado, obtenido durante el desarrollo del proceso Pechini (figura 5.2), se caracterizó utilizando diferentes técnicas y los resultados se indican a continuación.

5.1.1. Análisis térmico: curvas de ATD/TG

Los polvos cerámicos obtenidos por el método pechini presentaron la particularidad de tener gran cantidad de material orgánico ya que en este método se utilizaron tanto ácidos carboxílicos como alcoholes polivinílicos, que favorecieron la formación de la resina polimérica, que son compuestos orgánicos.

En la figura 5.3, se muestran las curvas de ATD/TG obtenidas para el sólido pre-calcinado. Observando los resultados de ATD, figura 5.3, se ve un pico endotérmico, ancho alrededor de 85°C, que corresponde a la pérdida de agua absorbida en las muestras. Además, se aprecia un “hombro” endotérmico a 260°C asociado a la volatilización de otros compuestos como el amoniaco. En esta curva son evidentes cuatro picos exotérmicos. El primero de ellos, a ~ 355°C, que puede estar relacionado con la formación de un oxicarbonato de titanio, no estable, que a 460°C, segundo pico exotérmico, se oxidaría para dar origen a un compuesto intermedio. El pico exotérmico a 540°C estaría relacionado con la descomposición de este compuesto intermedio que a 660°C cristaliza como óxido.

Por otro lado, en la curva TG (figura 5.3), se observa una pérdida de peso del ~7.5%, entre temperatura ambiente y 190°C, que se puede asociar a la eliminación del agua absorbida en el material. Entre 190°C y 360°C se observa una pérdida de peso, del ~15.5%, que se puede deber a la eliminación de

compuestos volátiles, como el amonio, y entre esta temperatura y 500°C se aprecia otra pérdida de peso de $\sim 37\%$ que correspondería, principalmente, a la oxidación de la fase orgánica presente en la muestra, proceso que culminó alrededor de los 680°C. De ahí en adelante, la masa del sólido permanece constante y no se observó mas pérdida de peso.

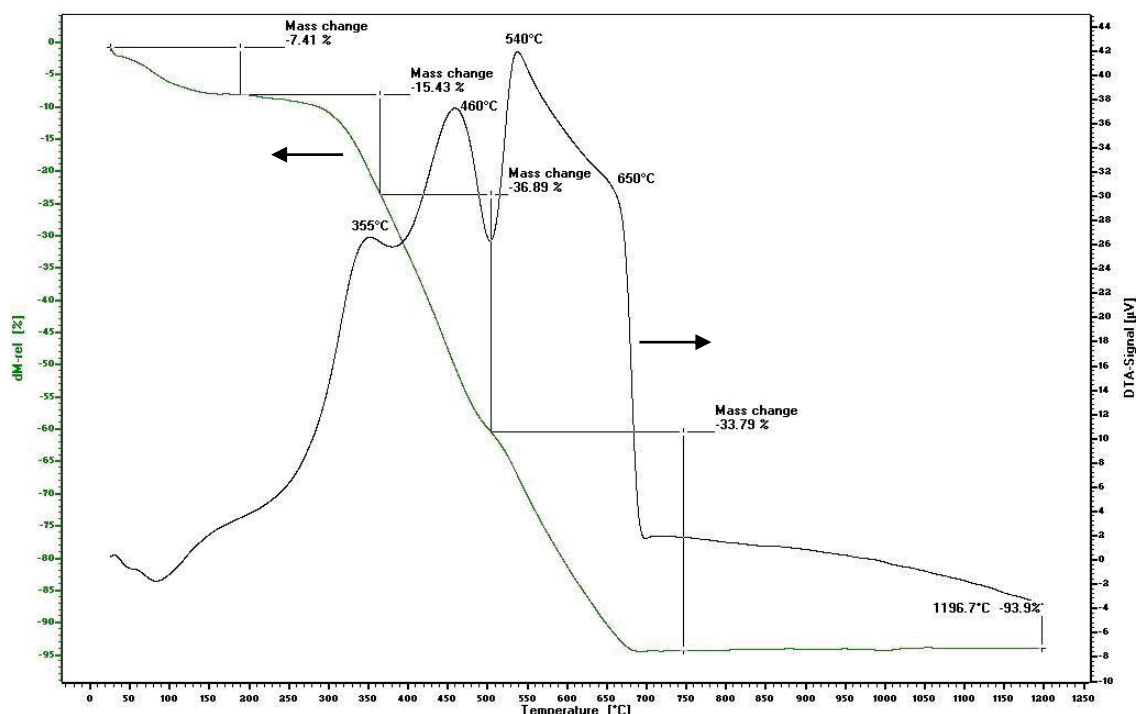


Figura 5.3. Curvas de ATD/TG correspondientes al sólido pre-calcinado obtenido durante el desarrollo del proceso Pechini.

Con base en las curvas de ATD/TG, para los polvos cerámicos obtenidos por el método pechini, se definió que la temperatura más adecuada para la calcinación del material debería ser mayor a 680°C. En este trabajo, se trató térmicamente el precalcinado a una temperatura de 450°C, durante 5 horas, considerando que a esta temperatura ya se ha formado el compuesto intermedio, figura 5.3, y se consideró que con este tiempo de tratamiento se podía eliminar el carbono, que aún existe en el sistema, y dar comienzo a la cristalización del óxido.

Considerando los resultados de ATD/TG, y las apreciaciones anteriores, se estableció una rampa de calentamiento que permitió que en el material ocurrieran los procesos térmicos anteriormente mencionados; la velocidad de calentamiento fue lo suficientemente baja para garantizar la oxidación de la fase orgánica presente en el sólido pre-calcinado y la formación de un material inorgánico medianamente cristalino. En la figura 5.4 se indica el cronograma de calentamiento utilizado en este trabajo para obtener el TiO_2 por el método Pechini.

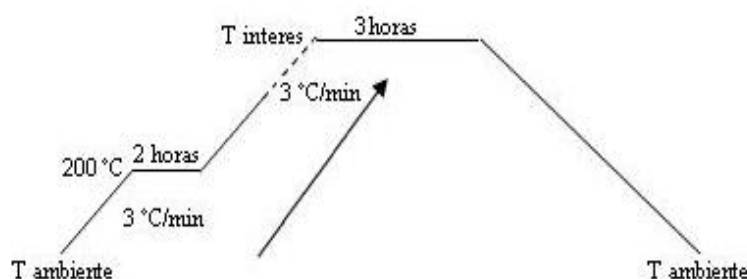


Figura 5.4. Programa de calentamiento utilizado en este trabajo para obtener los polvos cerámicos de TiO_2 por el método Pechini.

Adicionalmente, el material sólido pre-calcinado obtenido por el método Pechini fue sometido a tratamientos térmicos, utilizando el programa de calentamiento de la figura 5.4, a una temperatura final de 400, 500, 600 y $700\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 3 horas, y a $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3, 5 y 7 horas.

5.1.2. Espectroscopia Infrarroja

5.1.2.1. Espectro de infrarrojo del pre-calcinado obtenido.

En la figura 5.5 se muestra el espectro IR del material pre-calcinado obtenido en el proceso Pechini. En este espectro se puede observar la banda que corresponde a las vibraciones del agua a $\sim 3415\text{ cm}^{-1}$, y $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ (flexión del agua H-O-H); también están presentes las bandas asociadas a la vibración del grupo carboxílico proveniente del ácido cítrico, a 1400 y 1708 cm^{-1} .

La banda alrededor de 2930 cm^{-1} se puede asociar a la vibración del grupo CH_2 [41]. En este espectro de Calcinado, además, aparece un doblete en la región entre 600 y 900 cm^{-1} ; en esta zona deben estar presentes las bandas características del ácido cítrico y etilenglicol (617 cm^{-1} , 768 cm^{-1} y 872 cm^{-1}) [45].

Finalmente, las bandas que corresponden a las vibraciones del Ti-O están alrededor de 600 cm^{-1} [41] y la banda a $\sim 650\text{ cm}^{-1}$ se puede asociar a la vibración del grupo funcional Ti-O-Ti.

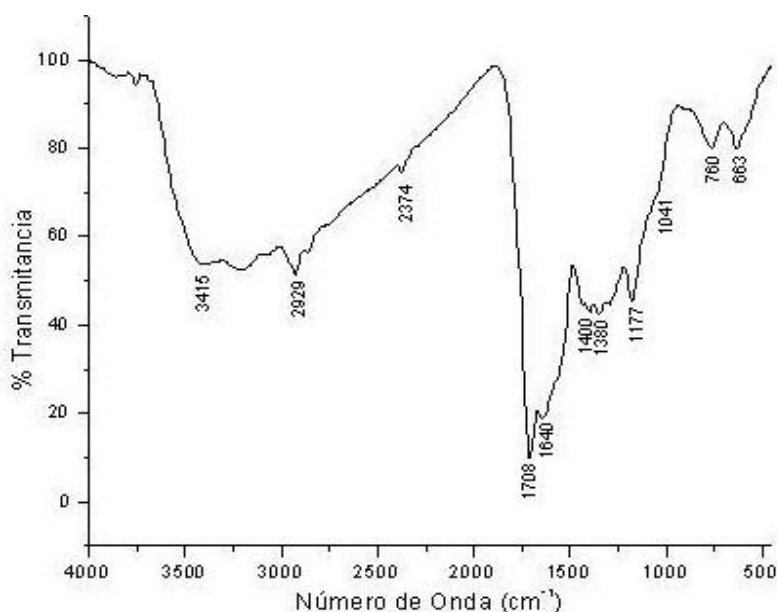


Figura 5.5. Espectro IR correspondiente al material pre-calcinado obtenido por el método Pechini.

5.1.2.2. Efecto de la temperatura de tratamiento térmico

Se analizaron muestras de polvos cerámicos sometidos a tratamiento térmico a temperaturas de 400°C , 450°C , 500°C , 600°C y 700°C , por 3 horas. En la figura 5.6 se muestran los espectros correspondientes. Las bandas típicas del agua, a $\sim 3410\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1620\text{ cm}^{-1}$, aparecen siempre en los espectros, independiente de

la temperatura a la cual se trató la muestra, disminuyendo su intensidad con el incremento de la temperatura.

En el espectro IR de la muestra tratada a 400°C, se observaron las bandas a 480 cm^{-1} , correspondiente al enlace Ti-C, y las ubicadas a 566 cm^{-1} y 581 cm^{-1} que se pueden asociar a los enlaces que se forman entre el oxígeno y el titanio, O-Ti-O [43]. A esta temperatura el doblete es menos intenso, condición que pudo ser ocasionada por la eliminación de gran parte de la fase orgánica. En el espectro IR de la muestra tratada a 450°C, es evidente la formación de una banda ancha a 500 cm^{-1} , que se va haciendo mas definida a medida que se incrementaba la temperatura de tratamiento; esta banda debe ser característica de la fase inorgánica presente en la muestra y se podría relacionar con enlaces Ti-O, Ti-OH o Ti-O-Ti.

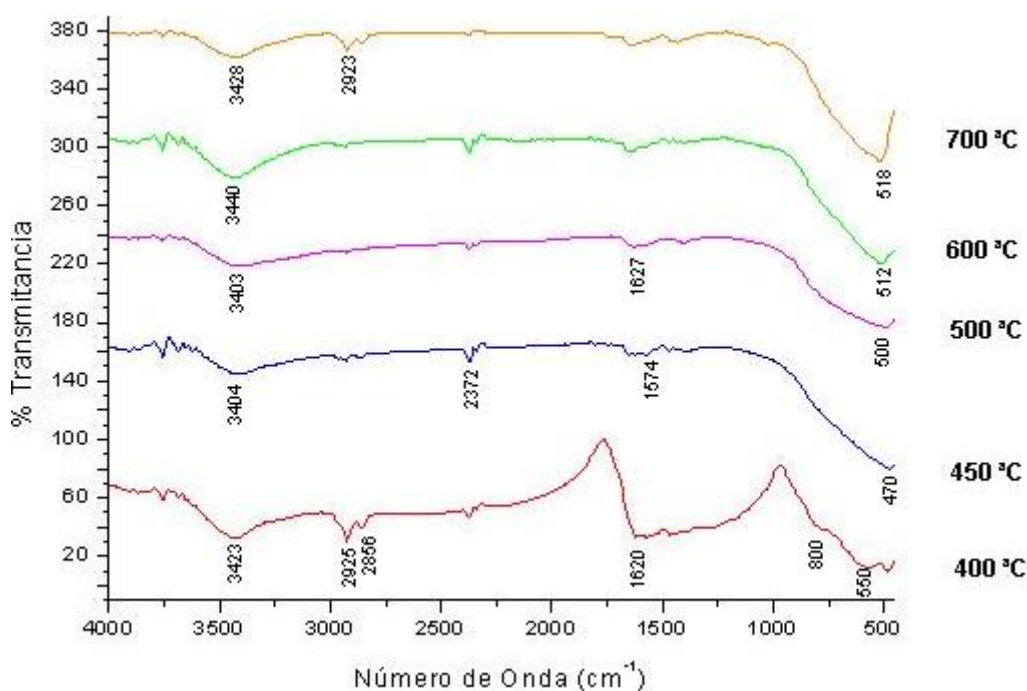


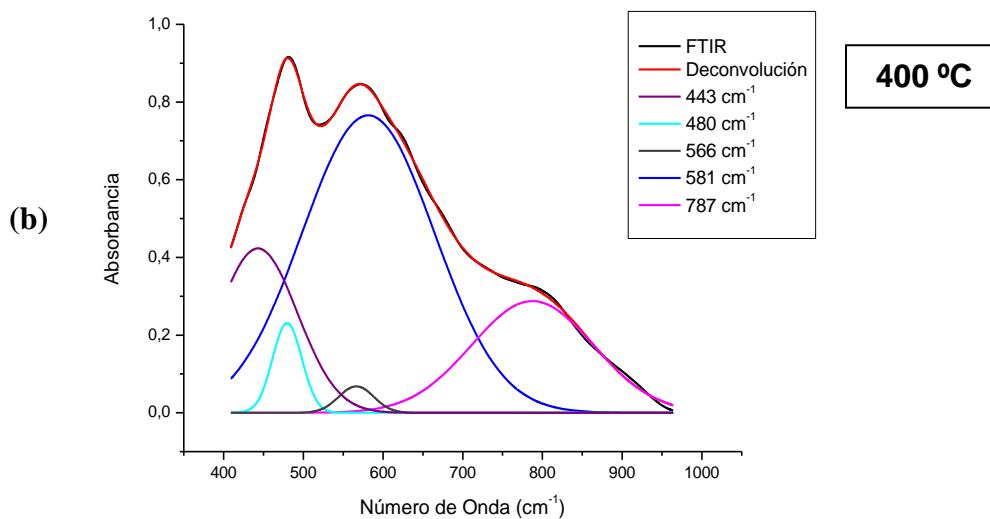
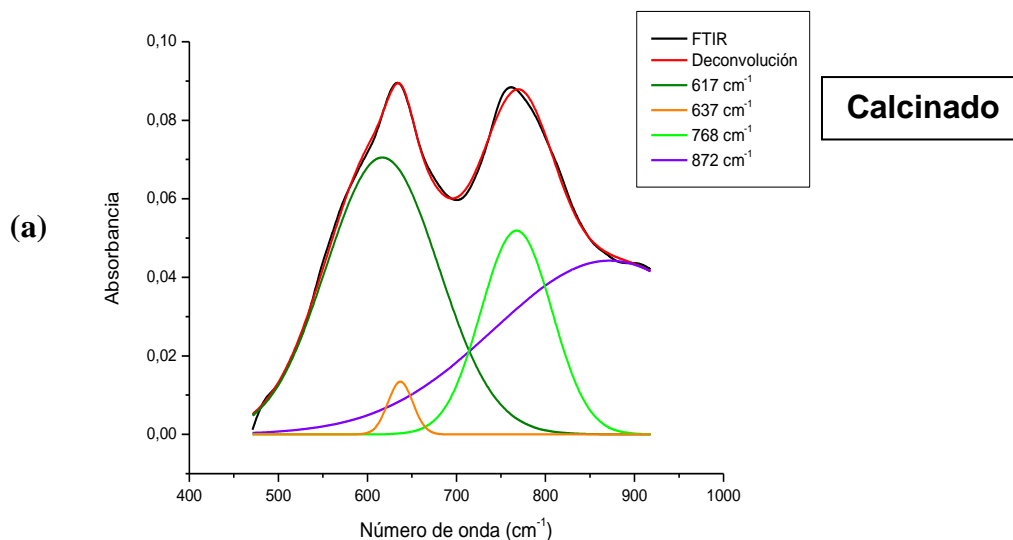
Figura 5.6. Espectros IR correspondientes a sólidos obtenidos por el método Pechini y que fueron tratadas a diferentes temperaturas.

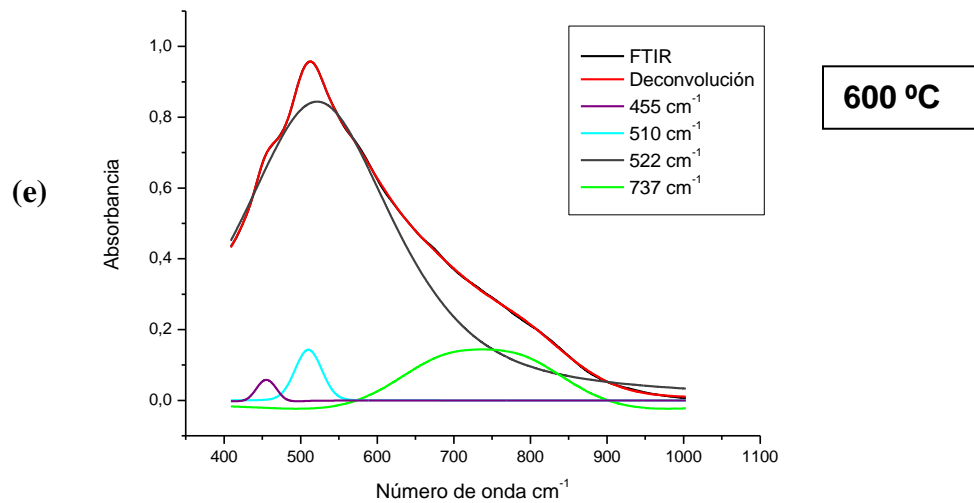
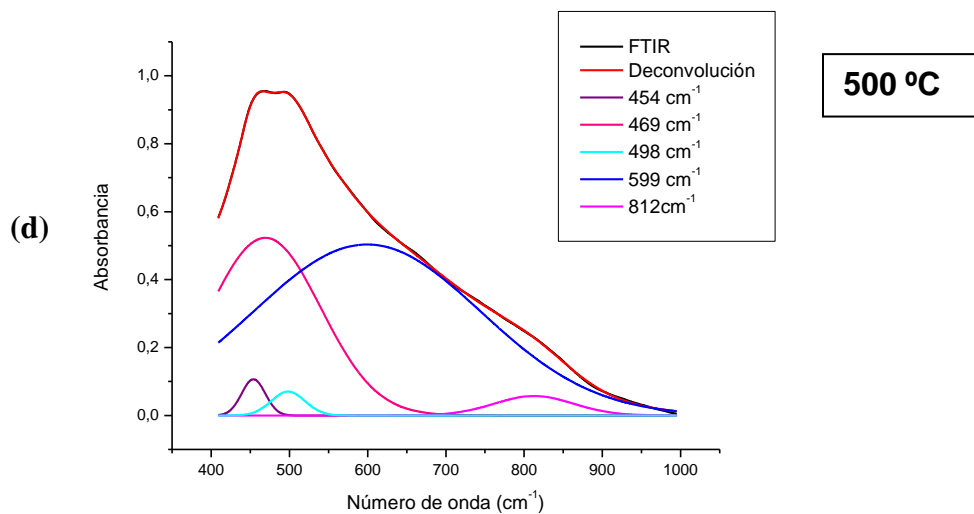
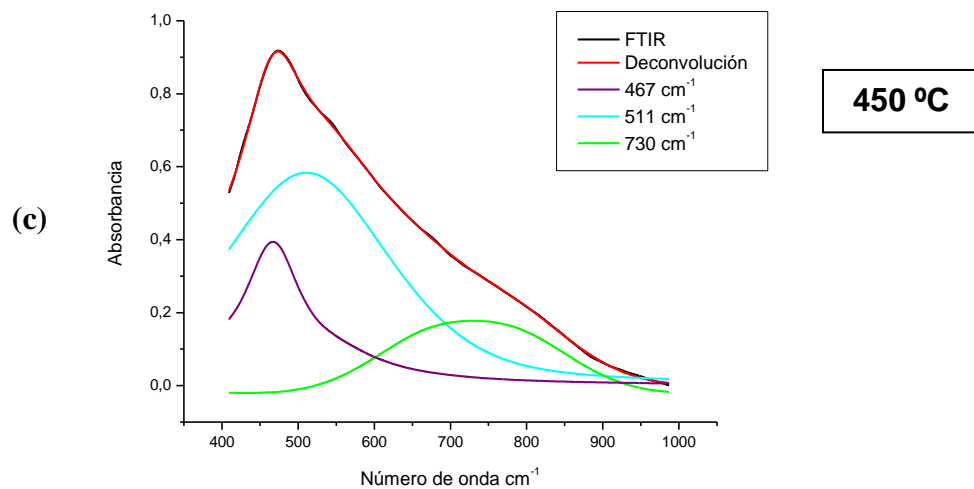
Para conocer más sobre las bandas relacionadas con los modos vibracionales del TiO_2 , se realizó un análisis de deconvolución de los espectros infrarrojos, en el modo absorbancia, en el intervalo entre 400 y 1000 cm^{-1} porque es en esta región donde se ubican las bandas de interés relacionadas con los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C. La deconvolución de estos espectros se muestra en la figura 5.7 y estos correspondían a las muestras calcinadas a 250°C durante 24 horas, a 400°C, 450°C, 500 °C, 600 °C y 700 °C, durante 3 horas.

En el espectro IR correspondiente a la muestra tratada a 250°C aparece un doblete en la región entre 600 y 900 cm^{-1} que estarían asociadas, principalmente, a bandas características del ácido cítrico y el etilenglicol (bandas a 617 cm^{-1} , 637 cm^{-1} , 768 cm^{-1} y 872 cm^{-1}). Para la muestra calcinada a 400 °C, el espectro IR muestra las bandas a 443 y 480 cm^{-1} , correspondientes al enlace Ti-C, las ubicadas a 566 cm^{-1} y 581 cm^{-1} correspondientes a los enlaces formados entre el oxígeno y el titanio, O-Ti-O y a en 787 cm^{-1} que se pueden asociar al enlace C-H alcano en modo de balanceo; a esta temperatura el doblete es menos intenso, debido, posiblemente a que se ha eliminado gran parte de la fase orgánica. En el espectro IR de la muestra tratada a 450°C son evidentes tres bandas: a 467, 511 y 730 cm^{-1} , características de la fase inorgánica presente en la muestra, concretamente estarían relacionados con los enlaces Ti-O y Ti-OH, principalmente.

Observando los espectros de la figura 5.7, concretamente los correspondientes a las muestras calcinadas a 250°C y 400°C, aunque ellos presentan algunas diferencias su aspecto general es similar. Según estos espectros, en estas muestras existe fase orgánica y en el sólido tratado a 400°C comienzan a ser evidentes las bandas asociadas a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C. Como se indicará más adelante, con base en los resultados de DRX, el material en ese rango de temperaturas fue amorfo. Por otro lado, en el espectro IR de la muestra tratada a 450°C/3h fueron más evidentes las bandas a bajos números de onda,

indicando la importancia de los enlaces Ti-O en esta muestra. También lo destacaran los resultados de DRX, en el sólido tratado a 450°C la fase predominante fue la anatasa o sea que a esta temperatura la muestra internamente presentaba un ordenamiento de largo rango.





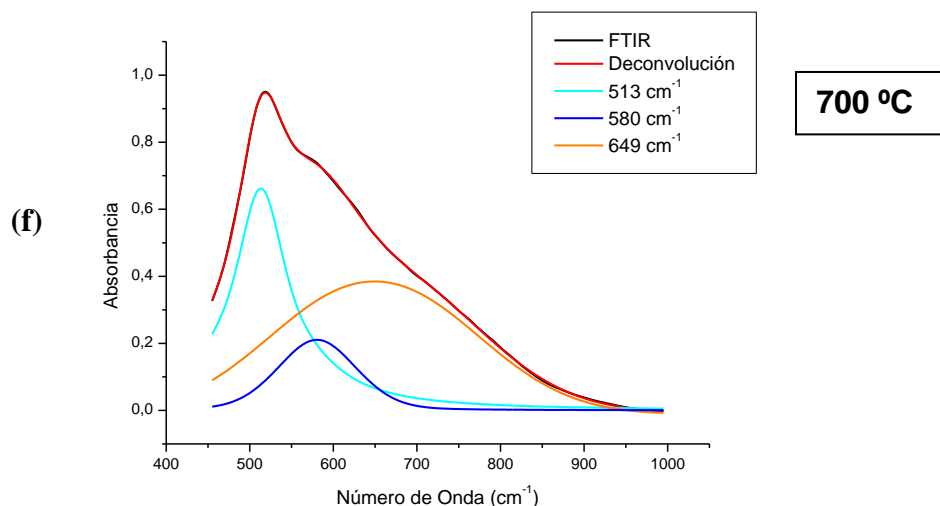


Figura 5.7. Deconvolución de los espectros IR, en la región de 1000 a 400 cm⁻¹ del polvo cerámico sintetizado por el método Pechini, que fue sometido durante 3 horas a diferentes tratamientos térmicos: (a) calcinado a 250°C, (b) 400°C, (c) 450°C, (d) 500°C, (e) 600°C y (f) 700°C.

En el espectro IR del sólido tratado a 500°C se observa un aumento en el área de la banda ubicada entre 400 cm⁻¹ y 650 cm⁻¹ lo que ocasiona que, al deconvolucionarla, de origen a dos bandas situadas a 454 cm⁻¹ y 599 cm⁻¹ que se pueden asociar a modos vibracionales del enlace Ti-O (figura 5.7(d)). A 600 °C, el espectro presentó un hombro a ~455 cm⁻¹ y algunas de las bandas, presentes en el espectro de la muestra tratada a 500°C, presentaron un desplazamiento hacia números de onda más altos. Es necesario indicar que en este rango de temperaturas, entre 500 y 600°C, normalmente se presenta la transformación de fase anatasa-rutilo en el TiO₂ [4].

Al realizar la deconvolución del espectro IR de la muestra tratada a 700°C, se obtuvieron tres bandas ubicadas a 513, 580 y 649 cm⁻¹ que estarían relacionadas con la formación de enlaces Ti-O-Ti. Es de esperar que a esta temperatura, 700°C, sea la fase rutilo la que predomine y por lo tanto las bandas ubicadas a 560 y 674 cm⁻¹ deberían ser características de esta fase.

Los cuatro parámetros que se obtuvieron, utilizando el software FITYK a los espectros IR de interés, se indican en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Valores de los parámetros más importantes al realizar la deconvolución de las bandas que componen el espectro IR, en la región entre 400 y 1000 cm^{-1} , de la muestra calcinada a 250°C y de las muestras tratadas térmicamente a 400, 450, 500, 600 y 700°C.

Muestra	Centro (cm^{-1})	Area (%)	Ancho Int. (cm^{-1})	Altura (cm^{-1})
Calcinado a 250°C	616.894	11.1278	157.437	0.0706808
	637.142	0.468937	33.3444	0.0140635
	767.514	5.19142	99.5074	0.0521712
	871.918	14.3668	324.642	0.0442543
400°C/3h	442.902	52.8074	124.379	0.42457
	479.791	10.6545	44.7989	0.237829
	566.313	3.74761	53.7611	0.0697086
	581.498	159.109	207.512	0.766746
	787.358	54.9678	190.788	0.288109
450°C/3h	466.826	75.9037	190.873	0.397667
	510.941	195.626	334.787	0.58433
	729.597	23.5733	132.678	0.177673
500°C/3h	454.058	4.03335	36.035	0.111929
	469.11	92.9613	177.367	0.524119
	498.343	3.80416	52.8968	0.0719167
	599.208	183.686	364.663	0.503714
	812.441	7.31551	127.42	0.0574126
600°C/3h	455.322	1.46573	23.6823	0.0618915
	510.192	6.41537	43.2535	0.14832
	521.519	284.543	336.673	0.845161
	737.098	10.2612	71.2909	0.143934
700°C/3h	513.346	90.4416	134.709	0.671383
	580.432	26.9796	127.547	0.211527
	649.346	99.2512	257.868	0.384891

Área Total(calcinado)= 25,83079; Área Total (400°C/3h)= 264,6336; Área Total (450°C/3h)= 232,07139.
 Área Total (500°C/3h)=255,1976; Área Total (600°C/3h)= 234,30813; Área Total (750°C/3h)= 199,89531.

