

## Evaluación y caracterización de nanotubos de TiO<sub>2</sub> sintetizados por vía hidrotérmica con aplicación en ingeniería de materiales

*Evaluation and characterization of TiO<sub>2</sub> nanotubes synthesized via hydrothermal method with application in materials engineering*

Nicolás E. Obando<sup>1</sup>    David A. Pinilla<sup>1\*</sup>    Hugo Zea<sup>2</sup>    Alis Pataquiva-Mateus<sup>1</sup>

Recibido 08 de mayo de 2018, Aceptado 13 de septiembre de 2018

*Received: May 08, 2018    Accepted: September 13, 2018*

### RESUMEN

Los nanotubos de dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>-NTs) han llamado la atención en los últimos años debido a su amplia gama de propiedades tales como la actividad eléctrica, óptica, fotocatalítica y la compatibilidad biológica, entre otras. En este trabajo, se sintetizaron TiO<sub>2</sub>-NTs con un diámetro promedio entre 65-100 nm mediante la vía hidrotérmica y se caracterizaron física, química y biológicamente (SEM, XRD, FTIR y cultivo *in vitro*), encontrándose otras estructuras como nanohojas y microtubos. Condiciones de síntesis como pretratamiento de precursores, concentración de NaOH y tiempo de reacción se estudiaron a través de dos diseños experimentales con el fin de obtener morfologías y tamaños óptimos. Se propuso un mecanismo de crecimiento para comprender la formación de nanotubos. Finalmente, el material obtenido fue usado como catalizador en la fotodegradación del colorante azo Orange II, obteniendo así una superficie de respuesta con un valor de degradación del 97% a pH 8, con concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 1,5 g/L y una concentración de colorante inicial de 25 ppm.

Palabras clave: Nanotubos de dióxido de titanio, vía hidrotérmica, fotocatalisis, Orange II, colorante azo.

### ABSTRACT

*Titanium dioxide nanotubes (TiO<sub>2</sub>-NTs) have drawn inward attention in recent years due to their wide range of properties such as electrical, optical, photocatalytic activity, and biological compatibility, among others. In this work, TiO<sub>2</sub> nanotubes with an average diameter between 65-100 nm were synthesized via hydrothermal method and were characterized chemically, physically, and biologically (SEM, XRD, FTIR and *in vitro* culture), and another structure, like nanosheets and microtubes, can be found as well employing this processing route. Synthesis conditions such as pre-treatment of precursors, NaOH concentration, and reaction time were studied through two experimental designs to obtain the best morphologies and sizes. A growth mechanism was proposed to understand the formation of nanotubes. Finally, the material obtained was used as a catalyst in the photodegradation of the azo dye Orange II, obtaining a response surface that predicts a 97% degradation at a pH value of 8, with an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration of 1.5 g/L and an initial dye concentration of 25 ppm.*

*Keywords: Synthesis, dioxide titanium nanotubes, via hydrothermal, photocatalysis, Orange II, CHO, HeLA, azo dye.*

---

<sup>1</sup> Departamento de Ingeniería. Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia

\* Autor de correspondencia: [davida.pinillamo@utadeo.edu.co](mailto:davida.pinillamo@utadeo.edu.co)

## INTRODUCCIÓN

En el ámbito de investigación de nuevos materiales a escala nanométrica, estructuras como los nanotubos de carbono han sido ampliamente estudiados y trabajados con el fin de buscar aplicaciones al servicio de la humanidad. Adicionalmente, se han reportado otros tipos de nanotubos a base de silicio, nitruro de boro, grafenados y de dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ -NTs), los cuales han llamado la atención en los últimos años debido a su amplio rango de propiedades eléctricas, ópticas, fotocatalíticas y biológicas [1], entre otras.

Para sintetizar  $\text{TiO}_2$ -NTs hay tres vías: la hidrotérmica [2], anodización [3] y por membranas [4]. Siendo la vía hidrotérmica la ruta menos usada en comparación con la anodización, con la ventaja de escalarse industrialmente con un estudio más avanzado en cuanto a las condiciones óptimas [5]. La síntesis hidrotérmica se basa en el uso de un reactor de tipo *teflon-lined* donde se introduce una solución alcalina concentrada con el precursor de  $\text{TiO}_2$  y luego se lleva a un autoclave por varias horas a presión y temperaturas por encima de  $100\text{ }^\circ\text{C}$  [4], [6] obteniendo estructuras nanotubulares.

Entre las aplicaciones de los  $\text{TiO}_2$ -NTs se han reportado estudios relacionados con: liberación de fármacos [7], como catalizador en celdas solares (*dye sensitized solar cell*) [8] y recubrimiento de implantes óseos [9], logrando buenos resultados en cuanto actividad celular y recuperación ósea tanto *in vitro* como *in vivo* [10].

En cuanto a las propiedades fotocatalíticas de  $\text{TiO}_2$ , es sabido que las características significativas de estos materiales recaen en el *bandgap* (diferencia de energía entre la parte superior de la banda de valencia y la inferior de la banda de conducción), morfología, área superficial, estabilidad y reusabilidad. El  $\text{TiO}_2$  es activado con luz UV, visible o la combinación de las dos; cuando esto sucede, los electrones fotoexcitados se mueven desde la banda de valencia hasta la banda de conducción. Los electrones fotoexcitados también, son capaces de reducir u oxidar compuesto que se absorban sobre la superficie del material fotocatalítico. La actividad fotocatalítica se da de dos formas (i) generación de radicales  $\cdot\text{OH}$  debido a la oxidación de aniones  $\text{OH}^-$ , (ii) generación de  $\text{O}_2^-$  por la reducción de  $\text{O}_2$ ;

los dos pueden reaccionar con contaminantes para degradarlos o transformarlos en compuestos menos perjudiciales [11]. Dentro de las reacciones de óxido-reducción, se busca la transformación de compuestos altamente tóxicos a compuesto menos tóxicos o  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Las propiedades fisicoquímicas de los fotocatalizadores se distribuyen en su rendimiento, tamaño, forma, morfología y composición [12]. Los radicales  $\cdot\text{OH}$  producidos por el  $\text{TiO}_2$  es de las especie oxidante más fuerte con un potencial de  $2,8\text{ V}$  [13]. A diferencia de otros radicales, los radicales hidroxilos no son selectivos y atacan grupos orgánicos de larga cadena; con el tiempo y las condiciones suficientes es posible mineralizar los contaminantes en  $\text{CO}_2$ . En el caso del  $\text{TiO}_2$  el factor limitante es el transporte de electrones dada la estructura del material, pues el desorden estructural el contacto entre dos fases cristalinas reduce la movilidad de electrones. Por otro lado, las estructuras a nanoescala altamente organizadas tienen el potencial de mejorar el transporte de electrones.

El presente trabajo tiene como objetivos (i) el estudio de los factores más relevantes, mediante diseño de experimentos, que afectan la síntesis de los  $\text{TiO}_2$ -NTs como lo son tiempo de reacción, concentración de  $\text{NaOH}$  y efecto del ultrasonido como pretratamiento de los precursores, (ii) caracterizaron física, química y biológica de los  $\text{TiO}_2$ -NTs sintetizados y finalmente, (iii) aplicar el nanomaterial y determinar las condiciones óptimas para obtener la mayor degradación fotocatalítica del colorante azo Orange II haciendo uso de los  $\text{TiO}_2$ -NTs como catalizador.

## SÍNTESIS HIDROTÉRMICA DE $\text{TiO}_2$ -NTS

La vía hidrotérmica empleada en este proyecto fue basada en el trabajo realizado por el grupo de de Liu y colaboradores [5] y modificado a partir de los resultados obtenidos de los diseños experimentales reportados en la literatura [6], [14]. Esto último en base a tomar las variables más relevantes para la preparación de nanotubos de  $\text{TiO}_2$  por vía hidrotérmica.

El procedimiento realizado consistió en tomar  $2,5\text{ g}$  del precursor de  $\text{TiO}_2$  comercial Degussa P-25 y  $25\text{ mL}$  de solución de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) concentrada. Esta mezcla se llevó al reactor tipo *teflon-lined* Hydrion scientific, HTR-100 (Figura 1).