5.1.2.3. Efecto de la duración del tratamiento térmico

La muestra que se trató a 450 °C se sometió a este tratamiento durante diferentes intervalos de tiempos, esto con el fin de determinar cómo evolucionaban las bandas del espectro, para los diferentes tiempos de

tratamiento considerados.

En la figura 5.8 se muestran los espectros IR correspondientes a muestras tratadas a 450°C durante diferentes tiempos: 3, 5 y 7 horas. Los espectros IR presentaron la banda a 3440 cm^{-1} , que se puede asociar al modo vibracional de tensión del H-OH, y la ubicada a 1630 cm^{-1} que corresponde al modo de flexión del agua. La banda ubicada a 1430 cm^{-1} se podría asociar a la vibración de grupos orgánicos C-H residuales [41]. La región del espectro IR más importante, es el intervalo 1000 - 400 cm^{-1} y es donde se encuentran los enlaces Ti-O característicos de la fase anatasa. Se observa una banda, alrededor de 466 cm^{-1} (figura 5.8) que se podría asignar a uno de los modos vibracionales del grupo funcional Ti-O y las bandas cercana a 515 cm^{-1} y 715 cm^{-1} corresponden a los enlaces Ti-O-Ti [41].

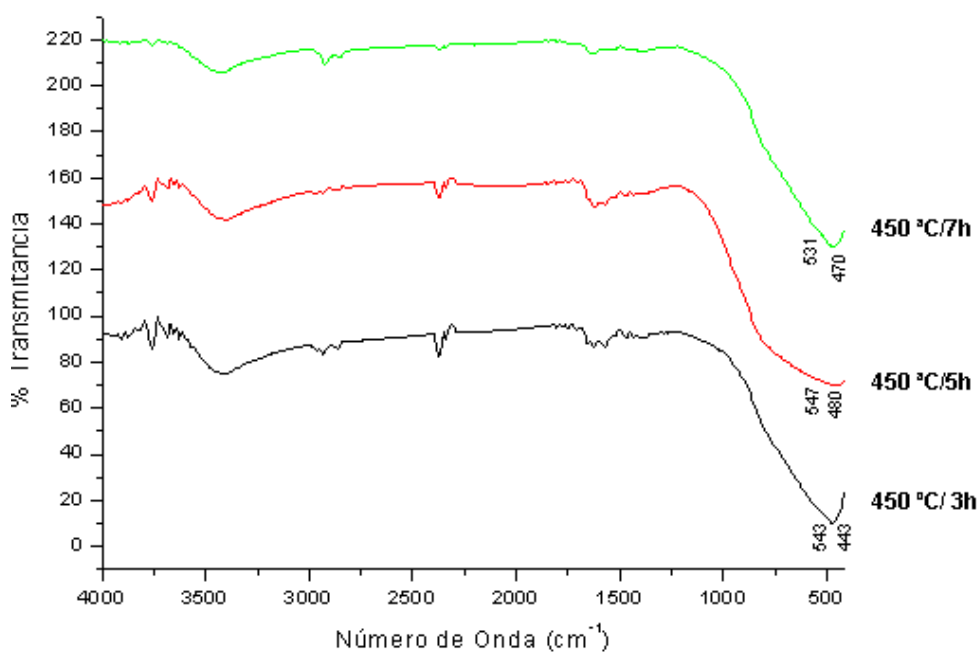
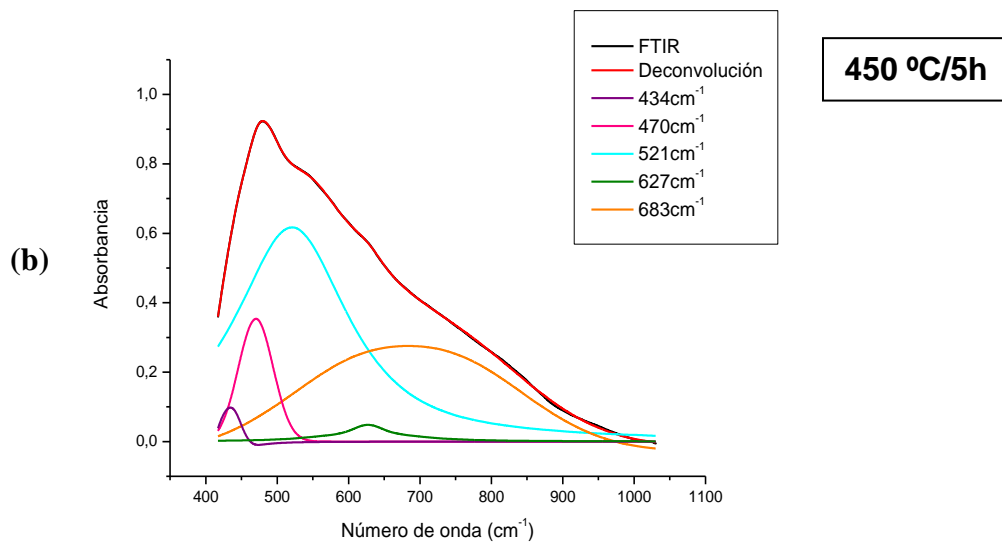
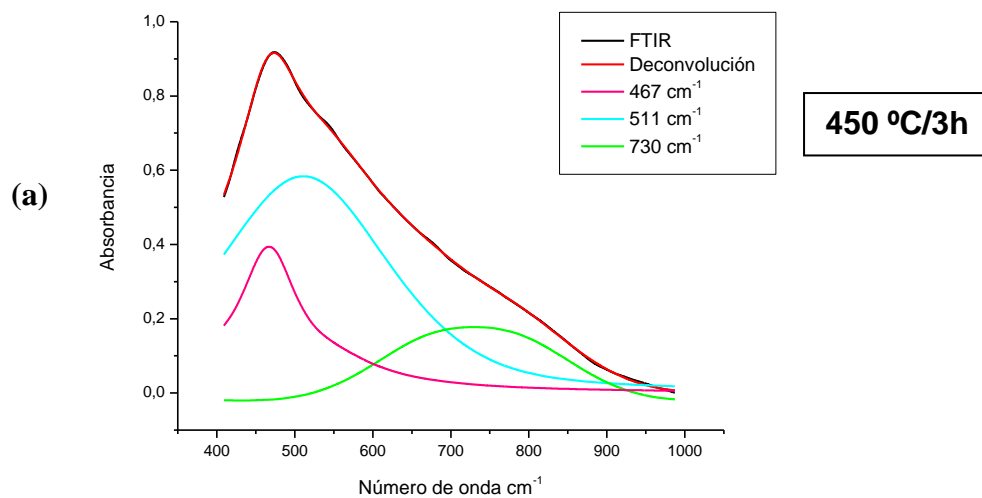


Figura 5.8. Espectros IR de los polvos cerámicos obtenidos por el método Pechini correspondientes a las muestras tratadas térmicamente a: 450°C/3 horas, 450°C/ 5horas y 450°C/7 horas.

En la figura 5.9 se muestran los resultados al realizar el proceso de deconvolución de los espectros IR, en la región de 400 a 1000 cm^{-1} , correspondientes a muestras tratadas a 450°C durante diferentes tiempos.



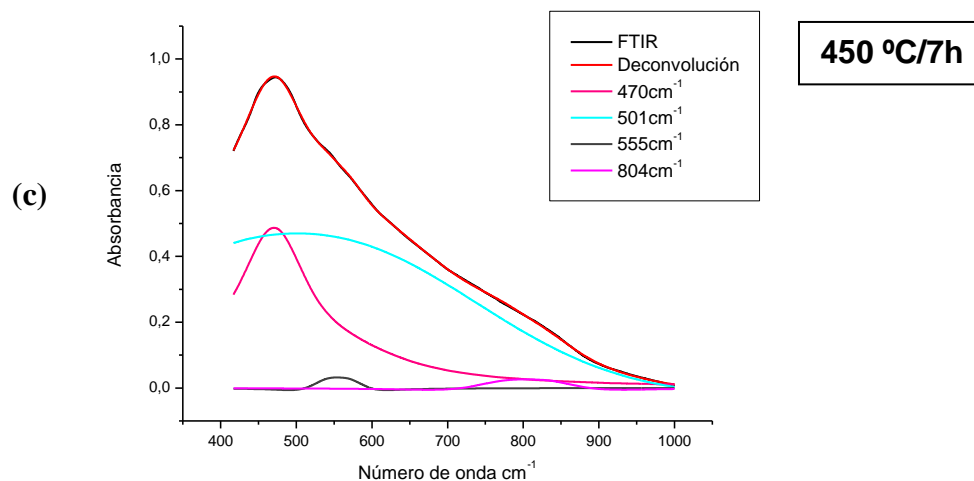


Figura 5.9. Deconvolución de los espectros infrarrojos, en la región de 1000 a 400 cm^{-1} , del polvo cerámico sintetizado por el método Pechini, y tratado a 450°C durante: (a) 3 horas, (b) 5 horas y (c) 7 horas.

En la tabla 5.2 se indican los valores de los parámetros más importantes del proceso de deconvolución de los espectros de la figura 5.9, en la región entre 400 y 1000 cm^{-1} .

Tabla 5.2. Resultados obtenidos del proceso de deconvolución de las bandas que componen el espectro IR de las muestras tratadas térmicamente a 450°C durante diferentes tiempos.

Muestra	Center (cm^{-1})	Area (%)	Ancho Int. (cm^{-1})	Altura (cm^{-1})
450°C/3h	466.826	75.9041	190.874	0.397666
	510.936	195.644	334.816	0.584331
	729.584	23.5647	132.638	0.177662
450°C/5h	434.244	1.8895	18.39	0.102746
	470.138	21.5741	59.9845	0.359662
	520.766	171.918	278.061	0.618274
	627.375	6.92964	140.92	0.049174
	683.532	57.5148	208.751	0.275519
450°C/7h	470.321	115.058	235.076	0.489451
	500.923	199.358	424.232	0.469928
	555.192	0.362191	11.1594	0.0324562
	803.636	0.526454	20.3633	0.0258531

Área Total (450°C/3h)= 232,07139; Área Total (450°C/5h)= 243,50681; Área Total (450°C/7h)= 253,03083.

En la Figura 5.10 se muestra la variación del área integrada, A_b/A_T donde A_b es el área de la banda correspondiente y A_T el área total de la banda experimental, de las bandas más importantes referenciadas en la tabla 5.2. La banda alrededor de 466 cm^{-1} presenta un valor de área integrada relativamente bajo, esto indica poco aporte del modo vibracional Ti-O al sistema. La banda a 515 cm^{-1} , con un valor de área integrada alta, es el modo vibracional que más aporta al espectro IR y corresponde al grupo funcional Ti-O-Ti.

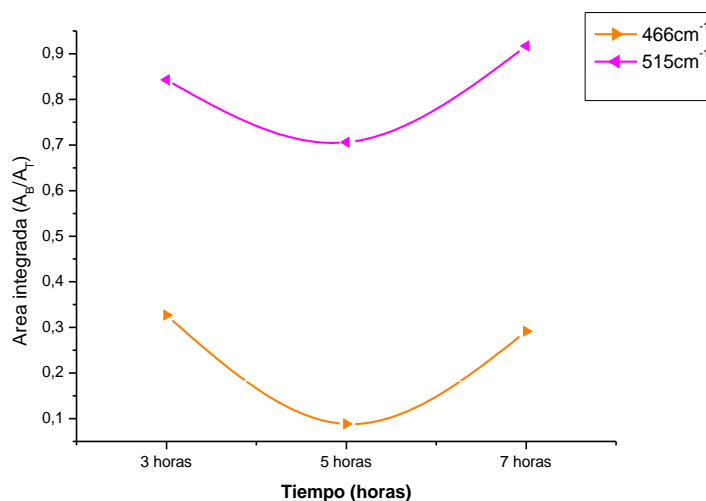


Figura 5.10. Evolución del área integrada, A_b/A_T , de los modos vibracionales correspondientes a las bandas 466 y 515 cm^{-1} correspondientes a los espectros IR de muestras tratadas térmicamente a 450°C durante diferentes tiempos.

5.1.3. Difracción de rayos X

Los difractogramas de rayos X de la figura 5.11 corresponden a sólidos obtenidos por el método Pechini, y sometidos a diferentes tratamientos térmicos. Estos difractogramas indican que las muestras eran aún amorfas a 350°C y que a 450°C se cristalizaron obteniéndose la fase anatasa (PDF 21-1272). Al tratar la muestra a 450°C durante diferente tiempo, 5 y 7 horas, se observó que la anatasa se mantuvo como principal fase cristalina en el dióxido.

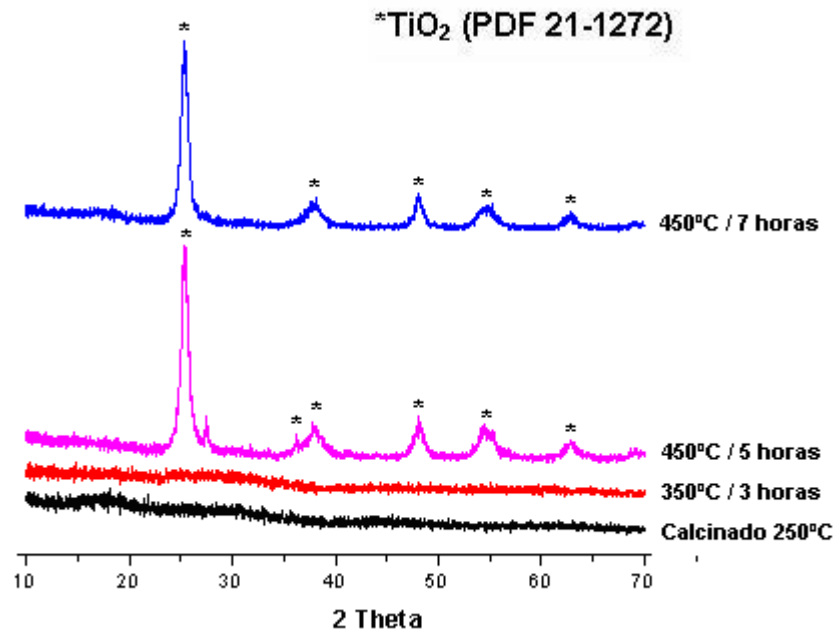


Figura 5.11. Difractogramas de rayos X correspondientes al sistema de titanio, pH 9, tratadas a 450°C por 5 y 7 horas. Adicionalmente se han colocado los difractogramas de la muestra calcinada y tratada a 350°C/3 horas.

5.1.4. Microscopia Electrónica de Transmisión

Para conocer el tamaño y la morfología de las partículas presentes en las muestras se utilizó Microscopia electrónica. Las fotografías tomadas a las muestras, tratadas a diferentes temperaturas, se muestran en la figura 5.12.

En la figura 5.12(a) se observan partículas con forma irregular y bordes suaves, de tamaños superiores a los 100 nm. Por otro lado, a medida que se aumenta la temperatura de tratamiento, figuras 8(b) y 8(c), se forman aglomerados de forma irregular y que contienen partículas primarias con un tamaño aproximado de 10nm.

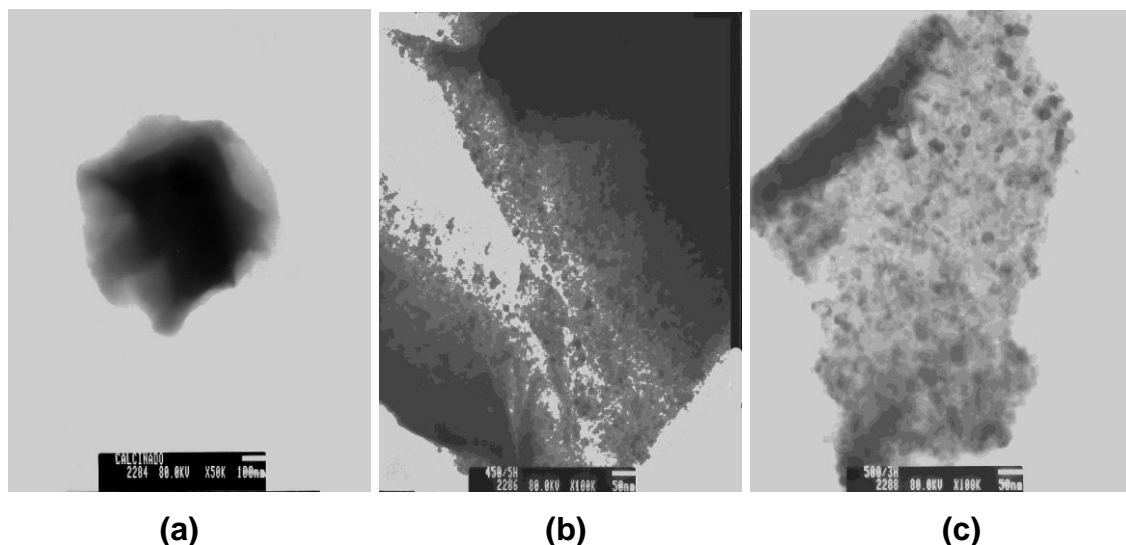


Figura 5.12. Fotografías obtenidas con MET de muestras sólidas de TiO_2 , obtenidas por el método de Pechini, y tratadas a: (a) 250°C , (b) $450^\circ\text{C}/3\text{h}$ y (c) $500^\circ\text{C}/3\text{h}$.

En la figura 5.13 se muestran las fotografías obtenidas con MET de sólidos sintetizados por el método Pechini y tratados a 450°C durante 3, 5 y 7h.

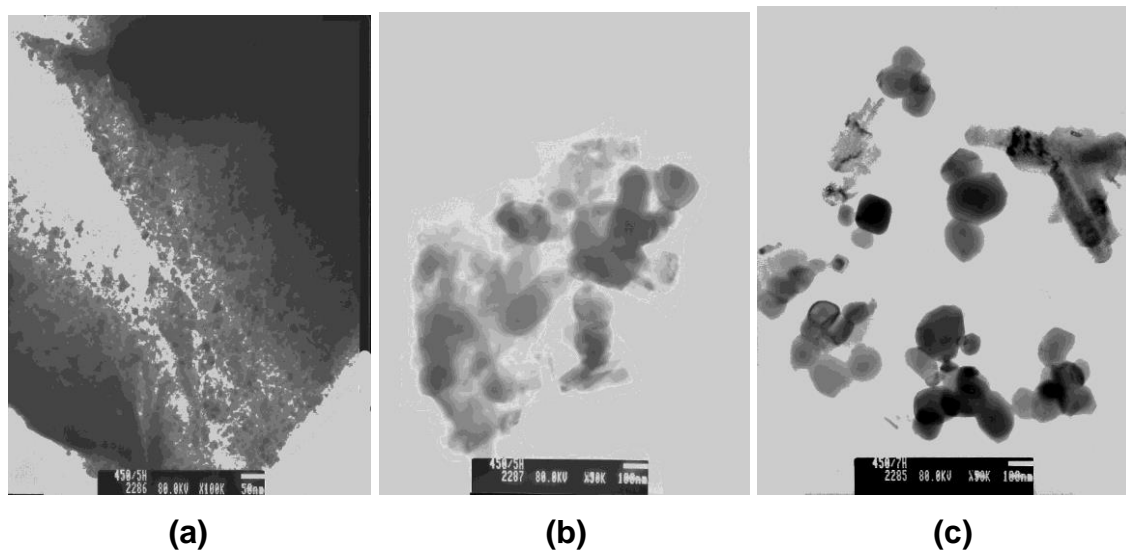


Figura 5.13. Fotografías obtenidas con MET de muestras sólidas de TiO_2 , obtenidas por el método de Pechini, y tratadas a: (a) $450^\circ\text{C}/3\text{h}$, (b) $450^\circ\text{C}/5\text{h}$ y (c) $450^\circ\text{C}/7\text{h}$.

Si se observan las partículas tratadas a 450°C , figura 5.13(a), estas eran irregulares con un tamaño de aproximadamente 50 nm. Además, se aprecia que

al aumentar el tiempo de residencia del sólido, a esta temperatura, favoreció la formación de partículas más finas con bordes suaves, y un tamaño de aproximadamente 100 nm, por lo que utilizando este método de síntesis se puede garantizar la obtención de partículas de tamaño nanométrico.

5.1.5 Microscopia Electrónica de Barrido

En la figura 5.14 se observan las fotografías obtenidas con MEB de la muestra sintetizada por el método Pechini, y que fue tratada a 450°C durante 3 horas.

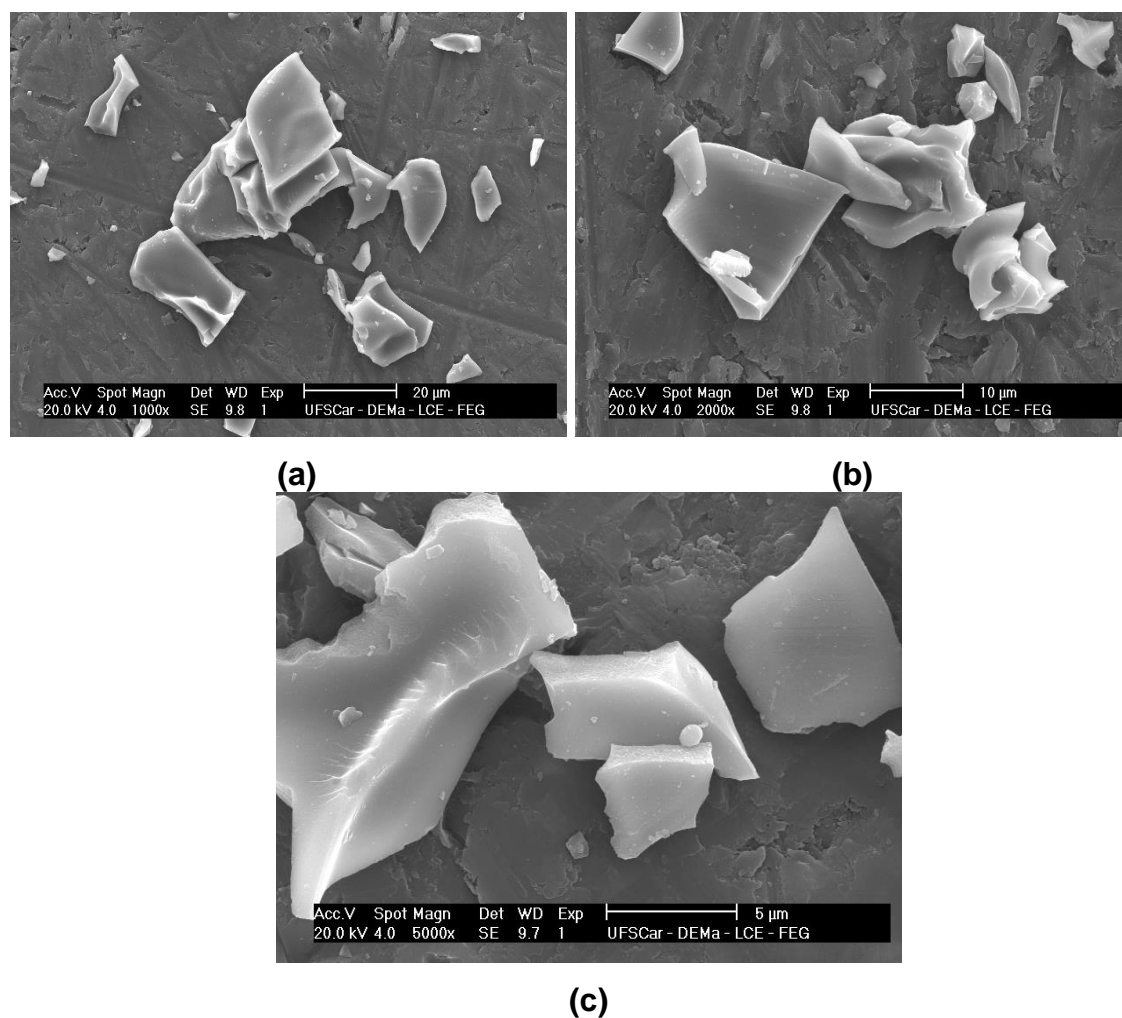


Figura 5.14. Fotografías obtenidas con MEB del sólido sintetizado por Pechini, y tratado térmicamente a 450 °C durante 3 horas, [aumentos (a)1000X, (b)2000X y (c)5000X].

En las fotografías de la figura 5.14 se observan partículas, realmente agregados, entre 5 y 15 μm , con una textura superficial muy fina. El método de Pechini favorece la obtención de agregados debido a la gran sinterabilidad de las partículas primarias.

CAPÍTULO 6

EFFECTO FOTOCATALÍTICO DEL TiO₂ SOBRE FIBROBLASTOS DE PIEL HUMANA NORMAL Y CÉLULAS CANCERÍGENAS DE PIEL

El desarrollo experimental para determinar el efecto fotocatalítico del TiO_2 , se llevó a cabo usando fibroblastos de piel humana normal (FPHN) y células de cáncer de piel tipo melanoma (línea celular Hs 688(A).T CRL-7425), adquirida al American Type Tissue Culture (ATCC), las cuales fueron tratadas con ciertos valores de energía y concentración de TiO_2 , definidos a partir de la prueba preliminar que se muestra en el ANEXO III.

6.1. Diseño experimental

Para determinar el efecto citotóxico del TiO_2 , de la radiación y del efecto de la interacción del tiempo de exposición a la radiación y la concentración de TiO_2 sobre los cultivos de FPHN y melanoma, el análisis estadístico se dividió en varias etapas experimentales. El diseño de cada etapa experimental se realizó utilizando el *Software Estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1*, para lo cual se tomaron tres réplicas por corrida sin puntos centrales, un nivel de significancia (α) de 0,05 y como variable de respuesta la densidad óptica medida con el *kit* XTT.

6.1.1. Efecto citotóxico del TiO_2 sobre fibroblastos de piel humana normal

Para estudiar el efecto citotóxico del catalizador en ausencia de radiación se usó un diseño factorial completo con 4 factores (tiempo de exposición al TiO_2 , concentración de TiO_2 , método de obtención del TiO_2 y tiempo de proliferación), con dos niveles para el tiempo de exposición (45, 90 minutos), cinco niveles para la concentración (0, 25, 50, 75, 100 ppm), dos niveles para el método de obtención (0, 1), donde 0 representa Pechini y 1 representa sol gel y 5 niveles para el tiempo de proliferación (1, 2, 3, 4, 5 días). El diseño experimental se muestra en la ANEXO V tabla A.7.

6.1.2. Efecto citotóxico de la radiación UV sobre fibroblastos de piel humana normal

Para estudiar el efecto citotóxico de la radiación, en ausencia de catalizador, se usó un diseño factorial completo general con 3 factores (tiempo de exposición a la radiación, radiación y tiempo de proliferación), con dos niveles para el tiempo de exposición (45, 90 minutos), dos niveles para la radiación (0, 1), donde 0 representa sin radiación y 1 con radiación, y 5 niveles para el tiempo de proliferación (1, 2, 3, 4, 5 días). El diseño experimental se muestra en el ANEXO V tabla A.8.

6.1.3 Efecto citotóxico de los factores tiempo de exposición a la radiación y concentración de TiO₂ sobre fibroblastos de piel humana normal

Con el fin de estudiar el efecto citotóxico de los factores radiación y concentración del catalizador, y observar un posible fenómeno fotocatalítico, se uso un diseño factorial completo general con 4 factores (tiempo de exposición al TiO₂ y a la radiación, concentración de TiO₂, método de obtención del TiO₂ y tiempo de proliferación), con dos niveles para el tiempo de exposición (45, 90 minutos), cuatro niveles para la concentración (25, 50, 75, 100 ppm), dos niveles para el método de obtención (0, 1), donde 0 representa Pechini y 1 representa sol gel, y 5 niveles para el tiempo de proliferación (1, 2, 3, 4, 5 días). El diseño del experimento se muestra en el ANEXO V tabla A.9.

Se excluye del experimento el nivel de concentración de TiO₂ de cero (0) ppm (control medio, 10 % SFB), debido a que su estudio se realizó en el diseño planteado en la sección 6.1.1.

6.1.4. Efecto citotóxico del TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma

Para estudiar el efecto citotóxico del catalizador, en ausencia de radiación, se usó un diseño factorial completo con 4 factores (tiempo de exposición al TiO₂, concentración de TiO₂, método de obtención del TiO₂ y tiempo de proliferación), con dos niveles para el tiempo de exposición (45, 90 minutos), cinco niveles para la concentración (0, 25, 50, 75, 100 ppm), dos niveles para el método de obtención (0, 1), donde 0 representa Pechini y 1 representa sol gel y 5 niveles para el tiempo de proliferación (1, 2, 3, 4, 5 días). El diseño experimental se muestra en la ANEXO V tabla A.10.

6.1.5. Efecto citotóxico de la radiación UV sobre el cáncer de piel tipo melanoma

Para estudiar el efecto citotóxico de la radiación, en ausencia de catalizador, se usó un diseño factorial completo general con 3 factores (tiempo de exposición a la radiación, radiación y tiempo de proliferación), con dos niveles para el tiempo de exposición (45, 90 minutos), dos niveles para la radiación (0, 1), donde 0 representa sin radiación y 1 con radiación, y 5 niveles para el tiempo de proliferación (1, 2, 3, 4, 5 días). El diseño experimental se muestra en el ANEXO V tabla A.11.

6.1.6. Efecto citotóxico de los factores tiempo de exposición a la radiación y concentración de TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma

Con el fin de estudiar el efecto citotóxico de los factores radiación y concentración del catalizador, y observar un posible fenómeno fotocatalítico, se uso un diseño factorial completo general con 4 factores (tiempo de exposición al TiO₂ y a la radiación, concentración de TiO₂, método de obtención del TiO₂ y tiempo de proliferación), con dos niveles para el tiempo de exposición (45, 90

minutos), cuatro niveles para la concentración (25, 50, 75, 100 ppm), dos niveles para el método de obtención (0, 1), donde 0 representa Pechini y 1 representa sol gel, y 5 niveles para el tiempo de proliferación (1, 2, 3, 4, 5 días). Se muestra el diseño del experimento en el ANEXO V tabla A.12.

Se excluye del experimento el nivel de concentración de TiO₂ de cero (0) ppm (control medio, 10% SFB), debido a que su estudio se realizó en el diseño planteado en la sección 6.1.1.

6.2. Descripción de la prueba

6.2.1. Preparación de las microplacas

Los FPHN y el melanoma fueron sembrados en las placas de cultivo un día antes de la prueba experimental, utilizando el procedimiento de siembra siguiente:

1. Descartar el medio de cultivo de las botellas de cultivo.
2. Lavar las células 3 veces con PBS (Phosphate Buffered Saline)
3. Adicionar 2mL de solución de tripsina/EDTA al 0,25% e incubar la botella de cultivo por 5 minutos para resuspender las células. Verificar el desprendimiento de las células observando la placa de cultivo bajo el microscopio.
4. Adicionar a la botella 5 mL de medio de cultivo HMEM para inhibir el efecto de la tripsina.
5. Transvasar el contenido de la botella de cultivo a un tubo de 15 mL para centrifuga. Centrifugar las células a 1500 RPM durante 5 minutos descartando el medio sobrenadante y el pellet de células fue resuspendido en 10 mL de medio de cultivo nuevo.
6. Determinar el número de células por medio de tinción con azul de tripám.

7. Sembrar 5000 células por pozo en las microplacas de cultivo y agregar 200 μ L del medio de cultivo HMEM, con 10% de suero fetal bovino, a cada uno de los pozos que contienen células.
8. Poner las placas de cultivo en la incubadora, por 24 horas, hasta el inicio de la prueba.
9. Preparar soluciones con medio de cultivo HMEM y dióxido de titanio a 0, 25, 50, 75 y 100 ppm.

Todos los procedimientos se realizaron en cabina de flujo laminar tipo A2B3 de la siguiente figura.



Figura 6.1. Cabina de flujo laminar tipo A2B3.

6.2.2. Desarrollo de la prueba

Las soluciones de dióxido de titanio fueron adicionadas a los pozos de las placas de cultivo, de acuerdo a la configuración mostrada en la tabla 6.1. Luego, las placas que contenían FPHN y células cancerígenas, fueron rotuladas como Con radiación 45 min, Sin radiación 45 min, Con radiación 90 min y Sin radiación 90 min. Todas las placas fueron puestas dentro del reactor sobre una placa de agitación, a 300 RPM; adicionalmente, las placas Sin radiación 45 min y Sin radiación 90 min se cubrieron con papel aluminio para evitar el efecto de

cualquier tipo de radiación. Las especificaciones del reactor se encuentran en el ANEXO IV.

Pasados 45 minutos de exposición, las placas rotuladas como Con radiación 45 min y Sin radiación 45 min fueron retiradas del reactor. La solución reactiva del Kit XTT fue adicionada a las placas de cultivo y estas fueron colocadas en la incubadora por espacio de una hora. Pasada una hora, las placas fueron llevadas al lector de placas ELISA (STAT FAX – 2100, AWARE TECHNOLOGY INC) para medir los resultados Densidad Óptica (D.O) que se correlaciona con la actividad metabólica celular. El anterior procedimiento se repitió para las placas rotuladas como Con radiación 90 min y Sin radiación 90 min, correspondientes a 90 minutos de exposición.

Tablas 6.1. Configuración de las microplacas con radiación y sin radiación a 45 y 90 minutos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	1S (0)	1S (0)	1S (0)	2S (0)	2S (0)	2S (0)	3S (0)	3S (0)	3S (0)	4S (0)	4S (0)	4S (0)
C	1S (1)	1S (1)	1S (1)	2S (1)	2S (1)	2S (1)	3S (1)	3S (1)	3S (1)	4S (1)	4S (1)	4S (1)
D	5S	5S	5S	6S	6S	6S	7S	7S	7S			
E	1C (0)	1C (0)	1C (0)	2C (0)	2C (0)	2C (0)	3C (0)	3C (0)	3C (0)	4C (0)	4C (0)	4C (0)
F	1C (1)	1C (1)	1C (1)	2C (1)	2C (1)	2C (1)	3C (1)	3C (1)	3C (1)	4C (1)	4C (1)	4C (1)
G	5C	5C	5C	6C	6C	6C	7C	7C	7C			
H												

S: Células sanas, C: Células cancerígenas, 0: Método Pechini, 1: Método sol gel

Convención		Réplicas	Convención		Réplicas
1	Células, TiO ₂ [100 ppm]	3	6	Células + SFB 5% CB ↓	3
2	Células, TiO ₂ [75 ppm]	3	7	Células + SFB 10% CN ↔	3
3	Células, TiO ₂ [50 ppm]	3			
4	Células, TiO ₂ [25 ppm]	3			
5	Células + SFB 15% CA ↑	3			



Figura 6.2. Proceso de llenado de las microplacas.

6.3. Resultados obtenidos

Los datos de densidad óptica obtenidos, correspondientes a las lecturas de XTT de los FPHN y melanoma cultivados en placas con TiO₂, con radiación y sin radiación, a 45 y 90 minutos, se indican en las tablas 6.2 a 6.9. Estos resultados muestran los promedios de las réplicas a lo largo de los 5 días de lectura.

Tabla 6.2. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,859	0,887	0,885	0,863	0,847	0,892	0,960
	2 días	0,941	0,961	0,958	0,940	0,916	0,972	1,038
	3 días	1,026	1,045	1,044	1,021	0,996	1,067	1,100
	4 días	1,122	1,145	1,146	1,121	1,091	1,173	1,161

	5 días	1,220	1,239	1,239	1,215	1,185	1,279	1,234
90	1 día	0,874	0,882	0,880	0,864	0,819	0,885	0,908
	2 días	0,970	0,970	0,964	0,958	0,893	0,970	0,995
	3 días	1,067	1,065	1,059	1,053	0,991	1,061	1,068
	4 días	1,179	1,175	1,161	1,160	1,110	1,166	1,150
	5 días	1,282	1,280	1,261	1,267	1,224	1,266	1,224

Tabla 6.3. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,880	0,896	0,903	0,885	0,909	0,987	1,005
	2 días	0,960	0,959	0,972	0,964	0,972	1,056	1,080
	3 días	1,042	1,045	1,055	1,044	1,058	1,136	1,142
	4 días	1,136	1,137	1,150	1,137	1,159	1,226	1,214
	5 días	1,226	1,226	1,237	1,228	1,260	1,322	1,281
90	1 día	0,888	0,898	0,891	0,879	0,828	0,907	0,905
	2 días	0,977	0,974	0,973	0,976	0,896	0,983	0,988
	3 días	1,079	1,074	1,072	1,071	0,996	1,080	1,063
	4 días	1,184	1,183	1,180	1,181	1,113	1,184	1,143
	5 días	1,287	1,276	1,282	1,286	1,223	1,286	1,217

Tabla 6.4. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,930	0,951	0,924	0,935	0,946	0,986	1,137
	2 días	1,013	1,022	0,994	1,014	1,015	1,098	1,215
	3 días	1,096	1,107	1,078	1,094	1,106	1,176	1,270
	4 días	1,168	1,203	1,177	1,193	1,198	1,267	1,302
	5 días	1,270	1,297	1,273	1,292	1,304	1,355	1,372

90	1 día	0,916	0,908	0,924	0,905	0,856	0,948	0,996
	2 días	1,009	0,991	1,009	1,003	0,932	1,033	1,084
	3 días	1,108	1,087	1,109	1,096	1,035	1,127	1,155
	4 días	1,224	1,200	1,219	1,209	1,145	1,224	1,225
	5 días	1,331	1,307	1,325	1,316	1,256	1,321	1,296

Tabla 6.5. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,949	0,949	0,972	0,917	0,962	1,047	1,131
	2 días	1,029	1,020	1,046	1,001	1,030	1,124	1,212
	3 días	1,117	1,106	1,132	1,081	1,115	1,204	1,270
	4 días	1,215	1,203	1,225	1,174	1,217	1,292	1,334
	5 días	1,315	1,298	1,319	1,270	1,316	1,376	1,394
90	1 día	0,904	0,910	0,912	0,884	0,866	0,932	0,959
	2 días	0,995	0,990	0,994	0,974	0,935	1,012	1,047
	3 días	1,095	1,087	1,094	1,069	1,035	1,102	1,118
	4 días	1,211	1,199	1,202	1,177	1,152	1,202	1,196
	5 días	1,315	1,301	1,307	1,282	1,257	1,297	1,265

Tabla 6.6. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el Pechini.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,868	0,891	0,883	0,880	0,847	0,892	0,960
	2 días	0,951	0,965	0,955	0,961	0,916	0,972	1,038
	3 días	1,036	1,053	1,042	1,045	0,996	1,067	1,100
	4 días	1,143	1,152	1,139	1,144	1,091	1,173	1,161
	5 días	1,243	1,253	1,241	1,244	1,185	1,279	1,234

90	1 día	0,882	0,869	0,872	0,863	0,819	0,885	0,908
	2 días	0,982	0,961	0,960	0,960	0,893	0,970	0,995
	3 días	1,078	1,050	1,059	1,055	0,991	1,062	1,068
	4 días	1,198	1,173	1,170	1,164	1,110	1,166	1,150
	5 días	1,306	1,281	1,279	1,272	1,224	1,266	1,224

Tabla 6.7. Resultados de Densidad Óptica para FPHN Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,883	0,878	0,883	0,873	0,909	0,987	1,005
	2 días	0,962	0,950	0,951	0,951	1,006	1,056	1,080
	3 días	1,050	1,029	1,028	1,030	1,058	1,136	1,142
	4 días	1,150	1,125	1,121	1,128	1,159	1,228	1,214
	5 días	1,236	1,218	1,215	1,222	1,260	1,322	1,281
90	1 día	0,874	0,872	0,884	0,876	0,828	0,907	0,905
	2 días	0,973	0,955	0,970	0,970	0,896	0,983	0,988
	3 días	1,073	1,051	1,065	1,074	0,996	1,080	1,063
	4 días	1,182	1,159	1,179	1,187	1,113	1,184	1,143
	5 días	1,286	1,258	1,283	1,295	1,223	1,286	1,217

Tabla 6.8. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Sin Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,931	0,916	0,933	0,933	0,946	0,986	1,137
	2 días	1,016	0,989	1,003	1,016	1,015	1,098	1,192
	3 días	1,099	1,078	1,088	1,094	1,106	1,176	1,270
	4 días	1,180	1,174	1,183	1,190	1,198	1,267	1,302
	5 días	1,280	1,265	1,273	1,279	1,304	1,355	1,372
90	1 día	0,903	0,903	0,906	0,894	0,856	0,948	0,996

	2 días	0,993	0,993	0,990	0,988	0,932	1,033	1,084
	3 días	1,090	1,090	1,088	1,084	1,035	1,127	1,155
	4 días	1,203	1,206	1,199	1,194	1,145	1,224	1,225
	5 días	1,308	1,299	1,301	1,295	1,256	1,321	1,296

Tabla 6.9. Resultados de Densidad Óptica para Células Cancerígenas Con Radiación utilizando dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini.

Tiempo Exp. (min)	Tiempo envejec.	100 ppm	75 ppm	50 ppm	25 ppm	Control Bajo (sin TiO ₂)	Control Medio (sin TiO ₂)	Control Alto (sin TiO ₂)
45	1 día	0,934	0,958	0,971	0,938	0,962	1,047	1,131
	2 días	1,014	1,028	1,043	1,019	1,030	1,124	1,212
	3 días	1,102	1,117	1,128	1,101	1,115	1,204	1,270
	4 días	1,162	1,214	1,226	1,198	1,217	1,292	1,334
	5 días	1,287	1,304	1,316	1,289	1,316	1,376	1,394
90	1 día	0,892	0,906	0,905	0,891	0,866	0,932	0,959
	2 días	0,976	0,982	0,981	0,983	0,935	1,012	1,047
	3 días	1,075	1,086	1,084	1,081	1,035	1,102	1,118
	4 días	1,185	1,194	1,188	1,190	1,152	1,202	1,196
	5 días	1,287	1,295	1,290	1,294	1,257	1,297	1,265

6.4. Análisis de resultados

El análisis estadístico se realizó utilizando un análisis multifactorial de varianza para la densidad óptica (*ANOVA*) en cada diseño experimental propuesto. Se usó el *Software Estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1* para los cálculos estadísticos y las gráficas obtenidas determinaron qué factores tenían un efecto estadísticamente significativo; además se analizaron las interacciones significativas entre los factores. Adicionalmente se hizo un análisis descriptivo de las curvas de crecimiento celular usando las lecturas obtenidas después del primer día, hasta el quinto día, debido a que en el tiempo entre 0 y 24 horas el

metabolismo celular se ajustaba a las nuevas condiciones del medio e iniciaba la proliferación (multiplicación celular).

6.4.1. Efecto citotóxico del TiO₂ sobre fibroblastos de piel humana normal

Los resultados indicados en las dos tablas 6.2 y 6.6, (sin tomar en cuenta las columnas control bajo y control alto), fueron analizados por medio del análisis de varianza que se muestra en el ANEXO VI tabla A.13; la figura 6.3 muestra que los datos experimentales se encuentran estadísticamente distribuidos.

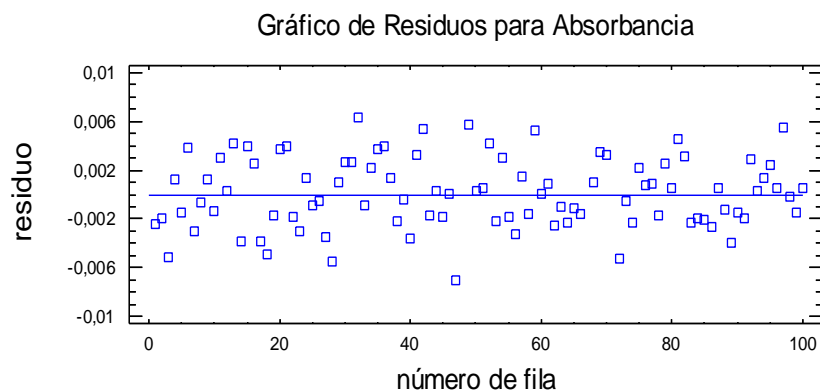


Figura 6.3. Gráfico de residuos de Absorbancia de datos obtenidos experimentalmente considerando el efecto del TiO₂, sintetizado por los métodos sol gel y Pechini, sobre FPHN.

Como se observa en el ANOVA (ANEXO VI tabla A.13), los valores P obtenidos para los factores: tiempo de exposición, concentración de TiO₂, método de síntesis del TiO₂ y tiempo de proliferación, además de las seis interacciones entre las variables, son menores que el nivel de significancia ($\alpha=0,05$), lo que proporciona un nivel de confianza del 95%. Esto indica que, los diversos factores e interacciones tienen diferencias por lo tanto presentan efectos estadísticamente significativos sobre la variable respuesta.

En la figura 6.4 se muestra el gráfico de Pareto que es la representación grafica de la ANOVA y la estandarización de los datos presentando la variabilidad en absorbancia de los distintos segmentos separados para cada uno de los efectos.

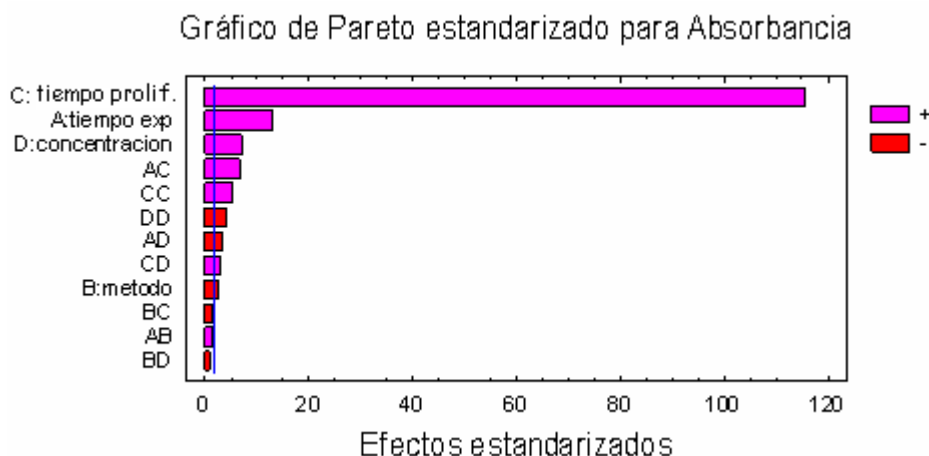


Figura 6.4. Gráfico de Pareto de cada una de las variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre FPHN.

En la gráfica de Pareto, figura 6.4, se observa que el tiempo de proliferación produce un cambio significativo en la absorbancia, además del tiempo de exposición y la concentración al TiO_2 ; estos factores afectan la variable respuesta de manera positiva, mientras que el método de síntesis del TiO_2 no tiene efectos estadísticamente significativos y, por lo tanto, no afecta de manera relevante la variable respuesta.

Para conocer cuáles son las diferencias significativas se realizó un *Test de Rangos Múltiples*, (ANEXO VI tablas A.14 a A.16), que compara los niveles de los factores por pares.

En primer lugar, en la tabla A.14 se indican los datos correspondientes a los distintos niveles o grupos que toma el factor concentración de TiO_2 , así como el tamaño de la muestra (*Porcentaje Recuento.*) y la media muestral obtenida para la variable de análisis (*Media*) en cada nivel. A la derecha aparece el campo

Grupos Homogéneos, que da las diferencias marcando cada grupo con uno o más asteriscos que se interpretan de la siguiente manera: se considera significativamente diferente, a un nivel de confianza determinado, a las medias de aquellos grupos que no tienen ningún asterisco en la misma columna; No se puede concluir que hayan diferencias entre los grupos en caso contrario. En este caso no aparecen diferencias significativas entre las concentraciones de TiO₂, en FPHN, de 50 ppm y 100 ppm, mientras que estas sí presentan diferencias significativas si se comparan con las demás concentraciones. Además, las concentraciones de 50 ppm, 75 ppm y 100 ppm aparecen como significativamente mejores, el promedio de concentración es mayor, que la concentración a 25 ppm. La segunda parte de la tabla presenta la misma información en diferente formato. Para cada posible par de grupos (*Contraste*) aparece la diferencia entre sus medias muestrales (*Diferencias*) y un asterisco si ésta es estadísticamente significativa.

En la tabla A.15 se observan los niveles que toma el factor método de síntesis de TiO₂, además del tamaño de la muestra y la media muestral, obtenidos para la variable de análisis en cada grupo. En el campo *Grupos Homogéneos* aparecen diferencias significativas entre los dos métodos de síntesis: sol-gel y Pechini; el método Pechini es ligeramente más significativo que el método sol-gel.

En la tabla A.16 se observan los niveles que toma el factor tiempo de exposición al TiO₂. El tamaño de la muestra y la media muestral obtenidos para la variable de análisis en cada grupo. En el campo *Grupos Homogéneos* aparecen diferencias significativas entre los dos tiempos de exposición al dióxido de titanio: 45 minutos y 90 minutos. Además, la exposición durante 90 minutos al TiO₂, es más significativa que durante 45 minutos.

El análisis anterior está soportado por las curvas de las figuras 6.5, gráfica de efectos principales, y 6.6, gráficas de superficies de respuesta.

Gráfico de Efectos principales para Absorbancia

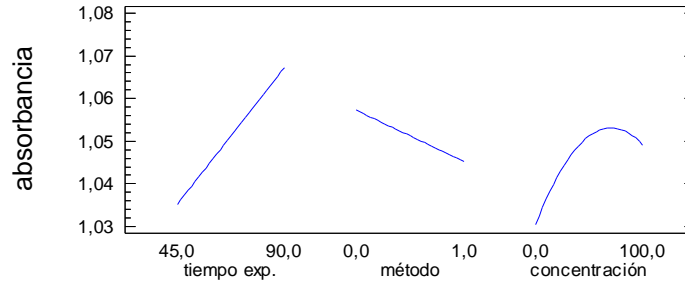
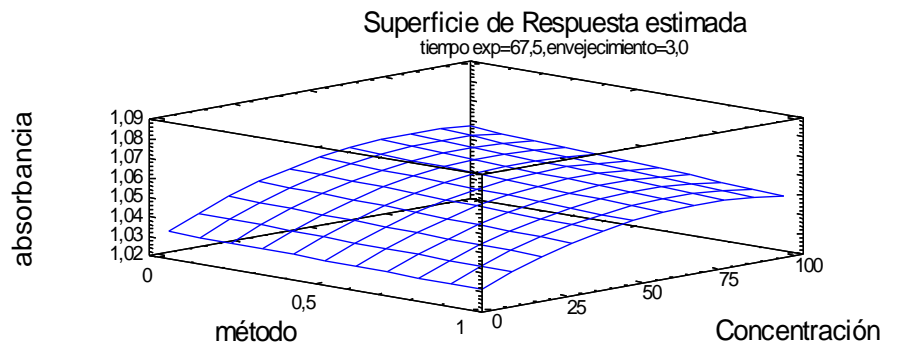
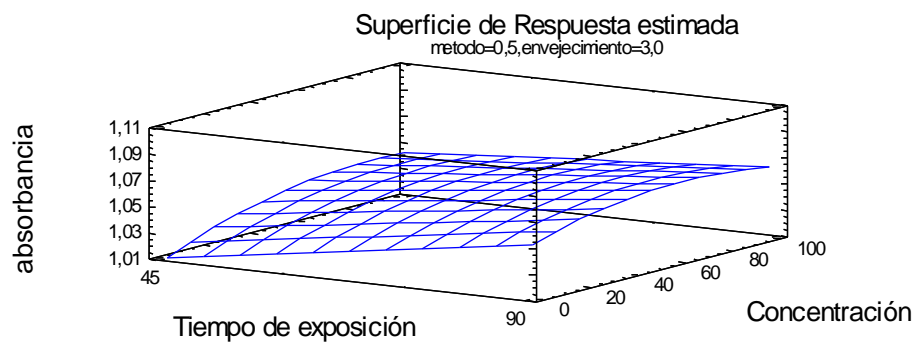


Figura 6.5. Gráfico de efectos principales, de las diferentes variables analizadas, considerando para el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre FPHN.

Las figuras 6.5 y 6.6 indican que los niveles de los factores estadísticamente más significativos, considerando el efecto del TiO_2 sobre los FPHN, corresponden a 90 minutos de exposición al dióxido de titanio, sintetizado por el método Pechini y con una concentración de ~84 ppm.



(a)



(b)

Figura 6.6. Graficas de superficie de respuesta: método vs concentración (a) y tiempo de exposición vs concentración (b), analizando el efecto del TiO₂, sintetizado por el método sol gel y Pechini, sobre FPHN.

Además, los valores de absorbancia se incrementaron a medida que aumentaba el tiempo de proliferación, tal como se observa en la grafica de *PARETO* (figura 6.4).

Las figuras 6.7 y 6.8, dan soporte a los resultados obtenidos estadísticamente ya que muestran que las curvas de crecimiento celular para diferentes concentraciones de TiO₂, presentan valores de densidad óptica mayores que la curva de crecimiento del control bajo (5% SFB), sin radiación. El control bajo proporciona las condiciones de menor actividad metabólica para las células, es decir, las condiciones mínimas de medio para que las células permanezcan vivas; por lo tanto, se puede concluir que la exposición de los FPHN a concentraciones entre 0 y 100 ppm de TiO₂, durante 45 y 90 minutos en presencia de este óxido sintetizado por sol gel o Pechini, no disminuye la actividad metabólica celular ni altera de las condiciones de cultivo.

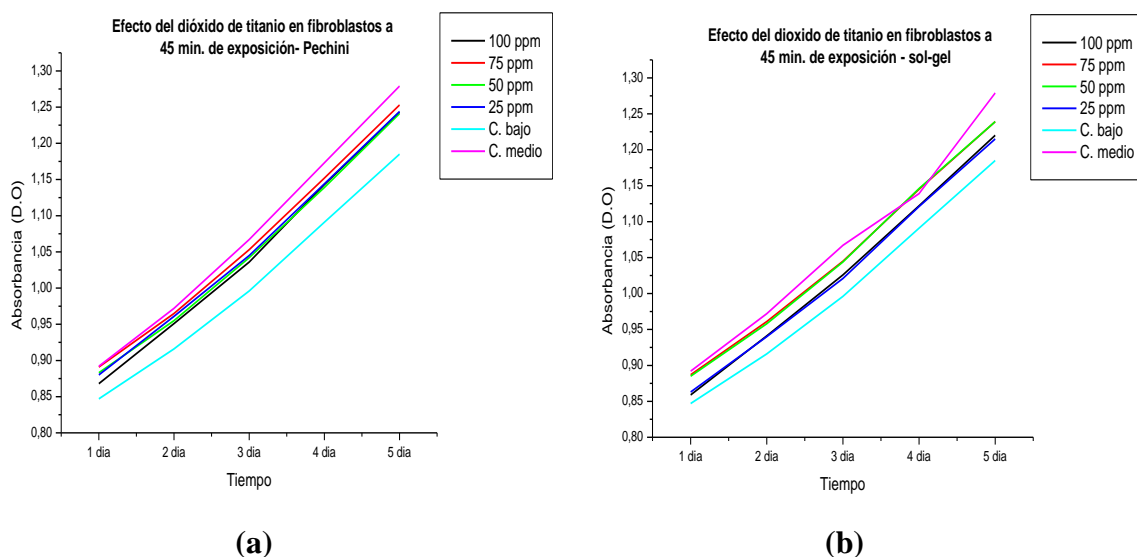


Figura 6.7. Proliferación de FPHN al exponer el sistema durante 45 minutos al dióxido de titanio (fase anatasa), obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

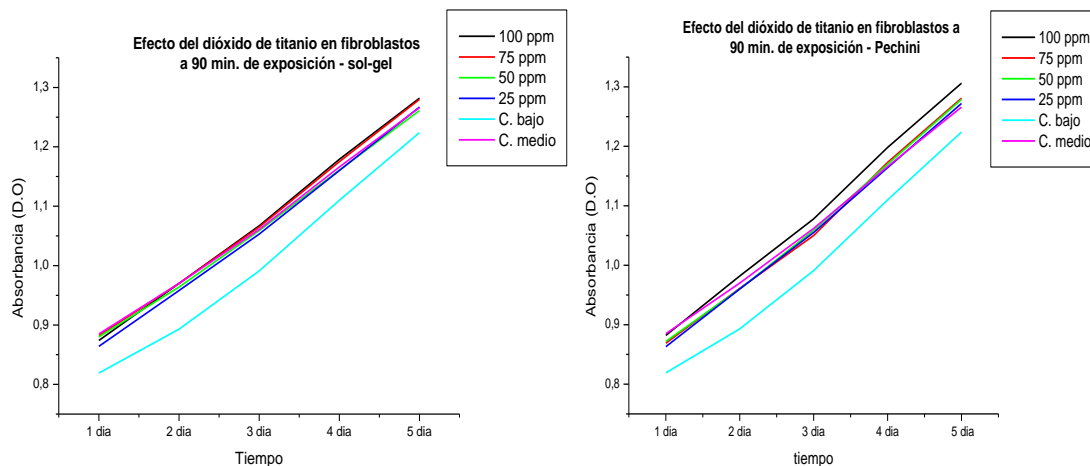


Figura 6.8. Proliferación de FPHN al exponer el sistema durante 90 minutos al dióxido de titanio (fase anatasa), obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, y los estudios realizados por otros investigadores [27], se puede concluir que para las concentraciones de TiO_2 , sintetizados por los dos métodos, a que fueron expuestos durante cierto tiempo los FPHN, en ausencia de radiación, no tienen efectos citotóxicos sobre ellas.