Inicialmente, la muestra fue introducida en el tubo interno de teflón (Figura 1a) y se homogenizó por 5 min en vortex (Boeco, V-1 plus). Posteriormente, el tubo de teflón se introdujo en la coraza de acero inoxidable (Figura 1b) asegurando un buen sello de tal manera que el reactor quede como se muestra en la Figura 1c.

El reactor debidamente cerrado se llevó a la autoclave (All American, N° 25X) a una presión de 15 psi y una temperatura ~ 130 °C, y los tiempos de reacción fueron variables de acuerdo a lo especificado en el diseño experimental.

Cuando el tratamiento hidrotérmico concluyó, la muestra fue retirada del reactor y se realizó un lavado con 5 mL de ácido clorhídrico (HCl 0,1 M) con el fin de retirar remanentes de la reacción. La muestra lavada se dispuso a un tubo falcón de 50 mL y se centrifugó (ROTOFIX 32, Hettich) por 30 min a 4000 rpm a temperatura ambiente. Luego, se extrajo el sobrenadante mientras que el precipitado se llevó a un crisol y se secó en un horno (Binder, BD 400) por 30 min a 80 °C. A seguir, la muestra se calcinó en mufla (Terrigeno, MM15) por 30 min a 500 °C a presión atmosférica. Finalmente, la muestra calcinada se maceró por 5 minutos en un mortero de ágata con el fin de disminuir el tamaño de partículas.

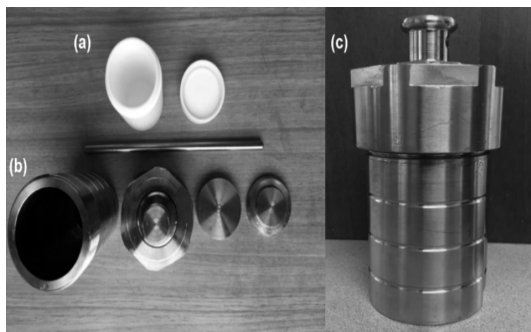


Figura 1. Reactor tipo teflón-lined Hydrion scientific 100 mL, (HTR-100).

### SÍNTESIS DE TiO<sub>2</sub>-NTS CON PRETRATAMIENTO DE PRECURSORES

Según estudios reportados en los trabajos de Kustiningsih [15] al realizar un combinación de ultrasonido con tratamiento hidrotérmico se logra

reducir los tiempos de reacción hasta 4 h debido al contacto de las interfaces. Esta reducción de tiempos podría ayudar a reducir los costos energéticos asociados en el proceso de síntesis.

Debido a lo anterior, se realizó un diseño experimental el cual buscó correlacionar el comportamiento de las variables independientes (concentración NaOH y tiempo de reacción) con la variable dependiente (morfología de tubo nanométrico) empleando un pretratamiento de los reactivos mediante ultrasonido.

El pretratamiento se inició tomando 2,5 g del precursor TiO<sub>2</sub> comercial Degussa P-25 y 25 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) concentrada en un Erlenmeyer de 50 mL, el cual se llevó a un baño de ultrasonido (Bransonic, M3800H) a una potencia de 110 W, a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se continuó el tratamiento hidrotérmico mencionado anteriormente. Los valores empleados para el diseño experimental seleccionado (central compuesto) están plasmados en la Tabla 1, para lo cual se tomó un valor  $\alpha$  de 1,75, con el objetivo de asegurar ortogonalidad y rotabilidad.

Con la metodología ya mencionada, se realizó un diseño experimental de tipo central compuesto. En la Tabla 2, se tomaron tiempos de reacción más largos en relación a la Tabla 1, debido a que en la literatura se reportan reacciones prolongadas en ausencia de pretratamiento [6].

Tabla 1. Diseño experimental central compuesto con pretratamiento de ultrasonido.

Variable	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentración hidróxido de sodio NaOH(M)	3,12	5	7,5	10	11,88
Tiempo tratamiento hidrotérmico (horas)	1,25	2	3	4	4,75

Tabla 2. Diseño experimental central compuesto sin pretratamiento.

Variable	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Concentración hidróxido de sodio NaOH(M)	3,12	5	7,5	10	11,88
Tiempo tratamiento hidrotérmico (horas)	2,5	4	6	8	9,5

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

Las muestras obtenidas de los dos diseños experimentales fueron llevadas a metalización con oro bajo la técnica de pulverización catódica (sputtering) con un espesor de capa de entre 5-10 nm. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de barrido de electrones (SEM, de sus siglas en inglés) (JEOL JSM-6490LV) a 20 kV. Para la cuantificación del diámetro de los TiO<sub>2</sub>-NTs se empleó el software Image J [16].

## DIFRACCIÓN DE RAYOS X (XRD)

500 mg de material fueron colocados en el porta muestras del equipo Panalytical X'pert (operando a 40 mA, 40 kV y en posición 2θ), por medio de un cátodo de cobre se incidieron rayos X que al contacto con muestra cristalina es capaz de brindar información de la posición y organización de los átomos. Haciendo uso del software X'pert High Score Plus y Excel® para el análisis y generación de los patrones de las muestras, respectivamente.

## ESPECTROSCOPIA INFRARROJA DE TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Para el análisis de grupos funcionales por FTIR, se tomaron 0.1 g de la muestra, aproximadamente, y fueron colocados en el cristal del equipo (Agilent technologies, Cary 360 FTIR) para realizar la lectura correspondiente.

## CULTIVO CELULAR IN VITRO

Para la caracterización biológica se tomaron 6 piezas de un implante ortopédico de aleación Titanio-Platino y se lijaron para retirar el recubrimiento de pintura original. Estos implantes fueron tomados como sustrato para el recubrimiento con TiO<sub>2</sub>-NTs, una vez que son biomateriales comerciales (Health Joy ©, China). Posteriormente, se llevaron a un erlenmeyer de 50 mL donde se sumergieron en su totalidad en etanol 96% v/v, luego se realizó un baño de ultrasonido (Branson, M3800H) a una potencia de 110 W durante 10 min. Posteriormente, 5 piezas de implantes se llevaron al reactor hidrotérmico con 2,5 g de TiO<sub>2</sub> Degussa-p25 y 25 mL de NaOH 10M por 6 h, se realizó la calcinación al finalizar el tratamiento hidrotérmico para recubrir superficialmente las

piezas de implantes con TiO<sub>2</sub>-NTs, dejando una pieza restante como blanco (sin recubrimiento). Finalmente, en las instalaciones de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del Valle, las piezas de implantes fueron evaluadas bajo las líneas celulares CHO (*Chinese Hamster Ovary*) y HeLa (células provenientes de cáncer cérvico uterino) por 24 y 48 h para determinar la citotoxicidad en presencia del testigo (implante de titanio sin ningún tipo de recubrimiento) y de los implantes recubiertos con TiO<sub>2</sub>-NTs. Se realizaron pruebas por triplicado de acuerdo al manual "Cytotoxicity Detection kit (LDH)" de Roche.

## DEGRADACIÓN DE ORANGE II EMPLEANDO H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>-NTS/UV

Dentro de la necesidad de aplicar los procesos avanzados de oxidación (PAOs) en aguas residuales de la industria textil, se ha propuesto la actividad fotocatalítica de los TiO<sub>2</sub>-NTs y las demás estructuras generadas durante la síntesis. Para eso, se realizó un diseño experimental, el cual buscó relacionar las variables más relevantes en la reacción de foto degradación de colorante Orange II y se estableció un diseño Box-Behnken con 5 puntos centrales. Teniendo en cuenta trabajos realizados por [17], [18] se seleccionaron los valores que se encuentran en la Tabla 3.

En un beaker de vidrio se introdujeron 200 mL de solución de colorante Orange II (C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>4</sub>S, Sigma-Aldrich®) junto a 100 mg del catalizador TiO<sub>2</sub>-NTs y se ajustó el pH con NaOH (0,1M) o HCl (0,1M), según el caso. Además, se añadió la cantidad de peróxido de hidrógeno requerido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% v/v) y luego la solución se llevó a exposición de luz ultravioleta (UV-C 280 nm-200 nm) con una intensidad de luz de 388 lumen, a temperatura ambiente bajo agitación magnética a 300 rpm, en el equipo (Figura 2) que se encuentran ubicados

Tabla 3. Valores diseño experimental tipo Box-Behnken degradación fotocatalítica de Orange II.