Además en las figuras anteriores (figuras 6.7 y 6.8), se puede observar que el tratamiento utilizado no produce efectos inhibitorios en la proliferación celular debido a que las curvas de crecimiento, a 45 y 90 minutos de exposición al TiO_2 sintetizado por los diferentes métodos y para diferentes concentraciones del óxido, tienen una tendencia creciente.

6.4.2. Efecto citotóxico del TiO_2 sobre cáncer de piel tipo melanoma

Los datos de las tablas 6.4 y 6.8 fueron analizados por medio del análisis de varianza y los resultados se muestran en el ANEXO VI tabla A.17; la figura 6.9 muestra que los datos experimentales se encuentran estadísticamente distribuidos.

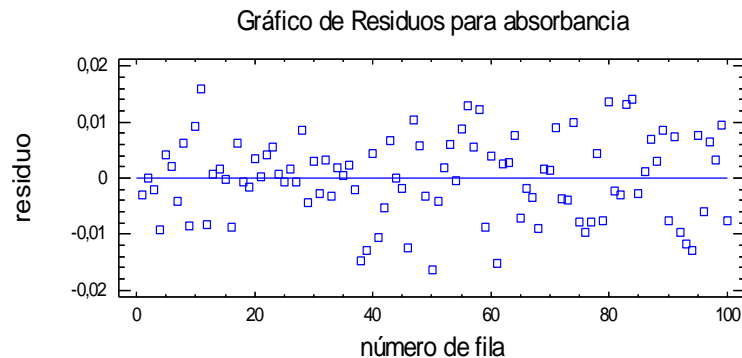


Figura 6.9. Gráfico de residuos de la Absorbancia para los datos obtenidos experimentalmente al considerar el efecto del TiO_2 , obtenido por los métodos sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Como se observa en el ANOVA, (ANEXO VI Tabla A.17), los valores P obtenidos para los factores: tiempo de exposición, concentración de TiO_2 , método de síntesis del TiO_2 y tiempo de proliferación, además de dos de las diversas interacciones entre estas variables, fueron menores que el nivel de significancia ($\alpha=0.05$) lo que proporciona un nivel de confianza del 95%; esto indica que los diversos factores y las dos interacciones tienen diferencias, por lo que presentan efectos estadísticamente significativos sobre la variable respuesta.

En la figura 6.10 se muestra el gráfico de Pareto que corresponde a la representación gráfica de la ANOVA y a la estandarización de los datos, presentando la variabilidad en absorbancia, en distintos segmentos separados, para cada uno de los efectos.

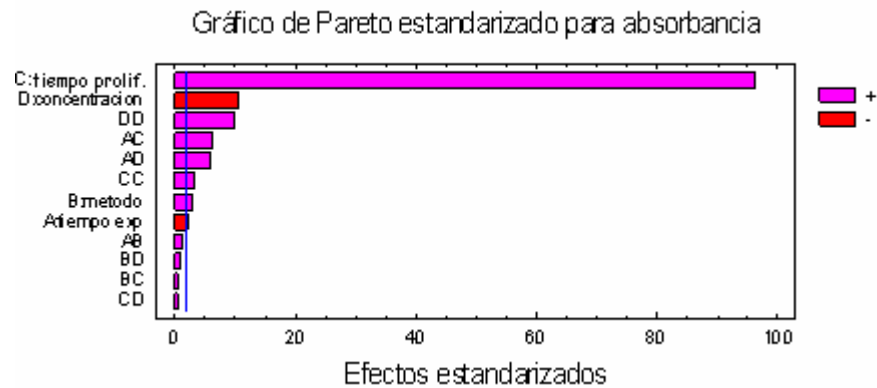


Figura 6.10. Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

En la gráfica de Pareto se observa que el tiempo de proliferación produjo un cambio significativo en la absorbancia. Además, el método de síntesis no ocasiona un cambio significativamente relevante y tanto el tiempo de proliferación como el método de síntesis afectan la variable respuesta de manera positiva. Por otro lado, concentración TiO_2 y el tiempo de exposición tienen efectos estadísticamente significativos y afectan la variable respuesta de manera negativa.

Para conocer cuáles eran las diferencias significativas se realizó un *Test de Rangos Múltiples* para comparar los las variables o grupos que toman los factores por pares (ANEXO VI tablas A.18 a A.20). En estas tablas se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que sean significativamente diferentes unas de otras.

La tabla A.18 indica los distintos niveles que toma el factor “Concentración de TiO_2 ”, así como el tamaño de la muestra y la media muestral obtenida para la variable de análisis en cada grupo. En el campo de *Grupos Homogéneos* no aparecieron diferencias significativas entre las concentraciones de TiO_2 ,

considerando el cáncer de piel tipo melanoma a: 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm y 100 ppm; la diferencia de éstas se hizo evidente, considerando el control medio (0 ppm de TiO₂). Además, las concentraciones a 100 ppm y 0 ppm (control medio) aparecen como significativamente mejores (el promedio de concentración es mayor) que para las demás concentraciones.

En la tabla A.19 se observan los niveles que toma el factor “método de síntesis de TiO₂”. En el campo *Grupos Homogéneos* aparecen diferencias significativas entre los dos métodos de síntesis: sol-gel y Pechini. En este análisis, el método sol-gel es ligeramente más significativo que el método Pechini.

En la tabla A.20 se observan los niveles que toma el factor “tiempo de exposición” al TiO₂, así como la media muestral obtenida para la variable de análisis en cada grupo. En el campo *Grupos Homogéneos* aparecen diferencias significativas entre los dos tiempos de exposición al dióxido de titanio: 45 minutos y 90 minutos. Además, a exponer ante TiO₂ durante 45 minutos es ligeramente más significativo que una exposición durante 90 minutos.

El análisis anterior está soportado por las curvas de las figuras 6.11, gráfica de efectos principales, y 6.12, gráficas de superficies de respuesta.

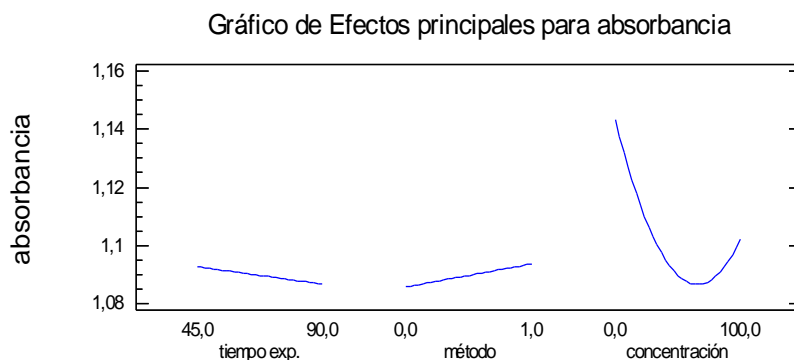


Figura 6.11. Gráfico de efectos principales de la absorbancia considerando las diferentes variables analizadas para estudiar el efecto del TiO₂, obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Las figuras 6.11 y 6.12 indican que los niveles de los factores estadísticamente más significativos, considerando el efecto del TiO_2 sobre el cáncer de piel tipo melanoma, se encuentra a 45 minutos de exposición al dióxido de titanio, sintetizado por el método sol-gel. En cuanto a la concentración de TiO_2 la muestra estadísticamente mas significativa es la que no tiene presencia del óxido (0 ppm de TiO_2).

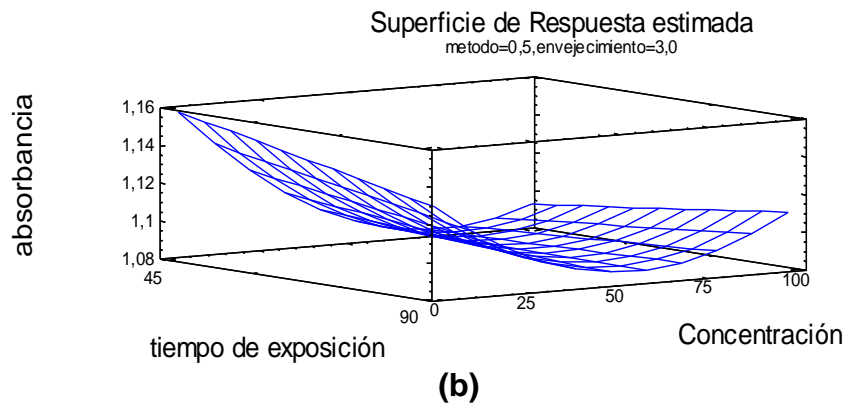
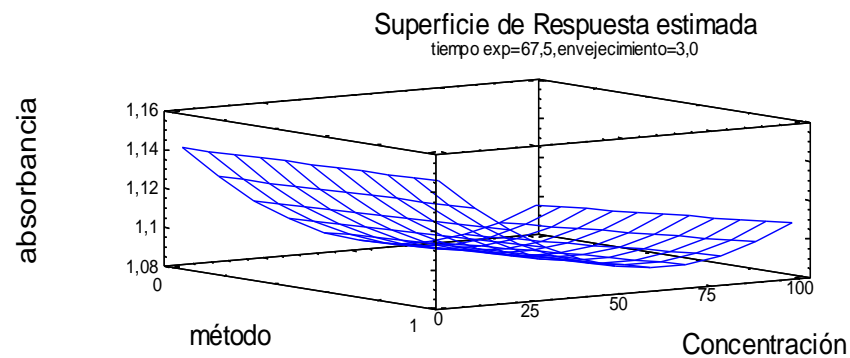


Figura 6.12. Gráficas de superficie de respuesta: del método de síntesis vs concentración (a) y del tiempo de exposición vs concentración (b), considerando el efecto del TiO_2 , obtenido por el método sol gel y Pechini, sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Además, los valores de absorbancia se incrementaron a medida que aumentaba el tiempo de proliferación, tal como se observa en la grafica de *PARETO* (figura 6.10).

Las figuras 6.13 y 6.14 dan soporte a los resultados obtenidos estadísticamente. La figura 6.13(a), muestra que para una exposición durante 45 minutos, tomando concentraciones de 50 ppm y 100 ppm de dióxido de titanio obtenido por el método sol gel, se obtuvieron valores de densidad óptica menores que a los de la curva de crecimiento de control bajo (5% SFB) sin radiación.

En la figura 6.13(b) se observa que para una exposición durante 45 minutos, para todas las concentraciones utilizadas de TiO_2 obtenido por el método Pechini, se presentaron valores de densidad óptica menores a los de la curva de crecimiento de control bajo (5% SFB) sin radiación. Como se sabe, el control bajo proporciona las condiciones mínimas de medio para que las células cancerígenas permanezcan vivas, por tanto se puede concluir que la exposición de las células de cáncer de piel al TiO_2 , con concentraciones entre 25 y 100 ppm, durante 45 minutos disminuyó la actividad metabólica celular, alterando las condiciones de cultivo.

La figura 6.14 muestran que las curvas de crecimiento celular, para las diferentes concentraciones utilizadas de TiO_2 , obtenido por las dos rutas químicas, presentaron valores de densidad óptica mayores a los de la curva de crecimiento del control bajo (5% SFB) sin radiación por lo que, se puede concluir que la exposición de las células de cáncer de piel al TiO_2 sintetizado por el método sol gel o Pechini, con concentraciones entre 0 y 100 ppm durante 90 minutos, no disminuyo la actividad metabólica celular ni altero las condiciones del cultivo.

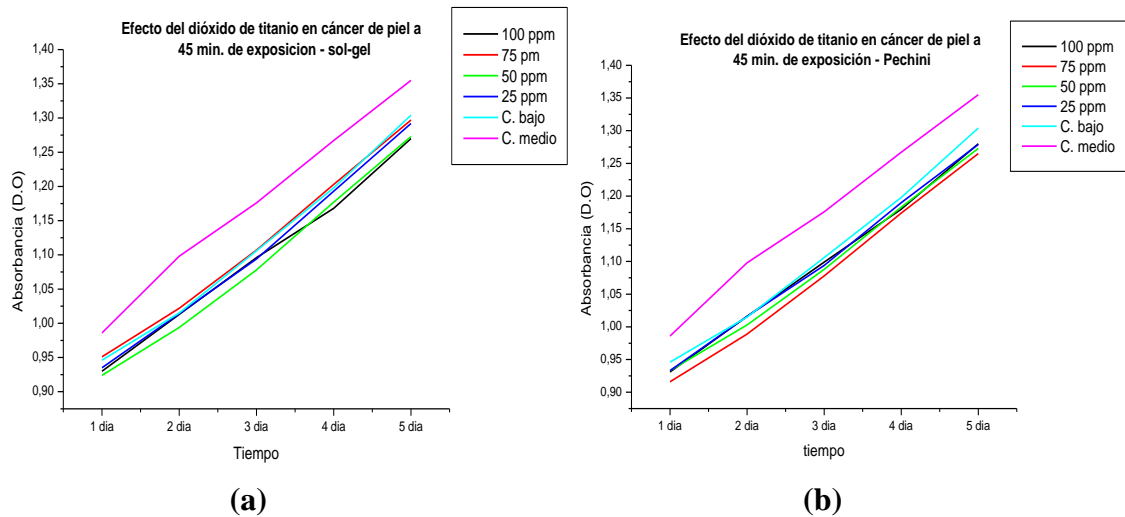


Figura 6.13. Proliferación de cáncer de piel tipo melanoma (densidad óptica en función del tiempo), al exponer el sistema durante 45 minutos al dióxido de titanio, fase anatasa, obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

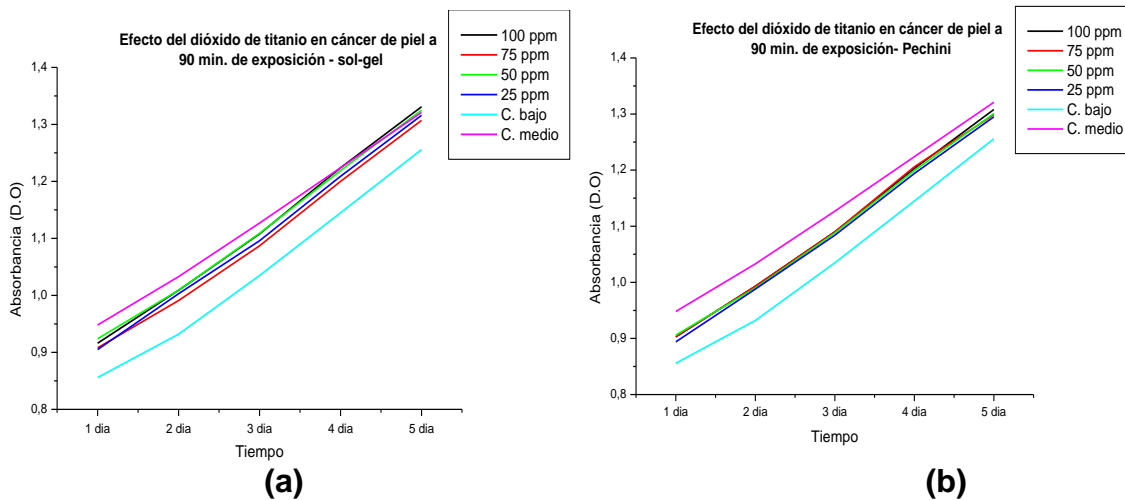


Figura 6.14. Proliferación de cáncer de piel tipo melanoma (densidad óptica en función del tiempo), al exponer el sistema durante 90 minutos al dióxido de titanio, fase anatasa, obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

Los resultados obtenidos y los estudios realizados por otros investigadores [13,27], indican que para las concentraciones utilizadas de TiO_2 sintetizados por los dos métodos, para ciertos tiempo de exposición, en las células de cáncer de piel, en ausencia de radiación, no presentaron efectos citotóxicos sobre ellos.

Además, en las figuras anteriores (figuras 6.13 y 6.14), se puede observar que el tratamiento utilizado no produjo efectos inhibitorios en la proliferación celular,

condición que se evidencia considerando las curvas de crecimiento; para exposiciones durante 45 y 90 minutos al TiO_2 obtenido por diferentes métodos y distintas concentraciones de TiO_2 , presentaron una tendencia de aumento con el tiempo.

6.4.3. Efecto citotóxico de la radiación sobre fibroblastos de piel humana normal

Los datos de densidad óptica de la columna “Control Medio” de las tablas 6.2 y 6.3, fueron analizados por medio del ANOVA y los resultados se muestran en el ANEXO VI tabla A.21. La figura 6.15 muestra que los datos experimentales se encuentran estadísticamente distribuidos.

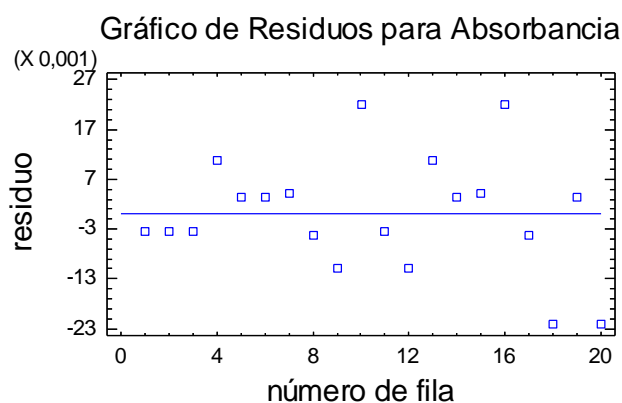


Figura 6.15. Gráfico de residuos para la Absorbancia de los datos obtenidos experimentalmente considerando el efecto de la radiación sobre los FPHN.

Según el análisis de varianza, (ANEXO VI Tabla A.21), el tiempo de proliferación y la radiación fueron los factores que presentaron un valor P menor que el nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Esto significa que estos dos factores tuvieron una influencia estadísticamente significativa sobre los valores de la densidad óptica. El factor “tiempo de exposición a la radiación” presenta un valor mayor de valor P, al igual que sus interacciones.

En la figura 6.16 se muestra el gráfico de Pareto (representación gráfica de la ANOVA y la estandarización de los datos) que presenta la variabilidad en absorbancia, en distintos segmentos separados, para cada uno de los efectos considerados.

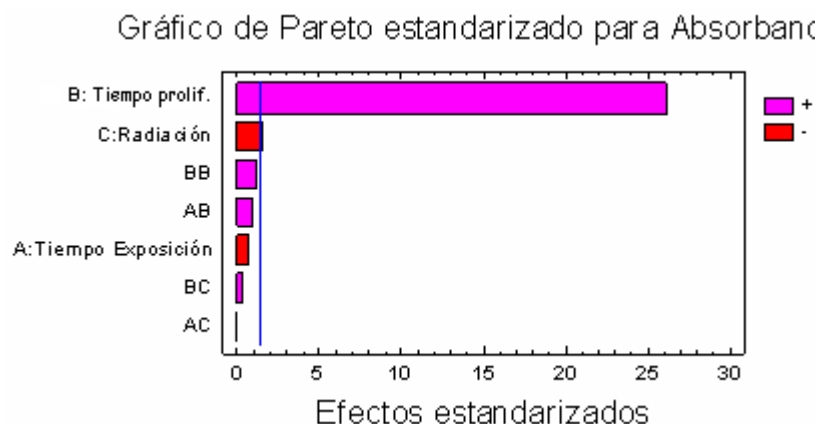


Figura 6.16. Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA, considerando el efecto de la radiación sobre FPHN.

En la gráfica de Pareto, figura 6.16, se observa que el tiempo de proliferación produjo un cambio estadísticamente significativo en la absorbancia y la afecto de manera positiva. Por otro lado, la radiación presentó un leve nivel de significancia en la variable respuesta y afecto negativamente. El tiempo de exposición a la radiación no tuvo efectos estadísticamente significativos, por lo tanto no afecto de manera relevante la variable respuesta.

Para conocer cuáles fueron las diferencias presentes entre los niveles se realizó un *Test de Rangos Múltiples* que comparó los grupos o niveles por pares (ANEXO VI tablas A.22 y A.23).

En la tabla A.22 se observan los datos correspondientes a los dos niveles que toma el factor Radiación, así como el tamaño de la muestra (*Porcentaje Recuento*) y la media muestral obtenida para la variable de análisis (*Media*) en cada grupo. En la columna *Grupos Homogéneos* aparecen diferencias

significativas entre los FPHN expuestos o no a la radiación, para un nivel de confianza del 95,0%. Además, los FPHN no expuestos a la radiación aparecen ligeramente más significativos que los que han sido irradiados.

En la tabla A.23 aparecen los niveles que toma el factor “tiempo de exposición a la radiación”, En la columna *Grupos Homogéneos*, no aparecen diferencias apreciables entre los tiempos de exposición a la radiación.

El análisis anterior está soportado por las figuras 6.17, gráfica de efectos principales, y 6.18, gráficas de superficies de respuesta.

Gráfico de Efectos principales para Absorbancia

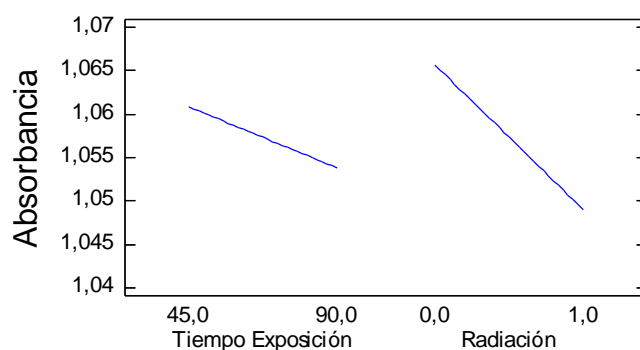


Figura 6.17. Gráfico de efectos principales de las diferentes variables analizadas considerando el efecto de la radiación sobre los FPHN.

La figura 6.17 indica que los niveles de los factores estadísticamente más significativos para el efecto de la radiación sobre los FPHN, presentan una reducción de la densidad óptica, al pasar de 45 minutos a 90 minutos de exposición, al igual que al pasar a ser irradiados.

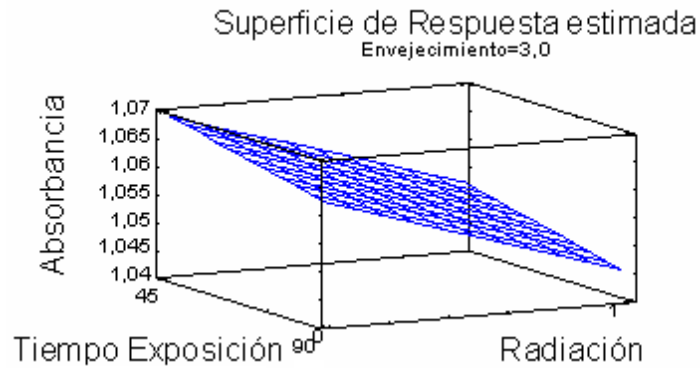


Figura 6.18. Grafica de superficie de respuesta del tiempo de exposición vs radiación, considerando el efecto de la radiación sobre FPHN.

La figura 6.18 corrobora la información anterior y muestra que los datos de mayor absorbancia corresponde a los FPHN sin radiación; lo cual está soportado por el gráfico de interacción de la figura 6.19.

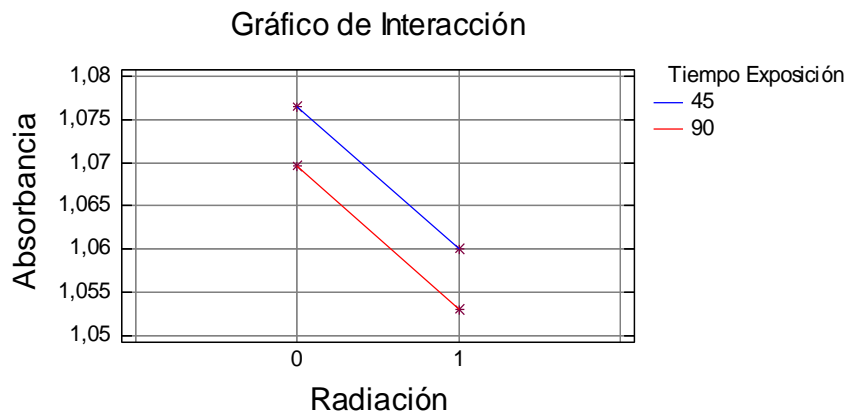


Figura 6.19. Interacción de los factores tiempo de exposición y radiación para los FPHN.

La figura 6.19 muestra que existe una interrelación entre el tiempo de exposición y la presencia de radiación e indica que las condiciones de menor densidad óptica para FPHN, dentro del rango de datos estudiados, corresponden a 90 minutos de exposición con radiación. Para evaluar la intensidad de la interacción se determinó el efecto de un factor manteniendo el otro constante. Cuando se fijó el factor “sin-radiación” el efecto del tiempo fue de 0.008 y cuando se fijó el factor

“con radiación” el efecto del tiempo fue de 0.007, estos valores indican una interacción débil ya que las interacciones fuertes se presentan para valores cercanos a 30 [46].

Además, los valores de absorbancia se incrementaron a medida que se aumentó el tiempo de proliferación tal como se observa en la gráfica de *PARETO* (figura 6.16).

Las figura 6.20 muestra las curvas de crecimiento de los controles medios (0 ppm de TiO₂, 10% SFB) y de los controles bajos (0 ppm de TiO₂, 5% SFB), con radiación y sin radiación, para 45 minutos y 90 minutos de exposición. De esta manera fue posible evaluar el efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad metabólica, comparando el control medio con radiación contra el control bajo sin radiación. De nuevo el control bajo, sin radiación, representó las condiciones mínimas de vida celular.

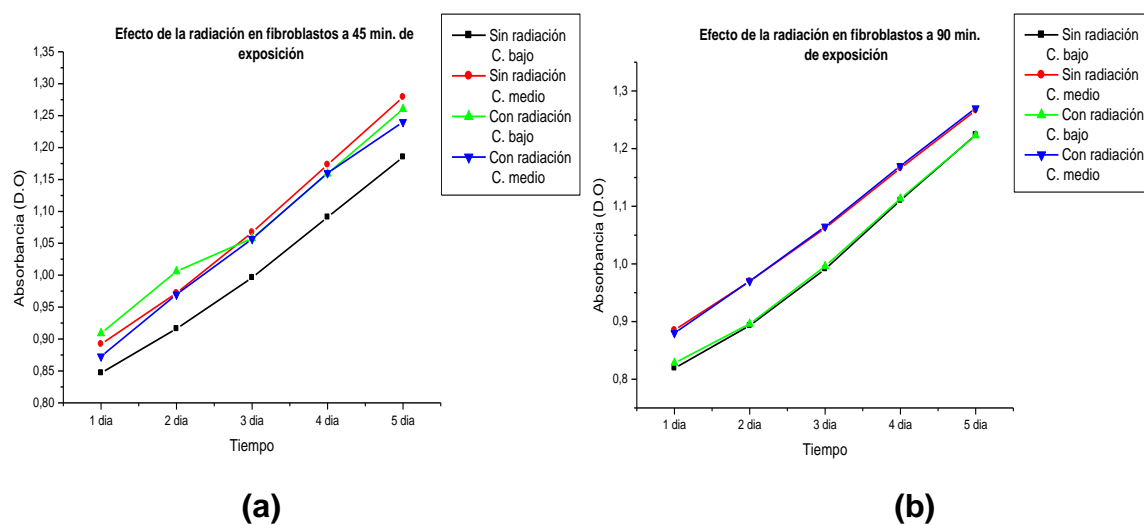


Figura. 6.20. Proliferación de los FPHN (densidad óptica en función del tiempo) expuestos a: 45 minutos a la radiación (a) y 90 minutos a la radiación (b).

La gráfica 6.20(a) mostró que la curva de crecimiento para el control medio con radiación tenía valores muy cercanos a la curva de control medio sin radiación y

estaba por encima de la curva del control bajo sin radiación. Lo anterior indica que cuando los FPHN fueron expuestos a la radiación, por espacio de 45 minutos, no se produjo un cambio apreciable de la actividad metabólica, además no se obtuvieron valores de densidad óptica menores que el control bajo sin radiación.

Por otro lado, la gráfica 6.20(b) muestra que la curva de crecimiento del control medio con radiación presentó valores muy similares de densidad óptica que para la curva de crecimiento de control medio sin radiación y muy superiores que para la curva de control bajo sin radiación. Esto indica, que sucede lo mismo que para la exposición durante 45 minutos, no se produjo un cambio apreciable de la actividad metabólica, además no se obtuvieron valores de densidad óptica menores que para el control bajo sin radiación, resultados que dan soporte al análisis estadístico realizado en la gráfica 6.19.

Las curvas de crecimiento también muestran que no existe efecto inhibitorio de la proliferación celular ya que los valores de densidad óptica crecen con el tiempo.

6.4.4. Efecto citotóxico de la radiación sobre cáncer de piel tipo melanoma

Los datos de densidad óptica de la columna “Control Medio” de las tablas 6.4, y 6.5 fueron analizados por medio del ANOVA y los resultados se muestran en el ANEXO VI tabla A.24. La figura 6.21 muestra que los datos experimentales se encuentran estadísticamente distribuidos.

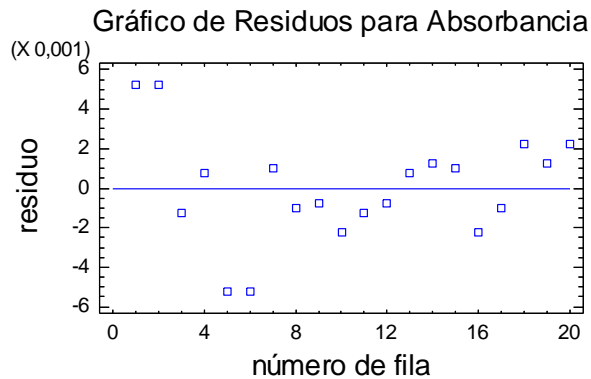


Figura 6.21. Gráfico de residuos para la Absorbancia correspondiente a los datos experimentales que indican el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Según el análisis de varianza, (ANEXO VI tabla A.24), el tiempo de proliferación, la radiación y el tiempo de exposición, presentan valores P menores que el nivel de significancia ($\alpha=0,05$). Esto indica que los tres efectos principales tienen una influencia estadísticamente significativa sobre los valores de la densidad óptica.

En la figura 6.22 se muestra el gráfico de Pareto que es la representación gráfica de la ANOVA considerando la estandarización de los datos, presentando la variación de la absorbancia, en distintos segmentos separados, para cada uno de los efectos.

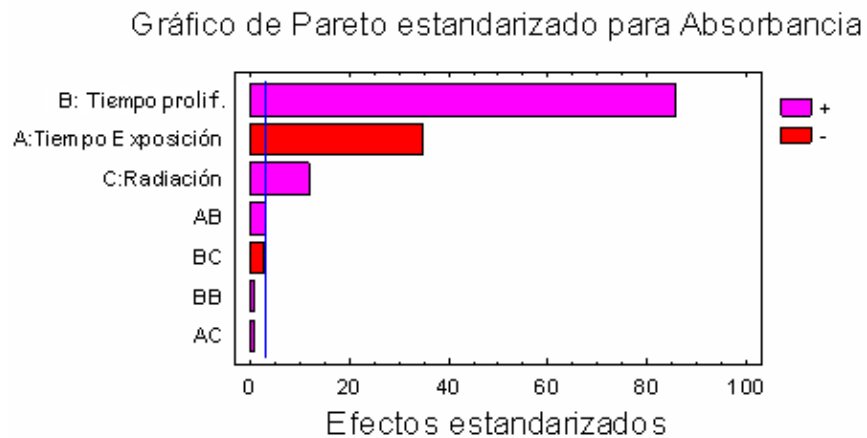


Figura 6.22. Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

En la gráfica de Pareto, figura 6.22, se observa que el tiempo de proliferación produce un cambio significativo en la absorbancia y la afectan de manera positiva, al igual que la radiación, mientras que el tiempo de exposición a la radiación, que también afecta significativamente la variable respuesta, pero lo hace de manera negativa. En este análisis ninguna de las interacciones afecta de manera importante la variable respuesta.

Para conocer cuáles eran las diferencias significativas se realizó un *Test de Rangos Múltiples* para comparar los grupos por pares (ANEXO VI tablas A.25 y A.26).

En la tabla A.25, se observan los datos de los dos niveles que toma el factor radiación. En la columna *Grupos Homogéneos*, aparecen diferencias significativas entre las células de cáncer de piel expuestas o no a la radiación. Además, las células cancerígenas no expuestas a la radiación aparecen ligeramente mejor, significativamente, que las irradiadas.

En la tabla A.26 se indican los niveles que toma el factor “tiempo de exposición” a la radiación. En este análisis aparecen diferencias significativas entre las células de cáncer de piel expuestas durante 45 y 90 minutos a la radiación; además, las células expuestas 45 minutos a la radiación fueron significativamente mejor que las expuestas durante 90 minutos.

El análisis anterior está soportado por las figuras 6.23, gráfica de efectos principales, y 6.24, gráficas de superficies de respuesta.

Gráfico de Efectos principales para Absorbancia

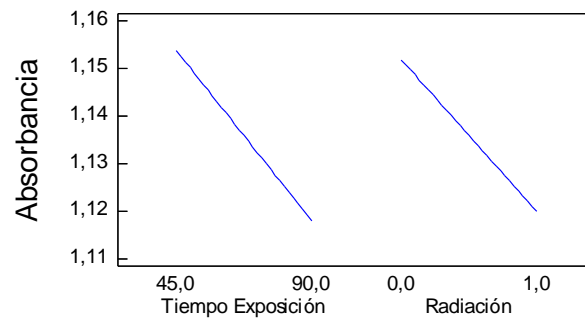


Figura 6.23. Gráfico de efectos principales, de las diferentes variables analizadas, considerando el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

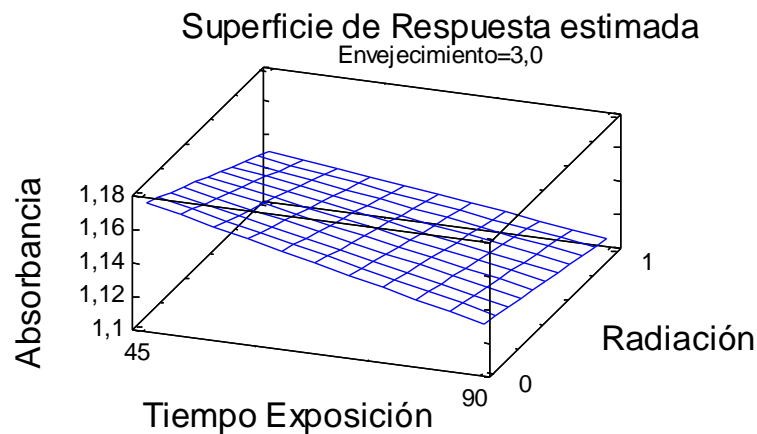


Figura 6.24. Grafica de la superficie de respuesta del tiempo de exposición vs radiación, analizando para el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Las figuras 6.23 indican que los niveles de los factores estadísticamente más significativos, considerando el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma, presentan una reducción de la densidad óptica, al pasar de 45 minutos a 90 minutos de exposición, al igual que al pasar las células de cáncer a ser irradiados. La figura 6.24 corrobora la información anterior y muestra que los datos de mayor absorbancia corresponden a las células de cáncer de piel tipo melanoma sin radiación. Además, los valores de absorbancia se

incrementaron a medida que aumentaba el tiempo de proliferación, tal como se observa en la grafica de *PARETO* (figura 6.22).

La figura 6.25 muestra las curvas de crecimiento de las células cancerígenas, considerando los controles medios (0 ppm de TiO₂, 10% SFB) y los controles bajos (0 ppm de TiO₂, 5% SFB), con radiación y sin radiación, tomando tiempos de exposición de 45 y 90 minutos, respectivamente; de esta manera se evaluó el efecto de la radiación ultravioleta sobre la actividad metabólica de las células cancerígenas, comparando el control medio con radiación y el control bajo sin radiación. Nuevamente, el control bajo sin radiación representa las condiciones mínimas para que vivan las células.

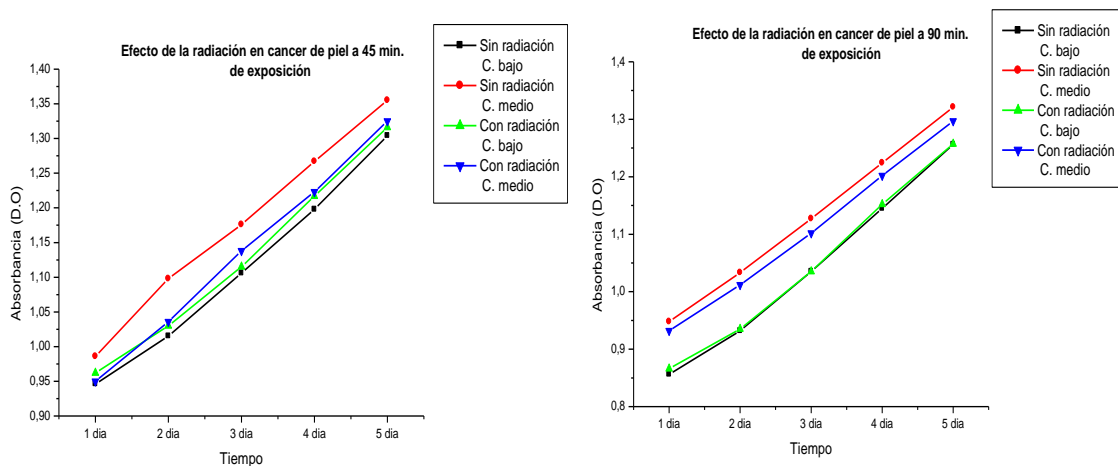


Figura 6.25. Proliferación (densidad óptica en función del tiempo) de cáncer de piel tipo melanoma, expuestos a: 45 minutos a la radiación (a) y 90 minutos a la radiación (b).

La figura 6.25(a) muestra que la curva de crecimiento correspondiente al control medio con radiación está ubicada entre la curva de crecimiento de control medio sin radiación y la curva del control bajo con radiación. Esto indica que cuando las células cancerígenas se exponen a la radiación, por un espacio de 45 minutos, se produce una disminución de la actividad metabólica; la exposición a la radiación no produce valores de densidad óptica menores que para el control bajo sin radiación.

Por otro lado, la gráfica 6.25(b) muestra que la curva de crecimiento correspondiente al control medio con radiación se encuentra entre la curva de control medio sin radiación y la curva del control bajo sin radiación. Esto indica que cuando las células cancerígenas son expuestas a la radiación, durante 90 minutos, se produce una disminución de la actividad metabólica pero los valores de densidad óptica no son menores que los del control bajo sin radiación.

Las curvas de crecimiento también muestran que no existe efecto inhibitorio de la proliferación celular ya que los valores de densidad óptica aumentaron con el tiempo.

6.4.5. Efecto citotóxico de los factores concentración de TiO₂ y tiempo de exposición, con radiación, sobre los fibroblastos de piel humana normal.

Se realizó un Análisis de Varianza para los datos de la tabla 6.3 y 6.7, y los resultados de la ANOVA se muestran en el ANEXO VI (tabla A.27). La figura 6.26 muestra que los datos experimentales se encuentran estadísticamente distribuidos.

El Análisis de Varianza, (ANEXO VI tabla A.27), muestra que los cuatro factores: tiempo de proliferación, concentración de TiO₂, método de síntesis del TiO₂ y tiempo de exposición, tanto a la radiación como al TiO₂, tienen un valor P inferior al valor de significancia ($\alpha=0,05$); esto indica que los cuatro factores influyeron significativamente sobre la densidad óptica, variable respuesta. Adicionalmente, la estadística muestra que las interacciones concentración-método y tiempo de proliferación - tiempo de exposición, también son significativas y afectan la variable respuesta.

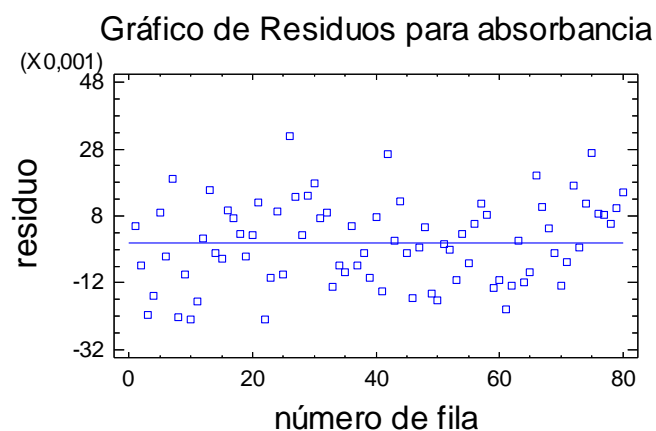


Figura 6.26. Gráfico de residuos para la Absorbancia obtenido de los datos experimentales al considerar el efecto del TiO_2 y la radiación sobre FPHN.

En la figura 6.27 se muestra el gráfico de Pareto que indica la estandarización de los datos, presentando la variabilidad en la absorbancia en distintos segmentos separados, considerando cada uno de los efectos.

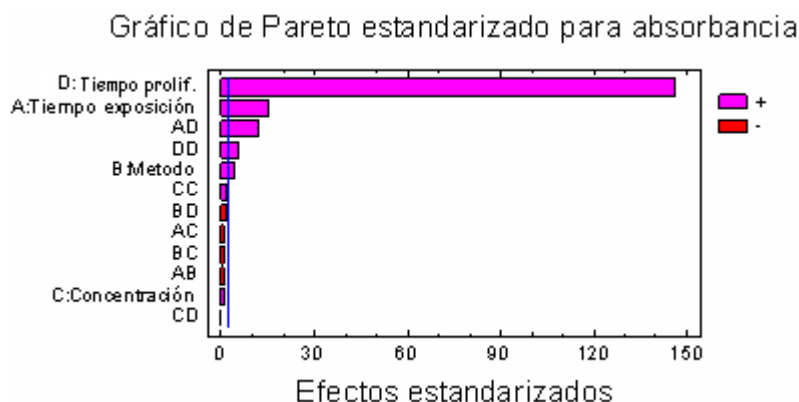


Figura 6.27. Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto de la radiación y el TiO_2 sobre los FPHN.

En la gráfica de Pareto se observa que el tiempo de proliferación, el tiempo de exposición y el método de síntesis del dióxido de titanio, producen un cambio estadísticamente significativo en la absorbancia y la afectan de manera positiva; por otro lado, la concentración del TiO_2 , presentó un leve nivel de significancia en la variable respuesta y la afectó positivamente.

Para conocer cuáles eran las diferencias significativas, se realizó un *Test de Rangos Múltiples* que permitió comparar los grupos por pares (ANEXO VI tablas A.28 a A.30).

En la tabla A.28 se observan los datos de los cuatro niveles que toma el factor “Concentración de TiO_2 ”. En la columna *Grupos Homogéneos* no aparecen diferencias significativas entre los FPHN expuestos a 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm de TiO_2 , en un nivel de confianza 95,0%. Además, los FPHN expuestos a 100 ppm de TiO_2 aparecen ligeramente mejor, significativamente, que los expuestos a otras concentraciones.

En la tabla A.29 aparecen los dos niveles que toma el factor “tiempo de exposición al TiO_2 ”. En este análisis son evidentes las diferencias significativas entre los tiempos de exposición al TiO_2 y a la radiación. Además, los FPHN radiados expuestos durante 90 minutos al TiO_2 presentan mejor significancia que los expuestos durante 45 minutos.

Por otro lado en la tabla A.30, aparecen los dos niveles que toma el factor “método de síntesis del TiO_2 ”. En este análisis aparecen diferencias significativas entre los dos métodos de síntesis: sol gel y Pechini, pero los FPHN expuestos al TiO_2 sintetizado por el método sol gel aparece con mejor significancia que los expuestos al TiO_2 sintetizado por el método Pechini.

El análisis anterior esta soportado por las figuras 6.28, gráfica de efectos principales, y 6.29, gráficas de superficies de respuesta.

Gráfico de Efectos principales para absorbancia

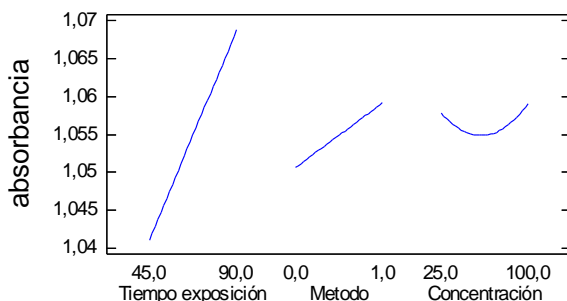
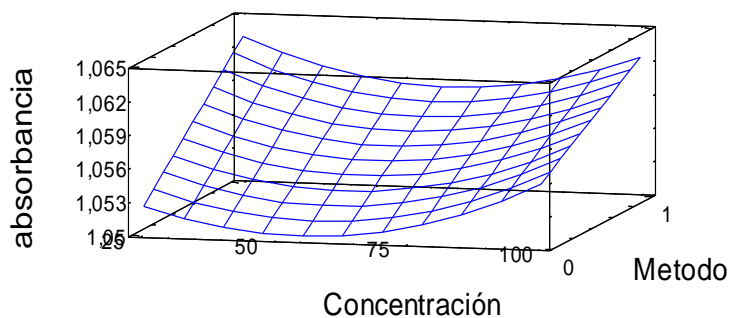


Figura 6.28. Gráfico de efectos principales de las diferentes variables analizadas, considerando el efecto de la radiación y el TiO_2 sobre los FPHN.

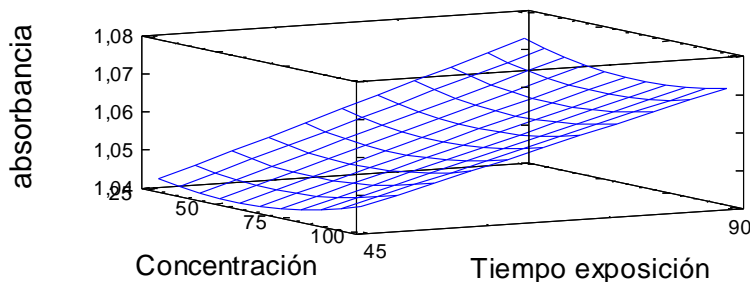
La figura 6.28 indica que los niveles de los factores estadísticamente más significativos para el efecto de la radiación y el TiO_2 , sobre FPHN, corresponden a los expuesto durante 90 minutos, a una concentración de 100 ppm de TiO_2 sintetizado por el método sol gel, conclusión que se puede corroborar con los gráficos de superficie respuesta, figura 6.29.

Superficie de Respuesta estimada
Tiempo exposición=67,5,Envejecimiento=3,0

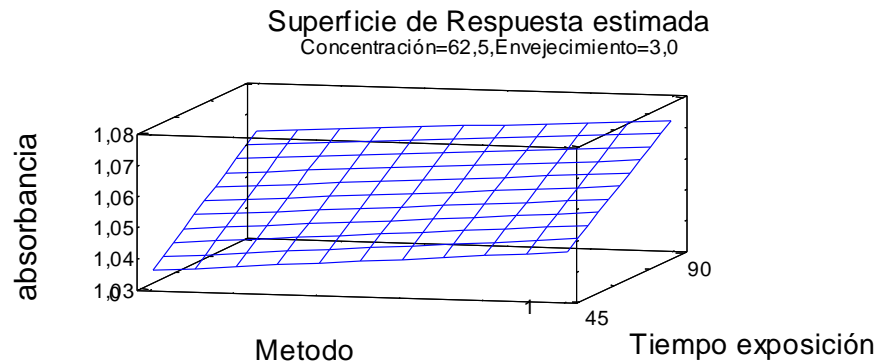


(a)

Superficie de Respuesta estimada
Metodo=0,5,Envejecimiento=3,0



(b)



(c)

Figura 6.29. Gráficas de superficie de respuesta para la concentración de TiO_2 vs método de síntesis (a), concentración de TiO_2 vs tiempo de exposición (b) y el método de síntesis vs tiempo de exposición (c), analizando el efecto de la radiación y el TiO_2 sobre los FPHN.

Además, los valores de absorbancia se incrementaron a medida que se aumentó el tiempo de proliferación, como se puede observar en la gráfica de *PARETO* (figura 6.27).

El efecto del tiempo de radiación y la exposición a TiO_2 , puede ser observado en las curvas de proliferación correspondientes a 45 y 90 minutos de exposición (figuras 6.30 y 6.31), sintetizado el TiO_2 por sol gel y Pechini. En las figuras 6.30(a) y 6.30(b), cuando se utilizó TiO_2 sintetizado por los métodos sol gel y Pechini con una exposición de 45 minutos, se observa que las curvas de crecimiento de los FPHN, para diferentes concentraciones de TiO_2 fueron superiores a los valores de control bajo sin radiación. Por otro lado, en las graficas 6.31(a) y 6.31(b), donde se utilizó el dióxido de titanio sintetizado por los métodos sol gel y Pechini para una exposición de 90 minutos, también se observa que las curvas de crecimiento de los FPHN, para diferentes concentraciones de TiO_2 , fueron superiores a las de control bajo sin radiación. Este resultado confirmó que el efecto fotocatalítico del TiO_2 , sobre los FPHN, no presentó un efecto tóxico para los dos tiempos de exposición estudiados.

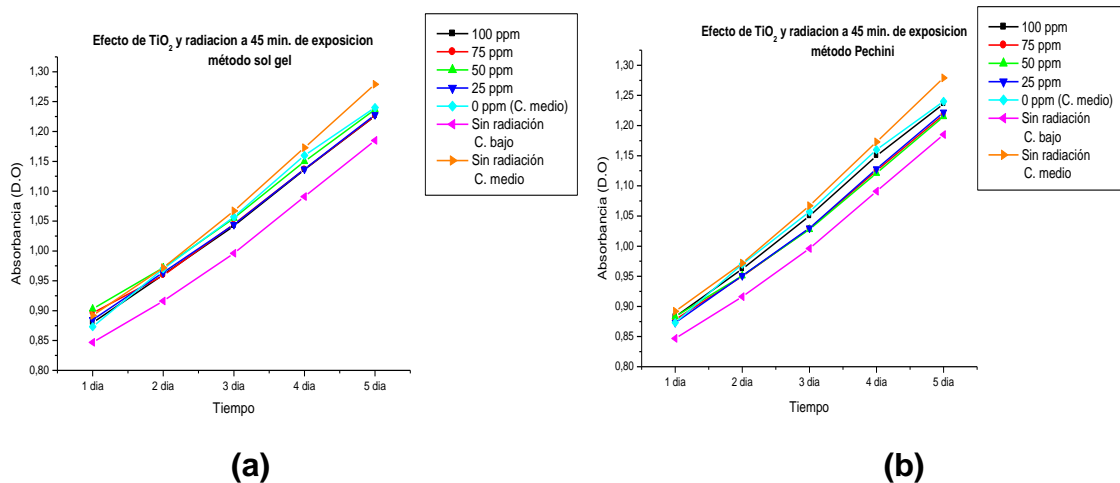


Figura 6.30. Proliferación de los FPHN para 45 minutos de exposición a la radiación, tomando a diferentes concentraciones de TiO_2 sintetizados por: el método sol gel (a) y el método Pechini (b).

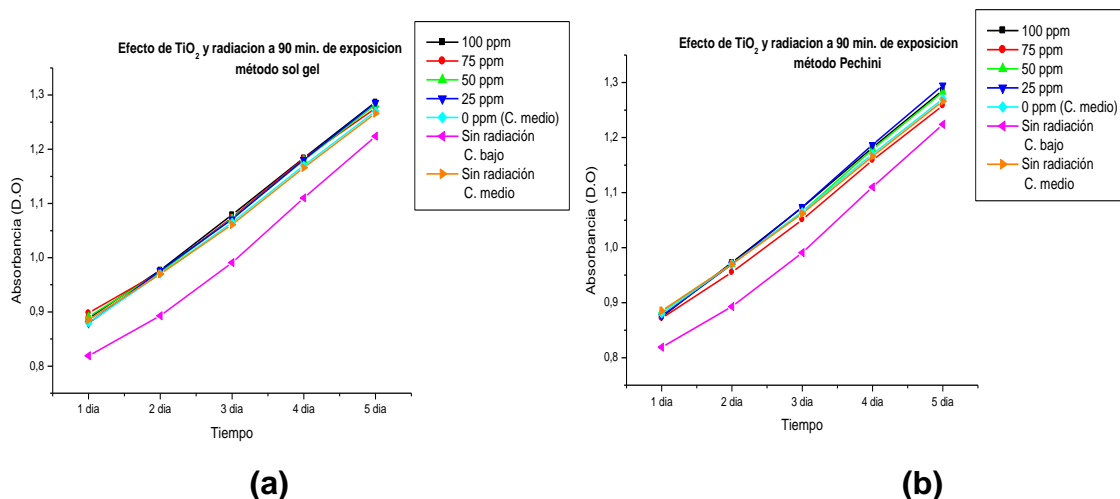


Figura 6.31. Proliferación de los FPHN para 90 minutos de exposición a la radiación, tomando a diferentes concentraciones de TiO_2 sintetizados por: el método sol gel (a) y el método Pechini (b).

Además, se puede observar en las curvas de crecimiento, figuras 6.30 y 6.31, que el tratamiento fotocatalítico no causó inhibición en la proliferación de los FPHN ya que, tanto para 45 minutos como a 90 minutos de exposición, la densidad óptica creció con el paso del tiempo.

6.4.6. Efecto citotóxico de los factores concentración de TiO₂ y tiempo de exposición, con radiación, sobre cáncer de piel tipo melanoma

Se realizó un Análisis de Varianza para los datos de la tabla 6.5 y 6.9, y los resultados de la ANOVA se muestran en ANEXO VI tabla A.31. La figura 6.32 muestra que los datos experimentales se encuentran estadísticamente distribuidos.

El Análisis de Varianza (ANEXO VI tabla A.31), muestra que los cuatro factores: tiempo de proliferación, concentración de TiO₂, método de síntesis del TiO₂ y tiempo de exposición, tanto a la radiación como al TiO₂, presentaron un valor P inferior al valor de significancia ($\alpha=0,05$), lo que indica que los cuatro factores influyeron significativamente sobre la densidad óptica (variable respuesta). Adicionalmente, el análisis estadístico muestra que cuatro de las interacciones, entre estos factores, también fueron significativas e influyeron en la variable respuesta.

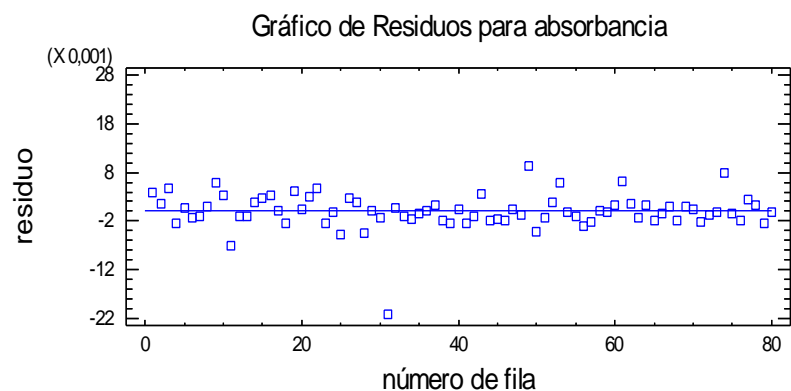


Figura 6.32. Gráfico de residuos para la Absorbancia correspondientes a datos experimentales del efecto del TiO₂ y la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

En la figura 6.33 se ilustra el gráfico de Pareto que muestra la estandarización de los datos presentando la variabilidad en absorbancia, en distintos segmentos separados, para cada uno de los efectos.