Variable	+	0	-
Concentración H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (g/L)	2	1	0
Ph	11	7	3
Concentración Orange II (ppm)	40	25	10

en los Laboratorios de Ingeniería Química de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá.

A 0, 5, 10, 15, 25, 30, 60 y 90 minutos se tomaron alícuotas filtradas (filtro 0,22 µm) que fue leída en el espectrofotómetro (Thermo Scientific, Genesys 20) a una longitud de onda de 486 nm tomando como blanco de referencia agua destilada; luego de la lectura de absorbancia la alícuota fue regresada a la solución para no variar el volumen de reacción.



Figura 2. equipo experimental para la exposición de luz UV-C

## RESULTADOS

### Evaluación de los TiO<sub>2</sub>-NTs obtenidos por vía hidrotérmica

La morfología, variable de respuesta de los diseños experimentales, fue categorizada a partir de las estructuras obtenidas: (i) nanotubos, considerados estructuras tubulares cuyo diámetro es inferior a 100 nm, (ii) microtubos, considerados estructuras tubulares cuyo diámetro es superior a 100 nm y (iii) nanohojas, que según el escenario de formación propuesto por [19] son estructuras intermedias en la reacción de síntesis. Para cada micrografía se tomó un mínimo de 30 medidas para determinar el diámetro promedio a través del software ImageJ. [16].

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos de la combinación entre el tratamiento hidrotérmico con ultrasonido por 1 h.

Según el trabajo de Liu y colaboradores [5] la sonicación puede generar nanohojas incluso antes del tratamiento hidrotérmico lo cual facilitar

la conversión hacia nanotubos. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación muestran la obtención de microtubos (Figura 3b) en su mayoría con diámetros entre 0,22 y 3,6 µm y sólo en la muestra 10 se logró apreciar la formación de nanotubos con diámetros promedio entre 84-100 nm (Figura 3a) a una concentración de NaOH 5 M y tiempo de reacción de 2 h. Para lo anterior, se sugieren las siguientes explicaciones: (i) la potencia del ultrasonido suministrada por el equipo en esta investigación fue de 110 W mientras que la literatura reporta potencias superiores a 380 W y (ii) a su vez la temperatura de pretratamiento con ultrasonido fue ambiente mientras que la literatura reporta temperaturas cercanas a 70 °C [20].

Los resultados que plasmados en la Tabla 5 evidencian que, únicamente 4 muestras lograron la conversión a nanotubos con diámetro entre 65 nm y 100 nm (Figura 4a), así como microtubos con diámetros entre 1 y 4,4 µm (Figura 4b) y nanohojas (Figura 4b). Se establece que tiempos de reacción más largos, brindan mejores resultados en cuanto a morfologías de TiO<sub>2</sub>-NTs y que con NaOH de 5M en adelante se pueden obtener nanoestructuras. Sin embargo, se han encontrado que otras variables afectan este tipo de proceso como lo son el pH, agitación *in situ*, área superficial, tiempos de reacción prolongados, entre otras.

Tabla 4. Resultado cualitativo del diseño experimental central compuesto con pretratamiento de ultrasonido.

Muestra	[NaOH] M	Tiempo (h)	Resultado
1	+1	-1	NS-MTs
2	0	-α	NS-MTs
3	-α	0	MTs
4	0	+α	MTs
5	0	0	NS-MTs
6	+α	0	NS-MTs
7	+1	+1	MTs
8	0	0	NS-MTs
9	-1	+1	MTs
10	-1	-1	NTs- NS
11	0	0	MTs
12	0	0	MTs

NTs: Nanotubos (diámetro < 100 nm) NS: Nanohojas  
MTs: Microtubos (diámetro > 100 nm).