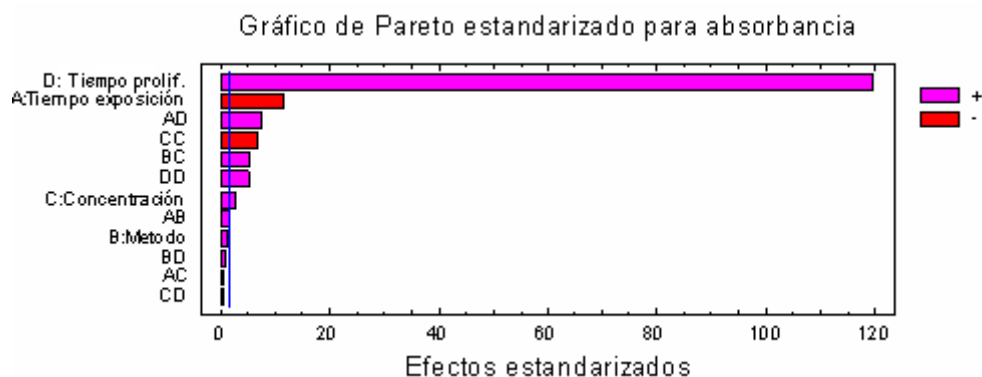


Figura 6.33. Gráfico de Pareto de las diferentes variables analizadas en la ANOVA considerando el efecto de la radiación y el TiO_2 sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

En la gráfica de Pareto se observa que el tiempo de proliferación y la concentración produjeron un cambio estadísticamente significativo en la absorbancia y afectaron de manera positiva el sistema, mientras que el tiempo de exposición al TiO_2 también produjo un cambio estadísticamente significativo, sobre la variable respuesta, pero de manera negativa. Además, se observa que el método de síntesis del dióxido de titanio presentó un leve nivel de significancia en la variable respuesta y la afectó positivamente.

Para conocer cuáles eran las diferencias significativas se realizó un *Test de Rangos Múltiples* que comparó los grupos por pares (ANEXO VI Tablas A.32 a A.34)

En la tabla A.32, se observan los datos de los cuatro niveles que toma el factor Concentración de TiO_2 . En la columna *Grupos Homogéneos* aparecen diferencias significativas para todas las concentraciones de TiO_2 , a un nivel de confianza de 95,0%. Además, las células de cáncer de piel tipo melanoma expuestas a 50 ppm de TiO_2 aparecen ligeramente mejor, significativamente, que para las otras concentraciones.

En la tabla A.33, aparecen los dos niveles que toma el factor “tiempo de exposición”. En este análisis aparecen diferencias significativas entre los tiempos de exposición al TiO₂ y a la radiación. Además, las células de cáncer de piel tipo melanoma expuestas durante 45 minutos presentan mejor significancia que los expuestos durante 90 minutos.

Por otro lado, en la tabla A.34, aparecen los dos niveles que toma el factor “método de síntesis del TiO₂”. En este análisis aparecen diferencias significativas entre los dos métodos de síntesis: sol gel y Pechini, pero las células de cáncer de piel tipo melanoma expuestas al TiO₂ sintetizado por el método sol gel, aparecen con mejor significancia que los expuestos al TiO₂ sintetizado por el método Pechini.

El análisis anterior está soportado por las figuras 6.34, gráfica de efectos principales, y 6.35, gráficas de superficies de respuesta.

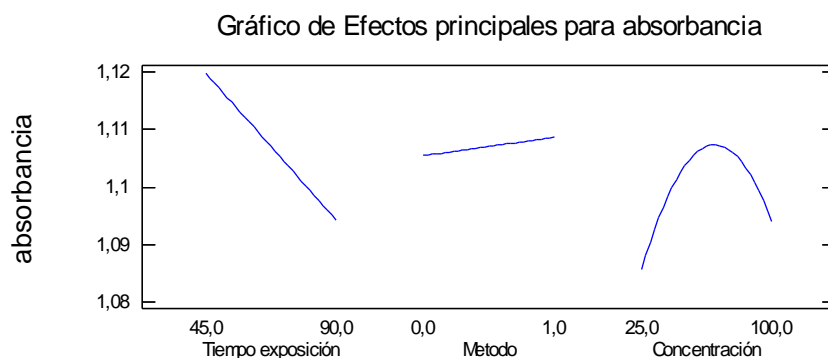


Figura 6.34. Gráfico de efectos principales de las diferentes variables analizadas, considerando el efecto de la radiación y el TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

La figura 6.34 indica que los niveles de los factores estadísticamente más significativos para el efecto de la radiación y el TiO₂, sobre cáncer de piel tipo melanoma, corresponden a la exposición durante 45 minutos y para una concentración de 50 ppm de TiO₂ que fue sintetizado por el método sol gel; este

resultado se puede corroborar con los gráficos de superficie respuesta, figura 6.35.

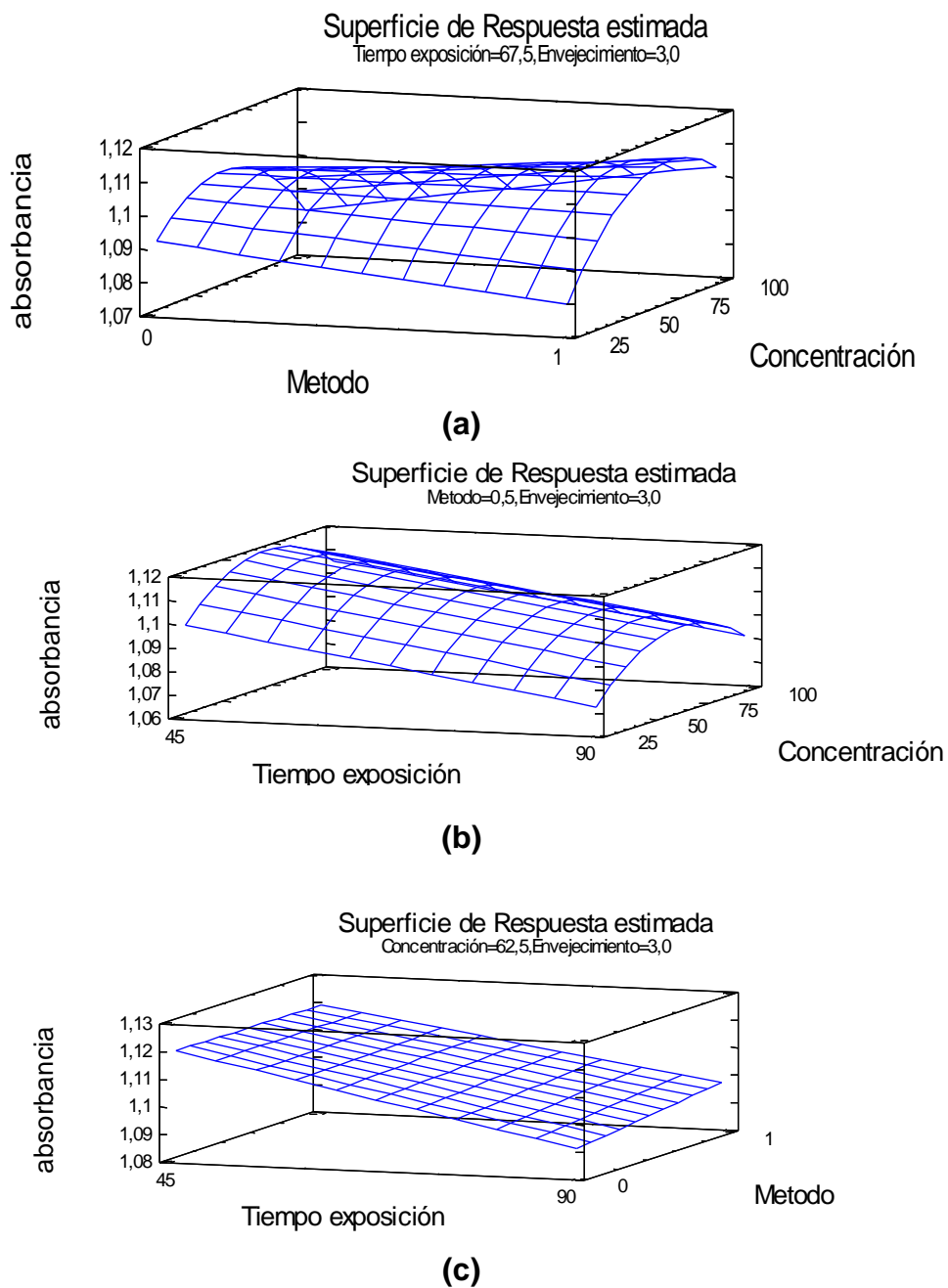


Figura 6.35. Gráfica de superficie de respuesta de la concentración de TiO_2 vs método de síntesis (a), concentración de TiO_2 vs tiempo de exposición (b) y método de síntesis vs tiempo de exposición (c), analizando el efecto de la radiación y el TiO_2 sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Además, los valores de absorbancia se incrementaron a medida que aumentó el tiempo de proliferación, tal como se observa en la gráfica de *PARETO* (figura 6.33).

El efecto del tiempo de radiación y exposición al TiO_2 puede ser observado en las curvas de proliferación para exposiciones durante 45 y 90 minutos (figuras 6.36 y 6.37), tomando TiO_2 sintetizado por los métodos sol gel y Pechini. En la figura 6.36(a), donde se utilizó dióxido de titanio sintetizado por el método sol gel con una exposición de 45 minutos, se observa que las curvas de crecimiento de las células de cáncer de piel, para las concentraciones de 50 ppm y 100 ppm, son superiores que la del control bajo sin radiación; por otro lado, para 25 ppm de TiO_2 se encontró que ella estaba por debajo de la curva de control bajo sin radiación, esto puede dar indicio que para 45 minutos de exposición a la radiación, con presencia de TiO_2 en una concentración de 25 ppm, la actividad metabólica del melanoma disminuye en una forma significativa.

En la figura 6.36(b), correspondiente al dióxido de titanio sintetizado por el método Pechini con una exposición de 45 minutos, se observa que las curvas de crecimiento de las células de cáncer de piel, para las concentraciones 25 ppm, 50 ppm y 75 ppm de TiO_2 , son superiores a la de control bajo sin radiación; por otro lado, para 100 ppm de TiO_2 se encontró por debajo de la curva de control bajo sin radiación. Esto puede dar indicio de que para 45 minutos de exposición a la radiación, en presencia de TiO_2 sintetizado por el método Pechini, y con una concentración de 100 ppm de TiO_2 , la actividad metabólica del melanoma disminuye en una forma significativa.

En la figura 6.37, donde se utilizó el dióxido de titanio sintetizado por los métodos sol gel y Pechini para una exposición de 90 minutos, se observó que las curvas de crecimiento de las células de cáncer de piel, para todas las concentraciones, fueron superiores a la de control bajo sin radiación. Esto puede dar indicar que

para 90 minutos de exposición a la radiación, en presencia de TiO_2 sintetizado por ambos métodos, la actividad metabólica del melanoma no disminuye en una forma significativa. También se puede ver, de estas gráficas, una tendencia creciente de las curvas lo que indica que el tratamiento fotocatalítico no inhibió la proliferación de las células.

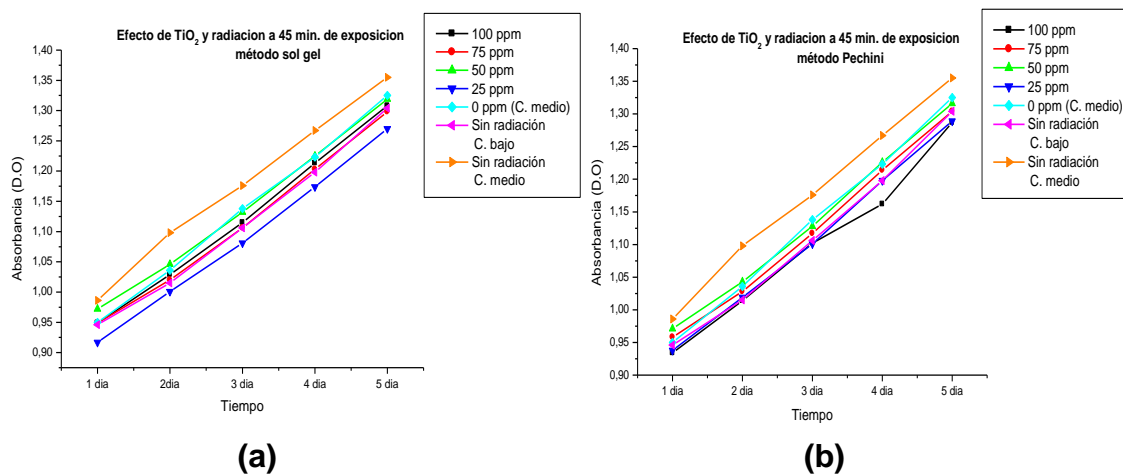


Figura 6.36. Proliferación del cáncer de piel tipo melanoma durante 45 minutos de exposición a la radiación, para diferentes concentraciones de TiO_2 , obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

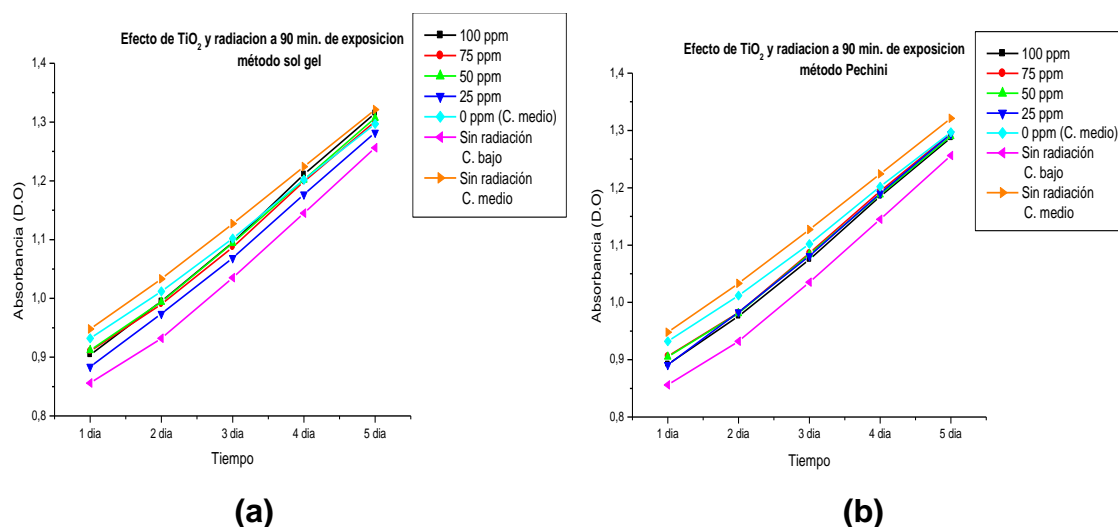


Figura 6.37. Proliferación del cáncer de piel tipo melanoma durante 90 minutos de exposición a la radiación, para diferentes concentraciones de TiO_2 , obtenido por los métodos: sol gel (a) y Pechini (b).

7. CONCLUSIONES

✚ Utilizando Espectroscopia IR se pudo estudiar la evolución del sistema de titanio utilizado en la síntesis por sol gel del TiO₂ nanométrico fase anatasa. Los grupos funcionales asociados a las bandas, presentes en los espectros, cambiaron debido a las reacciones químicas que ocurrieron en el seno de la suspensión coloidal. Es de destacar en el sistema sin acomplejante la presencia de los grupos Ti-O-Ti (bandas a 500 y ~700 cm⁻¹) y Ti-O (600 cm⁻¹), esenciales en la estructura básica de las especies polinucleares del gel, así como de los grupos Ti-OH (800 cm⁻¹) y Ti-O-C (bandas a 1048,1083 y 1125 cm⁻¹). Al introducir el acomplejante AcacH al sistema de titanio, se observaron en los espectros IR bandas a ~660 cm⁻¹ y ~880 cm⁻¹ correspondientes a los enlaces Ti-AcacH y C-O respectivamente.

Especial interés presenta la banda a 800 cm⁻¹ ya que ella indica como avanzan las reacciones de hidrólisis en el sistema. Ella, por lo tanto, es mas evidente en los sistemas sin AcacH y en el Ti:AcacH = 3:1 donde este tipo de reacciones son muy importantes.

✚ La espectroscopía IR también permitió determinar la evolución del sistema de titanio durante la síntesis del TiO₂ nanométrico utilizando el método Pechini. Los espectros IR de las muestras tratadas térmicamente, hasta 400°C, presentaron principalmente grupos orgánicos. Si el tratamiento se realizaba a temperaturas mayores a 400°C, las bandas asociadas a los enlaces Ti-O, Ti-OH y Ti-C fueron las más evidentes.

✚ El estudio con espectroscopía IR de la evolución del sistema de titanio, utilizado para sintetizar TiO₂ nanométrico fase anatasa por los métodos sol gel y Pechini, no solo se realizó de manera cualitativa sino también semi-cuantitativamente. Se deconvolucionaron las bandas mas importantes que

aparecen en los espectros, utilizando funciones pseudo-voigt, y se calculó su área integrada. Se centro la atención en las bandas a 500 y $\sim 700\text{ cm}^{-1}$, pertenecientes al grupo funcional Ti-O-Ti, y 600 cm^{-1} , enlace Ti-O, que son las que dan información sobre la estructura interna del TiO_2 . Es evidente, en el trabajo, cómo estas bandas se fortalecieron al incrementar la temperatura de tratamiento del sólido base, compuestos de titanio, que se utilizaron para obtener el TiO_2 .

- ✚ El estudio de difracción de rayos X de los sólidos obtenidos, tanto por el método sol gel como por Pechini, mostró que el sólido tratado térmicamente a temperaturas $< 400^\circ\text{C}$ presentaba una estructura completamente amorfa y que si la temperatura de tratamiento era $> 450^\circ\text{C}$ cristalizaba, como principal fase cristalina, el TiO_2 fase anatasa (hasta $T\sim 600^\circ\text{C}$).

- ✚ Los estudios de morfología y tamaño de partícula (microscopía electrónica) indicaron que la presencia del AcacH modifica la forma de las partículas y favorecía la disminución de su tamaño. En el sistema sin acomplejante, las partículas presentaron una forma esferoidal y un tamaño $< 500\text{nm}$. Por otro lado, cuando el AcacH estaba presente en el sistema de titanio, las partículas presentaron una forma irregular, con bordes agudos, y un tamaño menor a 200 nm . Por otro lado, utilizando el método Pechini se obtuvieron partículas más pequeñas, $< 100\text{ nm}$, con formas irregulares y bordes suaves. La presencia de aglomerados de partículas fue mas evidente en los polvos cerámicos sintetizados por sol gel, con un tamaño $> 10\text{ }\mu\text{m}$, mientras que los obtenidos por Pechini tenían un tamaño entre $5\text{ y }15\text{ }\mu\text{m}$ y presentaban una textura superficial muy fina lo que evidenciaba un gran avance del proceso de sinterización de las partículas primarias.

- ✚ Un resultado muy importante de este trabajo es que se puede obtener TiO_2 nanométrico, fase anatasa, a 450°C tanto por el método sol gel como por

Pechini. Estos métodos son reproducibles y permiten garantizar ciertas propiedades predeterminadas del TiO_2 , como morfología y tamaño de partícula, así como una fase cristalina dada, anatasa para el presente caso, y buena pureza química. Esto permite obtener un TiO_2 adecuado para diversas aplicaciones tecnológicas, de especial interés actualmente: fotodegradante de moléculas orgánicas, sensor químico y/o de gases, catalizador, pigmento, etc.

- ✚ Los resultados del estudio del efecto citotóxico del TiO_2 , sobre Fibroblastos de piel humana normal (FPHN), indicaron para las diferentes concentraciones de TiO_2 valores de densidad óptica mayores a los de la curva de crecimiento para control bajo (5% SFB), sin radiación, que se tomaron como referentes. Esto permite concluir que la exposición de los FPHN al TiO_2 sintetizado, utilizando las dos rutas químicas, en concentraciones entre 0 y 100 ppm, durante 45 y 90 minutos, no disminuyó la actividad metabólica celular ni alteró las condiciones del cultivo. Estos resultados reiteran los obtenidos por otros investigadores utilizando las mismas concentraciones de TiO_2 usadas en este trabajo; independientemente del método de síntesis utilizado para obtener el óxido, en ausencia de radiación, no presentaron efectos citotóxicos sobre los FPHN.
- ✚ Los resultados del estudio del efecto citotóxico del TiO_2 sobre cáncer de piel, tipo melanoma, indicaron que para una exposición al TiO_2 sintetizado, durante 45 minutos y tomando concentraciones de 50 ppm y 100 ppm, presentaron valores de densidad óptica menores a los obtenidos para el crecimiento de control bajo (5% SFB) sin radiación, utilizados como referentes. De estos resultados se puede concluir que la exposición de las células de cáncer de piel al TiO_2 , en concentraciones de 25 y 100 ppm durante 45 minutos, redujo la actividad metabólica celular alterando las condiciones del cultivo.

Este comportamiento no lo presentó el sistema donde las células fueron expuestas durante 90 minutos al TiO₂ sintetizado; los valores de densidad óptica fueron mayores a los de referencia, lo que indica que para estas condiciones de trabajo no se redujo la actividad metabólica celular del melanoma ni se alteraron las condiciones del cultivo.

- ✚ El estudio del efecto de la radiación sobre los FPHN indica que el crecimiento en los controles medios (0 ppm de TiO₂, 10% SFB) y bajos (0 ppm de TiO₂, 5% SFB), con radiación y sin radiación para 45 minutos y 90 minutos de exposición a esta, no se presentó un cambio apreciable en la actividad metabólica de los FPHN. Además, no se obtuvieron valores de densidad óptica menores a los obtenidos para el control bajo sin radiación. Por otro lado, se observó que no existía efecto inhibitorio de la proliferación celular ya que los valores de densidad óptica crecieron con el tiempo.
- ✚ Analizando el efecto de la radiación sobre el melanoma, se observó que cuando las células cancerígenas se expusieron a la radiación, por un espacio de 45 y 90 minutos, se produjo una disminución de la actividad metabólica pero los valores de densidad óptica no fueron menores a los del control bajo sin radiación (referente). Además, las curvas de crecimiento mostraron que no existía efecto inhibitorio de la proliferación celular porque los valores de densidad óptica aumentaron con el tiempo.
- ✚ Los resultados del estudio del efecto sobre los FPHN de los tiempos de exposición a la radiación y al TiO₂ sintetizado para diferentes concentraciones, fueron superiores a los valores de control bajo sin radiación (referente). Este resultado confirmó que el efecto fotocatalítico del TiO₂, sobre los FPHN, no presentaba un efecto tóxico para los dos tiempos de exposición estudiados (45 y 90 minutos). Además, las curvas de crecimiento mostraron que el tratamiento fotocatalítico no causaba inhibición en la

proliferación de los FPHN ya que, para los tiempos de exposición, la densidad óptica creció con el paso del tiempo.

- ✚ El estudio del efecto del tiempo de la radiación y la exposición al TiO_2 sobre el melanoma indicó que para 45 minutos de exposición a la radiación, con presencia de TiO_2 sintetizado por el método sol gel en una concentración de 25 ppm, la actividad metabólica del melanoma se redujo en forma significativa. Además, para una exposición de 45 minutos a la radiación, con presencia de TiO_2 sintetizado por el método Pechini y en una concentración de 100 ppm, la actividad metabólica del melanoma también disminuyó de manera significativa. Sin embargo, en las gráficas de proliferación, no se observó una reducción de ésta, lo cual indica que el tratamiento fotocatalítico no inhibió la proliferación de las células cancerígenas.

Hay que realizar otros estudios para determinar cuales son las condiciones más adecuadas para que la presencia del TiO_2 , sometido a radiación, inhiba la proliferación de las células cancerígenas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Askeland, D. Ciencia e Ingeniería de Materiales Cerámicos. Editorial Thomson. 3ª ED. 1998.
- [2] Callister, W. Introducción a la Ciencia de los Materiales. Editorial Reverté, S.A. 1998.
- [3] ELSA BEVILACQUA, Huntsman European Environment, Health and Safety Manager Tioxide Europe SAS, pag. 3.
- [4] N. Arconada, Y. Castro, A. Durán. Síntesis y propiedades fotocatalíticas de recubrimientos porosos de TiO_2 – anatasa producidos por sol-gel. X Congreso Nacional de Materiales (Donostia - San Sebastián, 18-20 Junio 2008).
- [5] A. Fujishima, T.N. Rao, D.A. Tryk, Titanium dioxide photocatalysis, J. photochem. Photobiol. C 1 (2000) 1–21.
- [6] Y. M. Franco. “Obtención y caracterización de recubrimientos de dióxido de titanio por el método de precursor polimérico (Pechini) y estudio preliminar de su uso como agente oxidante”. Trabajo de grado programa Química, Universidad del Cauca, (2009).
- [7] A.P. Zhang, Y.P. Sung, Photocatalytic killing effect of TiO_2 nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells. (2003).
- [8] Díaz E, García J. “Oncología Clínica Básica” Primera Edición, Arán

ediciones, Madrid España, Pág. 33

[9] Instituto Nacional de Cancerología. Líneas De Investigación Para el Control del Cáncer en Colombia <http://www.incancerologia.gov.co> ; (Fecha de acceso: 12-08-2008).

[10] [http:// www.incancerologia.org](http://www.incancerologia.org) (25 septiembre del 2008). Estadísticas del Cáncer por departamentos en Colombia.

[11] Daniel M. Blake, Pin-Ching Maness, Zheng Huang, Edward J. Wolfrum, and Jie Huang. Application of the Photocatalytic Chemistry of Titanium Dioxide to Disinfection and the Killing of Cancer Cells. Separation and Purification Methods. Volume 28(1) 1999, pp. 1-50.

[12] M. Song, R. Zhang, Y. Dai, F. Gao, H. Chi, B. Chen, X. Wang. The in Vitro Inhibition of Multidrug Resistance by Combined Nanoparticulate Titanium dioxide and UV Irradition.

[13] J. Xu, Y. Sun, J. Huang, C. Chen, G. Liu, Y. Jiang, Y. Zhao, Z. Jiannng. Photokilling Cancer Cells Using Highly Cell-Specific Antibody–TiO₂. Bioconjugates and Electroporation. Junio (2007)

[14] J. Labanauskiene, J. Gehl, J. Didziapetriene. Evaluation of cytotoxic effect of photodynamic therapy in combination with electroporation in vitro. Bioelectrochemistry, 70 (2007) 78–82.

[15] F. J. Gil Mur, C. A. Bádenas, J. M. Manero Planella, D. R. Riuz. Aleaciones Ligeras. Ediciones UPC. 2001.

[16] U. Müller. Inorganic Structural Chemistry, second edition, John Wiley &

Sons, Ltd, England 2007, pag. 57.

[17] A. GORDON AND TRISTAN. "SI Chemical Kenalf Data Book", fourth edition, (2002), pp 120-130.

[18] M. A. Cuevas Diarte, T. Calvet. Problemas de Cristalografía. 1ª Edición. 2002.

[19] Roberto J. Candal, Juan Rodríguez, Gerardo Colón, Silvia Gelover, Elena Vigil Santos, Antonio Jiménez González y Miguel A. Blesa. Materiales para Fotocatálisis y Electrofotocatálisis. Cap. 7.

[20] Juan Rodríguez, Roberto J. Candal, José Solís, Walter Estrada, y Miguel A. Blesa. El fotocatalizador: síntesis, propiedades y limitaciones. Cap. 9.

[21] J. Livage, et al , "Sol –Gel Chemistry of transition metal oxides", Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée, CNRS(UA 302), Université Pierre et Marie Curie, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France.

[22] Sumio Sakka. HANDBOOK of SOL–GEL SCIENCE and TECHNOLOGY. Processing, Characterization and Applications.

[23] M.P. Pechini, US Patent No. 3,330,697 (11 July 1967).

[24] FECHT H. J., Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications, Edited by A.S. Edelstein and R. C. Cammarata, Institute of Physics Publishing Bristol and Philadelphia, 1996, pag. 89-110.

[25] M.S. Thompson, G.H. Wiseman, Synthesis and microstructure of gel derived varistor precursor powders. Ceram. Int. 1989; 15: 281-288.

[26] W. CARR. "*Pigments Handbook*", Vol. 3, John Wiley & Sons, (2002), pp. 369-404.