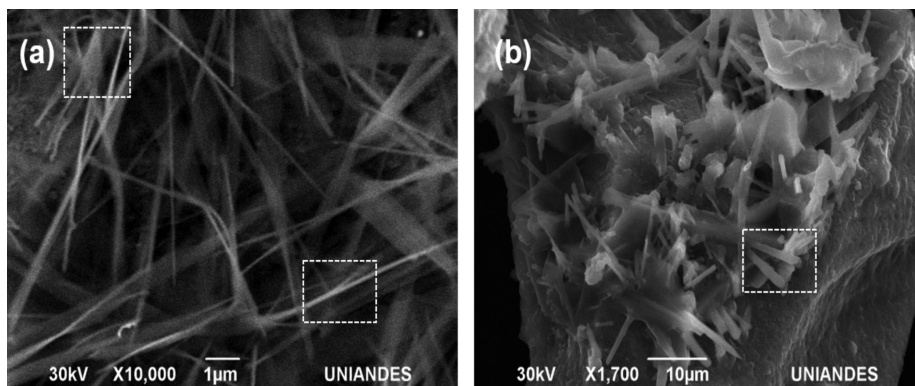


Figura 3. Micrografías SEM de las estructuras obtenidas del diseño experimental con pretratamiento ultrasonido a) Nanotubos y nanohojas presentes en la muestra 10 y b) Microtubos presentes en la muestra 9.

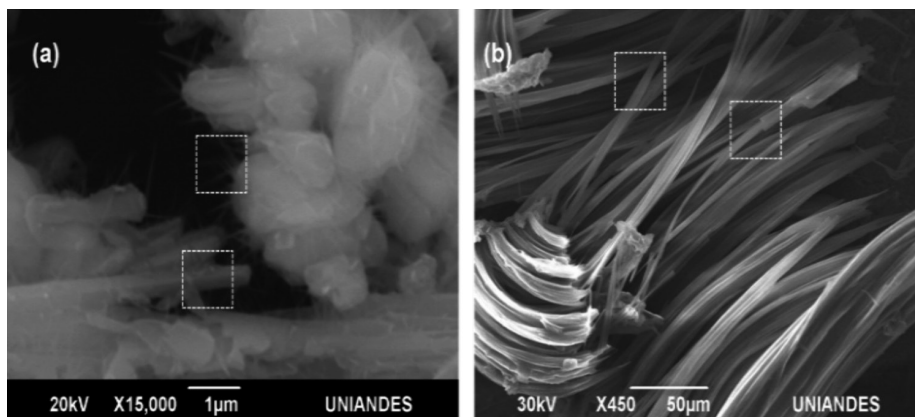


Figura 4. Micrografías SEM diseño experimental sin pretratamiento. a) Nanotubos presentes en la muestra 1 y b) Microtubos y nanohojas presentes en la muestra 10.

Tabla 5. Resultado cualitativo del diseño experimental central compuesto sin pretratamiento de ultrasonido.

Muestra	[NaOH] M	Tiempo (h)	Resultado
1	-1	-1	NTs- MTs
2	+1	-1	MTs
3	0	+1	NTs- MTs
4	+1	+1	NS-MTs
5	-α	0	NTs- MTs
6	+α	0	NS-MTs
7	0	-α	NTs- MTs
8	0	+α	MTs
9	0	0	NS-MTs
10	0	0	NS-MTs

NTs: Nanotubos (diámetro < 100 nm) NS: Nanofojas  
 MTs: Microtubos (diámetro > 100 nm).

### ANÁLISIS FT-IR

En cuanto al análisis FTIR se conoce que es usado generalmente para el estudio de compuestos orgánicos, pero debido a la naturaleza metálica de las muestras este tipo de análisis químico puede brindar una evaluación de los grupos orgánicos que pudieron asociarse por la reacción. Los grupos asociados son grupos hidroxilos (OH<sup>-</sup>) con un ancho de banda agudo entre 3742 y 3675 cm<sup>-1</sup> o 3720 y 3640 cm<sup>-1</sup> [14], [21] lo que se evidencia en las Figuras 5 y 6. Estos grupos dependen en gran proporción de la forma de preparación y de la pureza del precursor, debido a que el material Degussa P25 tiene una proporción de 90% anatasa y 10% rutilo, se pueden encontrar picos entre 1444 y 1608 cm<sup>-1</sup> que se evidencia en las Figuras 5 y 6

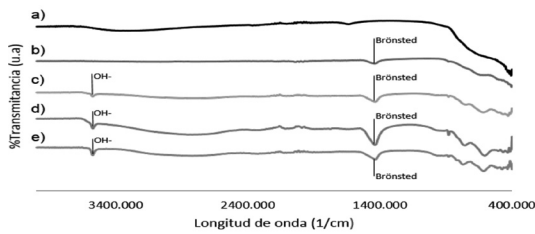


Figura 5. FT IR Muestras obtenidas del diseño experimental con pretratamiento de ultrasonido a) TiO<sub>2</sub> Degussa P-25 b) Muestra 10. c) Muestra 8. d) Muestra 5. e) Muestra 1.

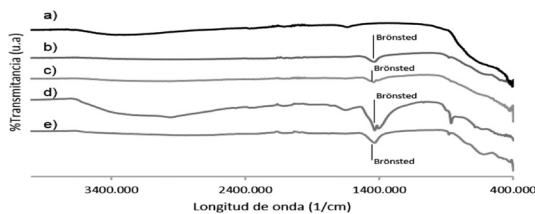


Figura 6. FT IR Diseño experimental sin pretratamiento a) TiO<sub>2</sub> Degussa P-25 b) Muestra 7. c) Muestra 5. d) Muestra 3. e) Muestra 1

en las muestras b, c, d y e, por la capacidad que tiene la anatasa de generar ácidos tipo Brønsted en presencia de NaOH. Estos ácidos se presentan cuando la concentración de NaOH se incrementa con el fin de formar Ti-O-Na y luego con el lavado generar Ti-OH. La presencia de estos ácidos se incrementa al aumentar la relación Ti/Na lo que resulta en la exfoliación de los planos Ti-O [14].

### ANÁLISIS XRD

Dentro de los resultados a partir del XRD del diseño experimental sin pretratamiento (Figura 8) solo se tuvieron en cuenta las muestras en las que se obtuvo TiO<sub>2</sub>-NTs. Los análisis a partir de XRD muestran que luego de calentar las muestras a 500 °C por 30 min, los picos de intensidad de las muestras bajan significativamente a comparación de los registrados del precursor TiO<sub>2</sub> Degussa P-25 (Figura 7). La difracción de rayos X en materiales cristalinos se da en direcciones ordenadas cuando chocan con los planos intersticiales, lo que se evidencia en una intensidad de pico alta; por otro lado los materiales amorfos o poco cristalinos permiten que los rayos X

se distribuyan de manera aleatoria provocando un amplio espectro del rango 2θ por tanto la intensidad de los picos de las muestras obtenidas es menor [22].

Sin embargo, en las muestras 1, 3 y 7 se presenta un pico agudo en 40° que sugiere la formación de titanatos de sodio que según lo reportado en el trabajo de Meng y colaboradores [23], al tratar muestras de TiO<sub>2</sub> que presentan rutilo con bases fuertes como el NaOH se presenta la conversión hacia productos intermedios como el α-Na<sub>2</sub>TiO<sub>2</sub> o el γ-Na<sub>2</sub>TiO<sub>3</sub> cuya estabilidad en la naturaleza aún no es clara, estas estructuras intermedias presentes indican que el lavado realizado no alcanzó a retirar todos los iones Na<sup>+</sup>, generando trazas de NaOH que al momento de calentar la muestra permitió su cristalización. No obstante, la presencia de estas estructuras intermedias, se sugiere presencia de nanohojas como se observan en la micrografía de la Figura 4b.

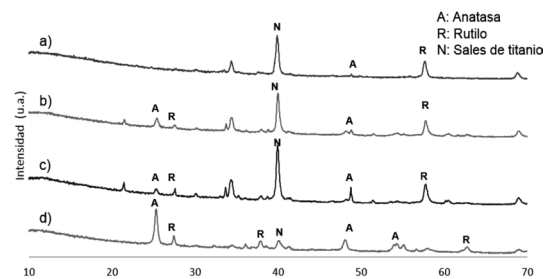


Figura 8. Análisis XRD del diseño experimental central compuesto sin pretratamiento calcinado a 500 °C por 30 minutos a) Muestra 7. b) Muestra 3. c) Muestra 1. d) Muestra 5.