[27] Ning-ping Huang , Min-hua Xu , Chun-wei Yuan , Rui-rong Yu. The study of the photokilling effect and mechanism of ultrafine TiO₂ particles on U937 cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 108 (1997) 229-233.

[28] X. Doménech, W.F. Jardim, M.I. Litter, "Procesos Avanzados de Oxidación para la Eliminación de Contaminantes" (2000).

[29] D. M. Blake, P. Maness, Z. Huang, E. J. Wolfrum, J. Huang and W. A. Jacoby, Application of the photocatalytic chemistry of titanium dioxide to disinfection and the killing of cancer cells. *Separation and Purification Methods*, Volume 28(1) 1999, pp. 6-9.

[30] Víctor M. Sarria, Sandra Parra, Ángela G. Rincón, César Pulgarín, Ricardo A. Torres. NUEVOS SISTEMAS ELECTROQUÍMICOS Y FOTOQUÍMICOS PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES Y DE BEBIDA.

[31] National Cancer Institute. [www. Cáncer.gov](http://www.Cáncer.gov)

[32] Geneser F, "Histología sobre bases biomoleculares", Tercera edición, editorial Médica Panamericana, Montevideo, Uruguay. Pág. 28,30.

[33] Merriam Webster Medical www.merriam-webster.com/medical/ld50. Dictionary (marzo de 2010).

[34] Manual Kit LDH ® ROCHE.

- [35] Manual Kit XTT ® ROCHE.
- [36] J. E. Rodríguez-Páez, A. Mafla, G. Andrade, G. Latorre. Obtención de soles estables de Sílice-Titania utilizando como acomplejante acetilacetato. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, Vol. 22, No. 1, 2002, 16-20.
- [37] G. CAMARGO, H. M. GALINDO. “*Estudio de la obtención de sustratos cerámicos para membranas inorgánicas*”. Ing. Investig. Vol. 25, No.2 Bogotá May/Aug. (2005).
- [38] Mc Murry. Química Orgánica. 7a. Edición 2008.
- [39] Douglas A. Skoog, F. James Holler, Timothy A. Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. Quinta edición.
- [40] Carter B. Williams D. Transmission Electron Microscopy: A textbook for Materials Science. Plenum Press, Vol 4. 2000.
- [41] L. Tellez, F. Rubio, R. Peña, J. Rubio. Seguimiento por espectroscopia infrarroja (FT-IR) de la copolimerización de TEOS (tetraetilortosilicato) y PDMS (polidimetilsiloxano) en presencia de TBT (tetrabutiltitanio). Bol. Soc. Esp. Ceram. V., 43 [5] 883-890 (2004).
- [42] F. BABONNEAU, L. BOIS, J. LIVAGE, S. DIRE. “*Estructural investigation of sol-gel derived hybrid siloxane-oxide materials using silicon-²⁹ MAS-NMR spectroscopy*”. Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 286, (1993), pp 289-294.
- [43] A. GUZMÁN, A. FERNÁNDEZ, J. RODRÍGUEZ. “*Estudio de las reacciones de hidrólisis y condensación del titanio en presencia de acetilacetona*”. Rev. Acad. Colomb. Cienc., Vol 31(121), (2007), pp. 529-536.

[44] K. NAKAMOTO. *“Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds”*. Ed. John Wiley & Sons, New York, (1997).

[45] A. Mosquera, J.E. Rodríguez Páez. Obtención de nano-estructuras bi-dimensionales de SnO_2 utilizando el método pechini: estudio de la conformación de la resina. Bol. Soc. Españ. Cerám. y Vidrio (aceptado para publicación), 2008.

[46] Montgomery D. “Diseño y análisis de experimentos”, Limusa Wiley Ed, 2da México 2004 Pág. 171.

ANEXO I. DESCONGELACIÓN Y SUBCULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES DE FIBROBLASTOS DE PIEL HUMANA NORMAL Y MELANOMA Hs 688(A).T CRL-7425™

Las líneas celulares de FPHN y melanoma Hs 688(A).T CRL-7425™ fueron descongeladas 3 semanas antes del experimento. Cada vez que se descongeló un vial, las células fueron sembradas en dos botellas de cultivo T-75: una contiene las células para la prueba y la otra, células para volver a congelar. De esta manera se asegura la disponibilidad de las líneas celulares en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle. Las líneas celulares fueron criopreservadas a una concentración de 20×10^6 células por mL., en medio de cultivo con Suero fetal Bovino (SFB) y Dimetil Sulfoxido (DMSO). Los procedimientos de congelación, descongelación y mantenimiento de las líneas celulares se muestran a continuación:

Procedimiento de congelación

- Descartar el medio de cultivo de la botella.
- Lavar las células tres veces con Buffer Salino Fosfato (PBS) estéril.
- Adicionar Tripsina e incubar a 37°C para desprender las células de la superficie de la botella.
- Inhibir la acción de la tripsina adicionando medio de crecimiento.
- Colectar las células en un tubo y centrifugar a 1.000 rpm por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet celular tres veces con PBS estéril.
- Resuspender el pellet en medio de cultivo frío con 10 % de DMSO.
- Envasar en crioviales de 1 mL.

- Criopreservar los viales a -80°C , por 24 horas y posteriormente depositar los viales un tanque con nitrógeno líquido hasta el momento de su utilización.

Procedimiento de descongelación

- Descongelar el criovial rápidamente en un Baño a 37°C .
- Colectar el volumen de células con una pipeta serológica y colocar el contenido en un tubo para centrifuga con 5 ml de medio de cultivo frío.
- Centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 5 ml de medio de cultivo a 37°C .
- Colectar el volumen de células con una pipeta y pasarlo a una botella de cultivo de 25 cm^2 .
- Poner la botella de cultivo en una incubadora a 37°C , en atmósfera húmeda, que contenga 5% de CO_2 , y controlar el crecimiento celular, cambiar el medio de crecimiento cada 2 días.

Mantenimiento de las líneas células.

- Descartar el medio de cultivo.
- Lavar la monocapa celular tres veces con PBS estéril.
- Adicionar Tripsina e incubar a 37°C para desprender las células de la superficie de la botella.
- Inhibir la acción de la tripsina adicionando medio de crecimiento.
- Colectar las células en un tubo y se centrifuga a 1.000 rpm por 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet celular tres veces con PBS estéril.
- Realizar el conteo del número total de células del cultivo, utilizando el método de exclusión con Azul de tripam
- Envasar el volumen en botellas de cultivo.

- Poner la botella de cultivo en una incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda, que contenga 5% de CO₂, y controlar el crecimiento celular, cambiar el medio de crecimiento cada 2 días.

ANEXO II. MÉTODOS DE MEDICIÓN

Azul de Tripám (Viabilidad Celular)

- Descartar el medio de cultivo.
- Lavar la monocapa celular tres veces con PBS estéril.
- Adicionar Tripsina e incubar a 37°C para desprender las células de la superficie de la botella.
- Inhibir la acción de la tripsina adicionando medio de crecimiento.
- Colectar las células en un tubo y se centrifuga a 1.000 rpm., 5 minutos.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet celular tres veces con PBS estéril.
- Diluir 1:10 las células aisladas (0.1 mL. de la suspensión de células) y (0.9 mL. de azul de tripám).
- Adicionar 10 μ L de la dilución en una cámara de conteo celular (Neubauer) y observar al microscopio óptico para determinar el número de células vivas y muertas. Realizar el conteo celular en los campos visuales (superior izquierdo y derecho, inferior izquierdo y derecho).
- Contar el número de células presentes en los cuatro campos (número total de células, número de células viables y número de células inviables) y obtener promedio de células.
- El número de células/mL se obtiene multiplicando el promedio de células por 10 (factor de dilución con la suspensión del cultivo y el azul de tripam), por el volumen de suspensión inicial de las células en el medio, por 10.000 como constante de la cámara de Neubauer.
- El resultado obtenido corresponde al número de total de células. El número de células viables y el número de células muertas, se realiza de igual manera pero discriminando cuales de las células contadas son viables y cuáles no, esto servirá para realizar la determinación de viabilidad y mortalidad celular:

$$\%Viabilidad = \frac{\# \text{ de células viables}}{\# \text{ total de células}} \times 100$$

$$\%Mortalidad = \frac{\# \text{ de células muertas}}{\# \text{ total de células}} \times 100$$

Kit LDH® ROCHE (citotoxicidad)

La solución reactiva del *kit* LDH se prepara de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Diluir el polvo de catálisis (ROCHE) en 1 mL de agua destilada y esterilizada.
- Agregar 250 µL de esta solución a 11.25 mL de solución de dilución (*dye solution* ROCHE) [3].
- Adicionar 50 µL de la solución LDH a cada pozo de la placa de cultivo.

Los controles utilizados son:

Control Blanco: Compuesto de 200µl medio de crecimiento sin células y 50µl de LDH. Proporciona la información sobre la actividad de LDH contenida en el medio del análisis.

Control Bajo: Compuesto de 200µl medio de crecimiento con células y 50µl de LDH. Proporciona la información sobre la actividad de LDH liberada por las células normales no tratadas.

Control Alto: Compuesto de 150 µl medio de crecimiento con células, 50 µl de LDH y 50 µl de Triton X-100 (agente citotóxico). Proporciona la información sobre la actividad de liberación máxima de LDH de las células.

Kit XTT® ROCHE (Proliferación)

La solución reactiva del *kit* XTT se prepara de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Descartar la solución de medio de cultivo y dióxido de titanio de los pozos de la microplaca de cultivo

- Lavar cada pozo 2 veces con 300µL de PBS para retirar el exceso de dióxido de titanio.
- Mezclar 0.15 mL de la solución electrolítica (ROCHE) con 7.5 mL de la solución *labeling* (ROCHE).
- Adicionar 50 µL de la solución XTT a cada pozo de la placa de cultivo.

Los controles utilizados son:

Control Bajo: Compuesto de 200 µL de medio de crecimiento con células, 50 µL de XTT y 5 % de Suero Fetal Bovino. Mantiene las células vivas y proporciona una actividad metabólica baja a condiciones experimentales (37°C, 5% CO₂, H_R= 95%).

Control Medio: Compuesto de 200 µL de medio de crecimiento con células, 50 µL de XTT y 10 % de Suero Fetal Bovino. Proporciona un óptimo crecimiento celular y una actividad metabólica normal a condiciones experimentales (37°C 5 % CO₂ H_R= 95%).

Control Alto: Compuesto de 200 µL de medio de crecimiento con células, 50 µL de XTT y 20 % de Suero Fetal Bovino. Proporciona crecimiento o proliferación celular aumentada y una actividad metabólica alta sin generar toxicidad.

ANEXO III. PRUEBA PRELIMINAR

Obtención del Cultivo Celular de Linfocitos

Se llevó a cabo el cultivo y reproducción de linfocitos obtenidos de muestras de sangre humana. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 1 % de L-Glutamina y 1% de piruvato de sodio. Para obtener los cultivos de linfocitos se realizó el siguiente procedimiento:

- Colectar las células de las botellas de cultivo, y depositar en un tubo para centrifuga de 50 mL.
- Centrifugar por 5 minutos a 1.000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 10 mL. de medio de cultivo.
- Contar las células del cultivo, utilizando método de exclusión con azul de tripam.
- Determinar el número total de células
- Pasar el volumen a botellas de cultivo.
- Poner la Botella de cultivo en una incubadora a 37°C, en atmósfera húmeda, que contenga 5% de CO₂, y controlar el crecimiento celular, cambiar el medio de crecimiento cada 2 o 3 días.

Concentración de TiO₂

Se prepararon soluciones en medio de cultivo RPMI 1640 con 10% de suero fetal bovino, 1 % de L-Glutamina y 1% de piruvato de sodio con 0, 200, 400, 600, 800 y 1000 ppm de dióxido de titanio Degussa P25.

Arreglo de Placas de Cultivo

Las células fueron cultivadas en microplacas de cultivo de 96 pozos de 250 µL. La configuración de células, concentraciones de TiO₂ y los controles de citotoxicidad se muestran en la tabla A.1.

Tabla A.1. Convenciones de las microplacas de la prueba preliminar.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B			1	1	1		2	2	2			
C			3	3	3		4	4	4			
D			5	5	5		0	0				
E												
F			6	6	6		7	7	7			
G			8	8	8		9	9	9			
H												

Convención		Convención	
1	Linfocitos, TiO ₂ [1000 ppm]	6	Linfocitos, TiO ₂ [0 ppm]
2	Linfocitos, TiO ₂ [800 ppm]	7	Linfocitos, Triton 50 µL
3	Linfocitos, TiO ₂ [600 ppm]	8	Linfocitos, Triton 100 µL
4	Linfocitos, TiO ₂ [400 ppm]	9	LDH
5	Linfocitos, TiO ₂ [200 ppm]	0	PBS + LDH

Fuente de Radiación

La fuente de radiación consistió en dos lámparas ultravioleta marca Sen-Lite referencia FT8 18W dentro de una caja rectangular con recubrimiento interno de papel aluminio, separadas a 15 cm de la superficie de las placas de cultivo. Los valores de potencia y energía usados fueron:

Tabla A.2 Potencia y energía aplicada al cultivo celular.

Tiempo (hr)	Potencia Acumulada (Mw/cm²)	Energía Acumulada (J/cm²)
1	0,14	0,50
2	0,28	2,02

Lecturas de citotoxicidad

El porcentaje de citotoxicidad fue medido con el *Kit* LDH[®] Roche a 1, 2 y 6 horas post tratamiento.

Descripción de la prueba preliminar

- Todos los instrumentos y materiales fueron esterilizados con uescodine (jabón cuaternario) con el fin de evitar contaminación por agentes biológicos externos. El dióxido de titanio fue esterilizado en autoclave. La manipulación de los cultivos y la preparación de las soluciones se realizaron bajo las máximas condiciones de esterilidad, los procedimientos se realizaron en cabina de flujo laminar tipo A2B3. La temperatura del laboratorio fue controlada a 21°C.
- Las células se retiran de la incubadora y se adicionan 200 µL de medio de cultivo con 4000 células a cada pozo de acuerdo a la configuración de la figura A.1.
- Las soluciones de medio de cultivo RPMI 1640 con diferentes concentraciones de dióxido de titanio fueron adicionadas a cada pozo de acuerdo a la configuración de la figura A.1.
- Las placas de cultivo fueron rotuladas como 1 hora con radiación, 1 hora sin radiación, 2 horas con radiación y 2 horas sin radiación. Las placas que fueron expuestas a radiación UV fueron cubiertas con papel aluminio.
- Las cuatro placas de cultivo fueron puestas bajo la fuente de radiación sobre una placa de agitación programada a 300 RPM para mantener el dióxido de titanio en suspensión.
- Las placas fueron retiradas a 1 y 2 horas de tratamiento. El *Kit* LDH fue agregado a cada uno de los pozos de las microplacas, estas fueron llevadas a la incubadora por una hora.
- Pasado el tiempo las placas fueron retiradas de la incubadora y puestas en el medidor de placas ELISA (STAT FAX – 2100, AWARE TECHNOLOGY INC) para obtener los datos de citotoxicidad. El medidor de placas ELISA fue configurado de la siguiente forma: modo absorbancia, filtro de 492 nm y filtro diferencial de 630 nm.

Resultados de citotoxicidad

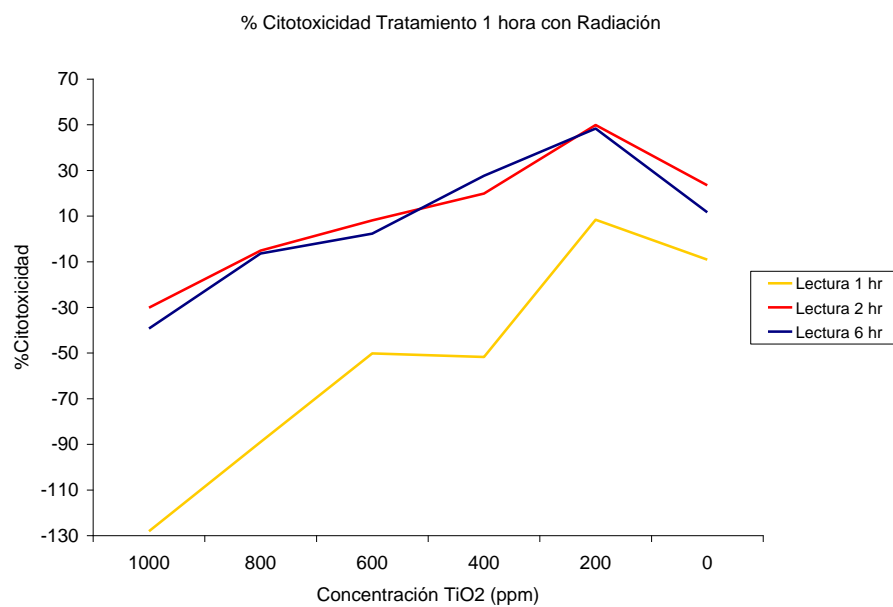


Figura A.1. Resultados 1 hora de tratamiento con radiación.

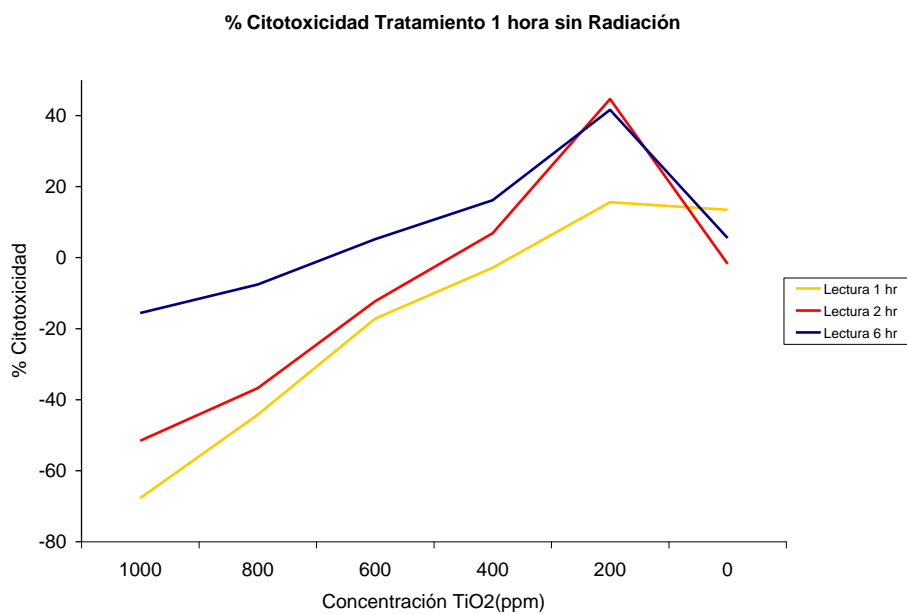


Figura A.2. Resultados 1 hora de tratamiento sin radiación.

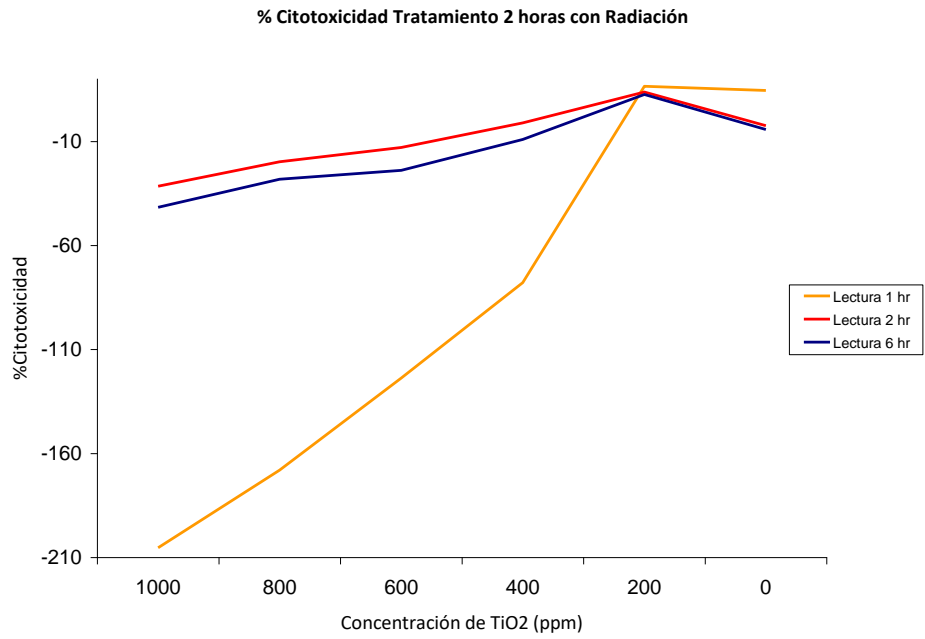


Figura A.3. Resultados 2 horas de tratamiento con radiación.

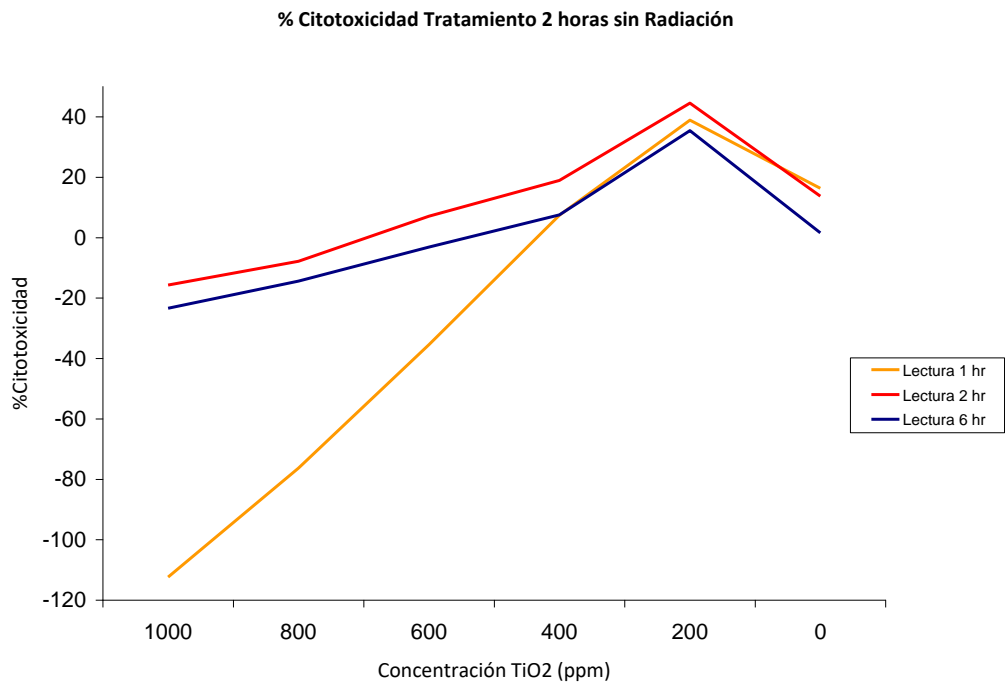


Figura A.4. Resultados 2 horas de tratamiento sin radiación

Análisis de pruebas preliminares y conclusiones

Se observó en los cultivos celulares con radiación y sin radiación que el porcentaje de citotoxicidad es máximo cuando la concentración de TiO_2 es 200 ppm.

Para valores de concentración mayores a 400 ppm los porcentajes de citotoxicidad obtenidos a 1 y 2 horas de radiación son negativos, este resultado puede indicar que energía aplicada no es suficiente para excitar el fotocatalizador por lo cual no se produce la degradación de los componentes celulares de los linfocitos de sangre, es decir, el TiO_2 crea una barrera (apantallamiento) que refleja la luz ultravioleta en vez de absorberla para desencadenar las reacciones químicas, creando un efecto protector similar al de un bloqueador solar. Este efecto fue estudiado por Kubota et al en 2001, en dicha investigación células normales de pulmón y células cancerígenas de vejiga humana fueron irradiados a niveles de potencia de 0,02 y 0,04 mW/cm^2 para UVC y UVA respectivamente y una concentración de TiO_2 en el medio de cultivo de 1000 ppm [2]. Los resultados obtenidos muestran que el daño en el ADN expresado en formación de dímeros de pirimidina causado por la radiación ultravioleta se ve suprimido por la presencia de partículas de TiO_2 .

El efecto de apantallamiento anteriormente descrito también sucedió en la lectura del medidor de placas ELISA porque se observan valores negativos de citotoxicidad para concentraciones mayores a 400 ppm, incluso en los datos obtenidos de las placas sin radiación. Este efecto puede ser atribuido a que no se filtro el dióxido de titanio del medio de cultivo previo a la lectura. De acuerdo al análisis realizado, se concluyó lo siguiente:

- Se debe diseñar y construir un reactor fotocatalítico que emita una potencia que tenga el mismo orden de magnitud que el reportado en Ai-

Ping Zhang et al en el 2003; Ya que se obtuvieron resultados de citotoxicidad positivos en un rango amplio de concentraciones.

- Concentraciones de TiO_2 mayores a 200 ppm pueden causar errores en la lectura del medidor de placas ELISA. Por tanto, en las pruebas con FPHN y células cancerígenas se propone trabajar a concentraciones menores a 200 ppm.
- Se recomienda cambiar el Kit LDH por el Kit XTT ya que este permite leer citotoxicidad y además permite ver los efectos inhibitorios sobre el crecimiento celular a corto plazo (horas) y a largo plazo (días).
- Para evitar efectos de apantallamiento en las lecturas, se recomienda que previo a la adición del *Kit XTT* ® ROCHE y a la lectura de proliferación en el medidor de placas ELISA, se lave el TiO_2 del medio de crecimiento en todos los pozos de la placa.

ANEXO IV. CARACTERÍSTICAS DEL REACTOR FOTOCATALÍTICO

Con el fin de tener mayor potencia emitida en el experimento, se construyó un reactor de aluminio reflectivo en forma cúbica con ocho lámparas ultravioleta en la parte superior, el cual permite trabajar a una potencia mayor y acumular más energía que la fuente de radiación de la prueba preliminar. A continuación se muestran las dimensiones y especificaciones del reactor fotocatalítico:

Tabla A.3 Dimensiones del fotoreactor .

Alto (cm)	28
Ancho (cm)	32
Largo (cm)	61

Tabla A.4 Referencias de las lámparas UV.

Marca*	Referencia	Potencia (W)	Cantidad
Senlite	FT8	18	5
Opalux	T8	18	3

**Nota: El proveedor no contaba con lámparas de una sola marca.*

Tabla A.5 Otras especificaciones.

Material	Aluminio reflectivo (pulido)
Lámparas	8
Balastos	2
Área ocupada (cm²)	1920
Potencia incidente (W/m² hr)	5,43
Distancia lámpara-placa (cm)	10
Proveedor	ILTEC S.A

Caracterización del reactor

La caracterización del reactor fotocatalítico fue realizada en el laboratorio del Grupo GAOX ubicado en la Universidad del Valle Sede Meléndez. Las mediciones fueron hechas en la noche para minimizar la entrada de luz UV

natural que distorsionara los resultados de potencia. Se usó un radiómetro ubicado a 10 cm de las lámparas tomando la potencia incidente en el centro y en los dos extremos del reactor, realizando 2 réplicas por cada ubicación del radiómetro.

Procedimiento de medición:

- Ubicar el radiómetro dentro del reactor a 10 cm de los bombillos.
- Encender el radiómetro.
- Encender las lámparas del reactor e iniciar la medición de tiempo.
- Cuando la potencia acumulada alcance el valor de $0,1 \text{ W/m}^2$ se mide el tiempo (tiempo 1). Se toma el valor de la potencia incidente.
- Se inicia un nuevo tiempo.
- Se toman datos de potencia incidente y acumulada cada minuto hasta 20

Los resultados obtenidos muestran que la mayor potencia incidente y acumulada se obtiene cuando el radiómetro está ubicado en el centro del reactor ya que proporciona una potencia incidente promedio de $5.4 \text{ W/m}^2\text{hr}$ y un valor mínimo de potencia acumulada de 4.7 W/m^2 frente a $4.3 \text{ W/m}^2\text{hr}$ y 3.5 W/m^2 obtenidas en los extremos del reactor. Los datos de potencia y energía acumuladas se muestran a continuación:

Tabla A.6 Datos de potencia y energía para el reactor

Tiempo (min)	Potencia Acumulada (mW/cm^2)	Energía Acumulada (J/cm^2)
15	0,14	0,12
30	0,27	0,49
45	0,41	1,1
60	0,54	1,96
75	0,68	3,06
90	0,82	4,4
105	0,95	5,99
120	1,09	7,82

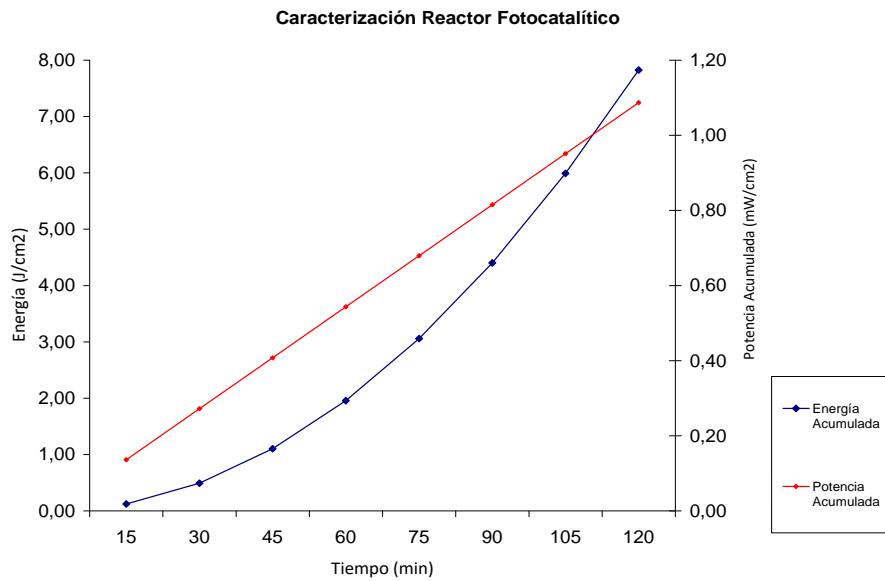


Figura A.5. Caracterización fotoreactor.

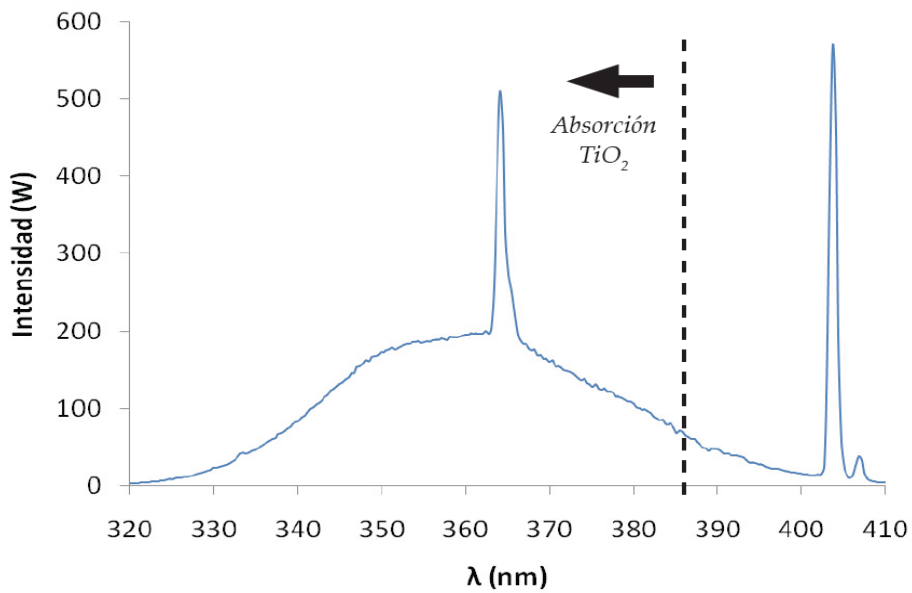


Figura A.6. Espectro de radiación de la lámpara UV [6].

El espectro de radiación de la gráfica A.6 tiene dos picos significativos en 365 nm (cerca del límite superior del UV) y 403 nm (fuera del rango UV). Comparando dichos valores con la energía del *band gap* se observa que la

energía irradiada a 365 nm es mayor que la energía del band gap y la energía irradiada a 403 nm es menor que la energía del band gap. Por tanto se concluye que la activación del semiconductor es promovida a 365 nm y que las magnitudes energéticas de las otras longitudes de onda no son relevantes en el sistema dado que las propiedades ópticas del TiO_2 hacen que la absorción de energía sea significativa por debajo de 385 nm.

**ANEXO V. DISEÑOS EXPERIMENTALES EN EL SOFTWARE
STATGRAPHICS PLUS®**

Efecto Citotóxico del TiO₂ sobre FPHN.

Tabla A.7 Diseño experimental efecto del TiO₂ sin radiación en Statgraphics Plus 5.1.

Tiempo exp.	método	Tiempo prol.	concentración	absorbancia
90	0	5	0	1,266
90	1	2	100	0,970
90	0	5	25	1,272
45	0	4	75	1,152
45	0	4	0	1,091
45	0	2	25	0,961
45	1	2	25	0,940
90	1	2	50	0,964
45	1	2	50	0,958
45	1	3	75	1,045
90	0	1	0	0,885
90	0	3	100	1,078
45	0	4	25	1,144
45	1	5	25	1,215
90	0	5	100	1,306
45	0	1	75	0,891
45	0	5	0	1,185
90	0	4	25	1,164
90	1	3	0	1,061
45	1	1	100	0,859
45	0	3	25	1,045
45	0	2	50	0,955
45	0	3	100	1,036
90	1	1	50	0,880
45	0	2	0	0,916
90	1	3	100	1,067
90	0	2	25	0,960
45	0	4	50	1,139
90	1	1	25	0,864
90	1	2	25	0,958
45	0	5	25	1,244

90	1	5	25	1,267
90	1	1	100	0,874
90	1	4	25	1,160
90	0	3	0	1,062
90	1	3	25	1,053
90	0	2	50	0,960
45	1	4	100	1,122
45	1	5	100	1,220
90	0	1	75	0,869
90	1	3	75	1,065
45	1	5	50	1,239
45	0	1	100	0,868
45	0	4	100	1,143
45	0	3	0	0,996
45	1	1	0	0,847
90	0	3	75	1,050
90	1	5	50	1,261
90	0	5	50	1,279
45	0	1	0	0,847
90	0	4	0	1,166
90	0	4	100	1,198
45	0	2	100	0,951
90	0	2	0	0,970
45	1	2	75	0,961
90	1	1	0	0,885
45	0	1	25	0,880
90	0	2	75	0,961
45	0	3	75	1,053
45	1	2	0	0,916
90	0	4	50	1,170
45	1	1	25	0,863
45	0	5	50	1,241
90	1	3	50	1,059
90	0	1	100	0,882
45	1	4	25	1,121
90	0	1	25	1.12
45	1	3	50	1,044
45	1	2	100	0,941
45	1	3	100	1,026
90	1	4	50	1.089

45	1	3	25	1,021
45	1	1	50	0,885
90	1	5	100	1,282
90	1	2	75	0,970
90	1	5	0	1,266
45	0	5	75	1,253
45	0	3	50	1,042
90	1	5	75	1,280
90	0	4	75	1,173
45	1	4	50	1,146
90	0	3	50	1,059
90	1	4	100	1,179
45	1	1	75	0,887
90	1	2	0	0,970
90	0	3	25	1,055
90	0	5	75	1,281
45	0	5	100	1,243
45	1	5	75	1,239
90	1	4	0	1,166
45	1	4	75	1,145
90	1	1	75	0,882
90	1	4	75	1,175
45	0	2	75	0,965
45	1	4	0	1,091
90	0	1	50	0,872
45	1	5	0	1,185
45	1	3	0	0,996
45	0	1	50	0,883
90	0	2	100	0,982

Efecto Citotóxico de la radiación UV sobre FPHN.

Tabla A.8 Diseño experimental efecto de la radiación sin TiO₂ en Statgraphics Plus 5.1.

Tiempo exp.	Tiempo proli.	radiación	absorbancia
90	1	0	0,885
45	1	1	0,987
45	3	1	1,136
90	5	1	1,286
90	1	1	0,907
45	1	0	0,847

45	4	0	1,091
90	4	0	1,166
90	5	0	1,266
90	2	0	0,97
90	3	0	1,062
45	5	1	1,322
45	5	0	1,185
45	3	0	0,996
90	4	1	1,184
45	2	1	1,056
45	4	1	1,228
45	2	0	0,916
90	3	1	1,08
90	2	1	0,983

Efecto Citotóxico del TiO₂ y la radiación UV sobre FPHN.

Tabla A.9 Diseño experimental en Statgraphics Plus 5.1.

Tiempo exp.	método	Tiempo prol.	concentración	absorbancia
90	1	100	4	1,184
90	1	25	2	0,976
45	1	100	5	1,226
45	1	25	5	1,228
45	1	25	2	0,964
90	0	25	2	0,97
90	0	100	5	1,286
45	0	50	5	1,215
45	0	75	4	1,125
90	1	25	1	0,879
90	1	100	1	0,888
45	1	100	2	0,96
45	0	50	1	0,883
90	1	50	3	1,072
90	0	100	2	0,973
45	0	100	3	1,05
45	0	25	1	0,873
90	1	50	4	1,18
90	1	75	2	0,974
45	1	100	1	0,88
45	0	100	2	0,962
90	0	100	1	0,874

45	0	50	3	1,028
90	0	25	3	1,074
90	1	100	2	0,977
90	0	25	5	1,295
45	0	100	1	0,883
90	1	100	3	1,079
90	1	25	5	1,286
90	0	50	5	1,283
45	0	100	4	1,15
90	1	75	5	1,276
45	1	75	5	1,226
45	0	25	3	1,03
90	0	75	3	1,051
90	0	100	3	1,073
45	1	100	3	1,042
90	0	75	4	1,159
45	1	25	4	1,137
45	1	50	3	1,055
90	0	75	2	0,955
45	1	75	1	0,896
90	1	75	1	0,898
90	1	75	4	1,183
45	0	100	5	1,236
90	0	75	1	0,872
90	0	50	3	1,065
45	0	25	2	0,951
45	1	100	4	1,136
90	0	25	1	0,876
90	0	75	5	1,258
90	1	25	3	1,071
45	0	25	4	1,128
45	0	50	2	0,951
90	0	50	2	0,97
90	1	25	4	1,181
90	1	100	5	1,287
45	0	75	2	0,95
45	0	25	5	1,222
90	0	50	1	0,884
45	0	50	4	1,121
45	0	75	5	1,218
45	1	50	4	1,15
90	1	50	2	0,973
45	1	50	5	1,237

90	0	25	4	1,187
45	1	25	1	0,885
45	1	75	3	1,045
45	0	75	3	1,029
90	1	50	1	0,891
45	1	75	4	1,137
45	0	75	1	0,878
45	1	25	3	1,044
90	0	100	4	1,182
45	1	50	1	0,903
45	1	75	2	0,959
90	1	50	5	1,282
90	1	75	3	1,074
90	0	50	4	1,179
45	1	50	2	0,972

Efecto Citotóxico del TiO₂ sobre el melanoma

Tabla A.10 Diseño experimental efecto del TiO₂ sin radiación en Statgraphics Plus 5.1.

Tiempo exp.	método	Tiempo prol.	concentración	absorbancia
90	0	5	0	1,321
90	1	2	100	1,009
90	0	5	25	1,295
45	0	4	75	1,174
45	0	4	0	1,267
45	0	2	25	1,016
45	1	2	25	1,014
90	1	2	50	1,009
45	1	2	50	0,994
45	1	3	75	1,107
90	0	1	0	0,948
90	0	3	100	1,09
45	0	4	25	1,19
45	1	5	25	1,292
90	0	5	100	1,308
45	0	1	75	0,916
45	0	5	0	1,355
90	0	4	25	1,194
90	1	3	0	1,127
45	1	1	100	0,93
45	0	3	25	1,094

45	0	2	50	1,003
45	0	3	100	1,099
90	1	1	50	0,924
45	0	2	0	1,098
90	1	3	100	1,108
90	0	2	25	0,988
45	0	4	50	1,183
90	1	1	25	0,905
90	1	2	25	1,003
45	0	5	25	1,279
90	1	5	25	1,316
90	1	1	100	0,916
90	1	4	25	1,209
90	0	3	0	1,127
90	1	3	25	1,096
90	0	2	50	0,99
45	1	4	100	1,168
45	1	5	100	1,27
90	0	1	75	0,903
90	1	3	75	1,087
45	1	5	50	1,273
45	0	1	100	0,931
45	0	4	100	1,18
45	0	3	0	1,176
45	1	1	0	0,986
90	0	3	75	1,09
90	1	5	50	1,325
90	0	5	50	1,301
45	0	1	0	0,986
90	0	4	0	1,224
90	0	4	100	1,203
45	0	2	100	1,016
90	0	2	0	1,033
45	1	2	75	1,022
90	1	1	0	0,948
45	0	1	25	0,933
90	0	2	75	0,993
45	0	3	75	1,078
45	1	2	0	1,098
90	0	4	50	1,183
45	1	1	25	0,935
45	0	5	50	1,273
90	1	3	50	1,109

90	0	1	100	0,903
45	1	4	25	1,193
90	0	1	25	0,894
45	1	3	50	1,078
45	1	2	100	1,013
45	1	3	100	1,096
90	1	4	50	1,219
45	1	3	25	1,094
45	1	1	50	0,924
90	1	5	100	1,331
90	1	2	75	0,991
90	1	5	0	1,321
45	0	5	75	1,265
45	0	3	50	1,088
90	1	5	75	1,307
90	0	4	75	1,206
45	1	4	50	1,177
90	0	3	50	1,088
90	1	4	100	1,224
45	1	1	75	0,951
90	1	2	0	1,033
90	0	3	25	1,084
90	0	5	75	1,299
45	0	5	100	1,28
45	1	5	75	1,297
90	1	4	0	1,224
45	1	4	75	1,203
90	1	1	75	0,908
90	1	4	75	1,2
45	0	2	75	0,989
45	1	4	0	1,267
90	0	1	50	0,906
45	1	5	0	1,355
45	1	3	0	1,176
45	0	1	50	0,933
90	0	2	100	0,993

Efecto Citotóxico de la radiación UV sobre el melanoma

Tabla A.11 Diseño experimental efecto de la radiación sin TiO₂ en Statgraphics Plus 5.1.

Tiempo exp.	Tiempo proli.	radiación	absorbancia
90	1	0	0,885
45	1	1	1,047
45	3	1	1,204
90	5	1	1,297
90	1	1	0,932
45	1	0	0,986
45	4	0	1,267
90	4	0	1,166
90	5	0	1,266
90	2	0	0,97
90	3	0	1,062
45	5	1	1,376
45	5	0	1,355
45	3	0	1,176
90	4	1	1,202
45	2	1	1,124
45	4	1	1,292
45	2	0	1,098
90	3	1	1,102
90	2	1	1,012

Efecto Citotóxico del TiO₂ y la radiación UV sobre el melanoma

Tabla A.12 Diseño experimental en Statgraphics Plus 5.1.

Tiempo exp.	método	Tiempo prol.	concentración	absorbancia
90	1	100	4	1,211
90	1	25	2	0,974
45	1	100	5	1,315
45	1	25	5	1,27
45	1	25	2	1,001
90	0	25	2	0,983
90	0	100	5	1,287
45	0	50	5	1,316
45	0	75	4	1,214
90	1	25	1	0,884
90	1	100	1	0,904
45	1	100	2	1,029
45	0	50	1	0,971
90	1	50	3	1,094
90	0	100	2	0,976
45	0	100	3	1,102

45	0	25	1	0,938
90	1	50	4	1,202
90	1	75	2	0,99
45	1	100	1	0,949
45	0	100	2	1,014
90	0	100	1	0,892
45	0	50	3	1,128
90	0	25	3	1,081
90	1	100	2	0,995
90	0	25	5	1,294
45	0	100	1	0,934
90	1	100	3	1,095
90	1	25	5	1,282
90	0	50	5	1,29
45	0	100	4	1,162
90	1	75	5	1,301
45	1	75	5	1,298
45	0	25	3	1,101
90	0	75	3	1,086
90	0	100	3	1,075
45	1	100	3	1,117
90	0	75	4	1,194
45	1	25	4	1,174
45	1	50	3	1,132
90	0	75	2	0,982
45	1	75	1	0,949
90	1	75	1	0,91
90	1	75	4	1,199
45	0	100	5	1,287
90	0	75	1	0,906
90	0	50	3	1,084
45	0	25	2	1,019
45	1	100	4	1,215
90	0	25	1	0,891
90	0	75	5	1,295
90	1	25	3	1,069
45	0	25	4	1,198
45	0	50	2	1,043
90	0	50	2	0,981
90	1	25	4	1,177
90	1	100	5	1,315
45	0	75	2	1,028
45	0	25	5	1,289

90	0	50	1	0,905
45	0	50	4	1,226
45	0	75	5	1,304
45	1	50	4	1,225
90	1	50	2	0,994
45	1	50	5	1,319
90	0	25	4	1,188
45	1	25	1	0,917
45	1	75	3	1,106
45	0	75	3	1,117
90	1	50	1	0,912
45	1	75	4	1,203
45	0	75	1	0,958
45	1	25	3	1,081
90	0	100	4	1,185
45	1	50	1	0,972
45	1	75	2	1,02
90	1	50	5	1,307
90	1	75	3	1,087
90	0	50	4	1,188
45	1	50	2	1,046

ANEXO VI. ANALISIS DE VARIANZA Y TEST DE RANGOS MULTIPLES DE LOS DISEÑOS ANALIZADOS

Tabla A.13 Resultados de Análisis de Varianza (ANOVA) para el efecto del TiO₂ sobre FPHN.

Análisis de la Varianza para Densidad óptica - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					
A:concentración	0,00888544	4	0,00222136	135,14	0,0000
B:tiempo prolif.	1,7371	4	0,434274	26418,87	0,0000
C:método	0,000713117	1	0,000713117	43,38	0,0000
D:tiempo exp	0,021277	1	0,021277	1294,38	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00142929	16	0,0000893305	5,43	0,0000
AC	0,00118783	4	0,000296957	18,07	0,0000
AD	0,0093356	4	0,0023339	141,98	0,0000
BC	0,000279182	4	0,0000697954	4,25	0,0046
BD	0,00597388	4	0,00149347	90,85	0,0000
CD	0,00022336	1	0,00022336	13,59	0,0005
RESIDUOS	0,000887654	54	0,000016438		
TOTAL (CORREGIDO)	1,81085	97			

Tabla A.14. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando la concentración de TiO₂ y el efecto del óxido sobre los FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según concentración de TiO₂

Método: 95,0 porcentaje Duncan

concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	20	1,03835	0,000906588	X
25	19	1,05285	0,000946208	X
50	19	1,0604	0,000946208	X
100	20	1,06135	0,000906588	X
75	20	1,06485	0,000906588	X
Contraste				
			Diferencias	
0 - 25			*-0,0144972	
0 - 50			*-0,0220545	
0 - 75			*-0,0265	
0 - 100			*-0,023	
25 - 50			*-0,00755727	
25 - 75			*-0,0120028	
25 - 100			*-0,00850276	
50 - 75			*-0,00444549	
50 - 100			-0,000945486	
75 - 100			*0,0035	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.15 Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando el método de síntesis del TiO₂, y el efecto del óxido sobre los FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según método de síntesis

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
método	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

1	49	1,05284	0,000583529	X
0	49	1,05828	0,000583529	X

Contraste			Diferencias	

0 - 1			*0,00543709	

* indica una diferencia significativa.				

Tabla A.16 Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando el tiempo de exposición al TiO₂, y el efecto del óxido sobre los FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según tiempo de exposición

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
tiempo exp.	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos

45	50	1,04072	0,000573377	X
90	48	1,0704	0,000593154	X

Contraste			Diferencias	

45 - 90			*-0,0296807	

* indica una diferencia significativa.				

Tabla A.17. Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) considerando el efecto del TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Análisis de la Varianza para Densidad óptica - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor

EFECTOS PRINCIPALES					
A:concentración	0,044811	4	0,0112027	120,78	0,0000
B:tiempo prolif.	1,75956	4	0,439889	4742,61	0,0000
C:método	0,00156816	1	0,00156816	16,91	0,0001
D:tiempo exp.	0,00091204	1	0,00091204	9,83	0,0027
INTERACCIONES					
AB	0,00116144	16	0,00007259	0,78	0,6977
AC	0,00066184	4	0,00016546	1,78	0,0000
AD	0,0110886	4	0,00277214	29,89	0,0000
BC	0,00007094	4	0,000017735	0,19	0,9420
BD	0,00755906	4	0,00188976	20,37	0,3219
CD	0,00030276	1	0,00030276	3,26	0,0762
RESIDUOS	0,00519414	56	0,0000927525		

TOTAL (CORREGIDO) 1,83289 99

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla A.18. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando la concentración de TiO₂, con el fin de definir el efecto del óxido sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según concentración de TiO₂

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
50	20	1,099	0,00215351	X
75	20	1,0993	0,00215351	X
25	20	1,1012	0,00215351	X
100	20	1,1034	0,00215351	X
0	20	1,1535	0,00215351	X

Contraste	Diferencias
0 - 25	*0,0523
0 - 50	*0,0545
0 - 75	*0,0542
0 - 100	*0,0501
25 - 50	0,0022
25 - 75	0,0019
25 - 100	-0,0022
50 - 75	-0,0003
50 - 100	-0,0044
75 - 100	-0,0041

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.19. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando el método de síntesis del TiO₂, con el fin de determinar el efecto del TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según método de síntesis

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
método	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	50	1,10732	0,001362	X
1	50	1,11524	0,001362	X

Contraste	Diferencias
0 - 1	*-0,00792

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.20. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando el tiempo de exposición al TiO₂, para determinar el efecto del TiO₂ sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según tiempo exposición

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
tiempo exp.	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
90	50	1,10826	0,001362	X
45	50	1,1143	0,001362	X
Contraste			Diferencias	
45 - 90			*0,00604	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.21. Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) considerando el efecto de la radiación sobre FPHN.

Análisis de la Varianza para Absorbancia - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo prolif.	0,387832	4	0,0969579	151,00	0,0001
B:Radiación	0,0013778	1	0,0013778	2,15	0,0027
C:Tiempo Exposición	0,000245	1	0,000245	0,38	0,5702
INTERACCIONES					
AB	0,0012177	4	0,000304425	0,47	0,7562
AC	0,0019465	4	0,000486625	0,76	0,6027
BC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
RESIDUOS	0,0025685	4	0,000642125		
TOTAL (CORREGIDO)	0,395187	19			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla A.22. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando la radiación y su efecto sobre los FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Radiación

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Radiación	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	10	1,0565	0,00801327	X
0	10	1,0951	0,00801327	X
Contraste			Diferencias	
0 - 1			0,0166	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.23. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia considerando el tiempo de exposición a la radiación, y su efecto sobre FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Tiempo Exposición

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Nivel	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
90	10	1,0613	0,00801327	X
45	10	1,0683	0,00801327	X
Contraste			Diferencias	
45 - 90			0,007	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.24 Resultados de Análisis de Varianza (ANOVA) para efecto de la radiación sobre cáncer de piel tipo melanoma

Análisis de la Varianza para Absorbancia - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tiempo prolif.	0,326116	4	0,0815291	2280,53	0,0000
B:Radiación	0,00637245	1	0,00637245	178,25	0,0002
C:Tiempo Exposición	0,053148	1	0,053148	1486,66	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0004618	4	0,00011545	3,23	0,1413
AC	0,0007562	4	0,00018905	5,29	0,0678
BC	0,00006125	1	0,00006125	1,71	0,2607
RESIDUOS	0,000143	4	0,00003575		
TOTAL (CORREGIDO)	0,387059	19			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla A.25. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando la radiación y considerando el efecto de ésta sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Radiación

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Radiación	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
1	10	1,1217	0,00207545	X
0	10	1,1535	0,00207545	X
Contraste			Diferencias	
0 - 1			*0,0318	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.26. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando el tiempo de exposición a la radiación, y considerando el efecto de la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para Absorbancia según Tiempo Exposición

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Nivel	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
90	10	1,0894	0,00189077	X
45	10	1,1925	0,00189077	X
Contraste			Diferencias	
45 - 90			*0,1031	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.27 Resultados de Análisis de Varianza (ANOVA) considerando el efecto del TiO₂ y la radiación sobre los FPHN.

Análisis de la Varianza para absorbancia - Sumas de Cuadrados de Tipo III

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Concentración	0,00075985	3	0,000253283	8,21	0,0002
B:Tiempo de prolif.	1,3935	4	0,348376	11298,12	0,0000
C:Metodo	0,0014792	1	0,0014792	47,97	0,0000
D:Tiempo exposición	0,0154568	1	0,0154568	501,28	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00079415	12	0,0000661792	2,15	0,0335
AC	0,0010483	3	0,000349433	11,33	0,0000
AD	0,0002451	3	0,0000817	2,65	0,0608
BC	0,0001418	4	0,00003545	1,15	0,3463
BD	0,00873595	4	0,00218399	70,83	0,0000
CD	0,00003645	1	0,00003645	1,18	0,2830
RESIDUOS	0,0013259	43	0,0000308349		
TOTAL (CORREGIDO)	1,42353	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla A.28. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando la concentración de TiO₂, considerando el efecto de ésta y la radiación sobre los FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según Concentración

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
75	20	1,05815	0,00124167	X
25	20	1,06285	0,00124167	X
50	20	1,0647	0,00124167	X

100	20	1,0664	0,00124167	X
Contraste		Diferencias		
25 - 50			-0,00185	
25 - 75			*0,0047	
25 - 100			-0,00355	
50 - 75			*0,00655	
50 - 100			-0,0017	
75 - 100			*-0,00825	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.29. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando el tiempo de exposición al TiO₂ y la radiación, considerando el efecto de éstas sobre los FPHN .

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según Tiempo exposición

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Nivel	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
45	40	1,04912	0,000877993	X
90	40	1,07692	0,000877993	X
Contraste		Diferencias		
45 - 90			*-0,0278	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.30. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando el método de síntesis del TiO₂, considerando el efecto del TiO₂ y la radiación sobre los FPHN.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según Método

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Método	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	40	1,05872	0,000877993	X
1	40	1,06732	0,000877993	X
Contraste		Diferencias		
0 - 1			*-0,0086	

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.31 Resultados del Análisis de Varianza (ANOVA) considerando el efecto del TiO₂ y la radiación, sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Análisis de la Varianza para absorbancia - Sumas de Cuadrados de Tipo III					
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFECTOS PRINCIPALES					

A:Concentración	0,007103	3	0,00236767	94,01	0,0000
B:Tiempo prolif.	1,41669	4	0,354172	14062,88	0,0000
C:Metodo	0,0002048	1	0,0002048	8,13	0,0067
D:Tiempo exposición	0,013056	1	0,013056	518,41	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,00042075	12	0,0000350625	1,39	0,2068
AC	0,0039078	3	0,0013026	51,72	0,0000
AD	0,00200375	3	0,000667917	26,52	0,0000
BC	0,0001207	4	0,000030175	1,20	0,3254
BD	0,0059757	4	0,00149392	59,32	0,0000
CD	0,00028125	1	0,00028125	11,17	0,0017
RESIDUOS	0,00108295	43	0,0000251849		

TOTAL (CORREGIDO)	1,45085	79			

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio residual.

Tabla A.32. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando la concentración de TiO_2 , considerando el efecto de ésta y la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según Concentración

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
25	20	1,09055	0,00112216	X
100	20	1,10295	0,00112216	X
75	20	1,10735	0,00112216	X
50	20	1,11675	0,00112216	X
Contraste		Diferencias		
25 - 50		*-0,0262		
25 - 75		*-0,0168		
25 - 100		*-0,0124		
50 - 75		*0,0094		
50 - 100		*0,0138		
75 - 100		*0,0044		

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.33. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando el tiempo de exposición al TiO_2 y la radiación, considerando el efecto de éstas sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según Tiempo exposición

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Nivel	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
90	40	1,09163	0,000793487	X
45	40	1,11718	0,000793487	X

Contraste	Diferencias
45 - 90	*0,02555

* indica una diferencia significativa.

Tabla A.34. Contraste Múltiple de Rangos para la Absorbancia tomando el método de síntesis del TiO_2 , considerando el efecto del TiO_2 y la radiación sobre el cáncer de piel tipo melanoma.

Contraste Múltiple de Rangos para absorbancia según Método

Método: 95,0 porcentaje Duncan				
Método	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
0	40	1,1028	0,000793487	X
1	40	1,106	0,000793487	X

Contraste	Diferencias
0 - 1	*-0,0032

* indica una diferencia significativa.