A través del software de análisis XRD High Score Plus® se tomó el patrón de difracción de rayos X de la muestra 3 y al compararlo con posibles candidatos se obtuvo la cuantificación de las fases presentes como se muestra en la Figura 9, obteniendo un 50% de titanato de sodio, 35% de fase Anatasa y 15% de rutilo. Por lo anterior, se establece que la reacción logró pasar de una estructura altamente cristalina a una estructura con menos cristalinidad por el cambio de morfología; sin embargo, no se logró una pureza deseada por la presencia de titanato de sodio (Na<sub>4</sub>Ti<sub>5</sub>O<sub>12</sub>).

### CULTIVO CELULAR *IN VITRO*

La prueba de citotoxicidad realizada se basa en el método de coloración enzimática. El mecanismo se

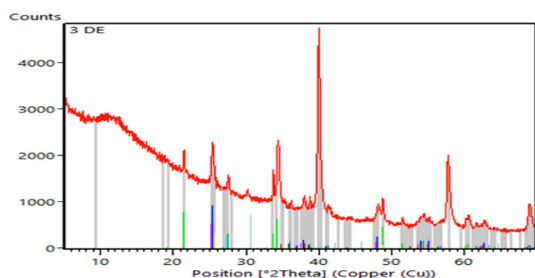


Figura 9. Cuantificación fases presentes por medio del patrón de difracción muestra 3.

lleva a cabo cuando el NAD<sup>+</sup> se reduce a NADH/H<sup>+</sup> por la conversión de lactato a piruvato en presencia de la lactato deshidrogenada (LDH). Luego, los H<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> transferidos permiten un cambio de color rojo fuerte (490-500 nm) del catalizador evidenciando muerte celular [24]. Esto, debido a que la LDH es una enzima presente en dentro de todas las células vivas, es por tanto que cuando hay un rompimiento celular, se libera LDH provocando el marcador positivo en esta prueba. Dentro de los resultados obtenidos con células de HeLa y CHO, se evidenció que los blancos o testigos (implantes sin recubrimiento) mostraron una citotoxicidad a 24 h de aproximadamente 5% por lo cual las células están vivas en su mayoría y no se presentó una coloración fuerte (Figura 10a), luego de 48 h se presentó 10% aproximadamente para los dos tipos de células. Para los implantes de titanio-platino recubiertos con TiO<sub>2</sub>-NTs, se presentó citotoxicidad a las 24 h para HeLa y CHO de 65%, mostrando un color rojo fuerte (Figura 10b) y a las 48 h de 80%, aproximadamente. Adicionalmente,

se observó que las muestras recubiertas con nanotubos están un 20% por debajo del marcador alto (citotoxicidad 100%), lo cual nos indica que el material es altamente citotóxico para aplicaciones *in vivo* dado el rompimiento celular, que en este caso sucede respecto a un factor químico, siendo este la presencia de remanentes de NaOH; esto se denomina como choque osmótico pues la concentración del medio fue superior a 1M [25].

Con el objetivo de reducir las impurezas y así evitar citotoxicidad y/o reacciones secundarias por la presencia en exceso de hidróxido de sodio en el material (TiO<sub>2</sub>-NTs), se requirió abundante lavado con agua destilada y HCl 0.1M para lograr un pH neutro antes de la calcinación. La Figura 11a muestra el material lavado final con una menor presencia de sodio verificado por EDS en la Figura 11b.

### MECANISMO DE CRECIMIENTO PROPUESTO

A través del estudio físico de las muestras realizadas a diferentes condiciones de síntesis por vía hidrotérmica, se identificaron diversas morfologías que podrían dar soporte a lo propuesto en la literatura y que permitiría seguir dando luces en el mecanismo de crecimiento de nanotubos de titanio por este método de síntesis. Es así, como Kasuga y colaboradores [2] establecen que en primera instancia las partículas de TiO<sub>2</sub> se encuentran dispersas (Figura 12a), al agregar la solución concentrada de NaOH, que actúa como agente reductor, las partículas se aglomeran y los enlaces O-Ti-O que

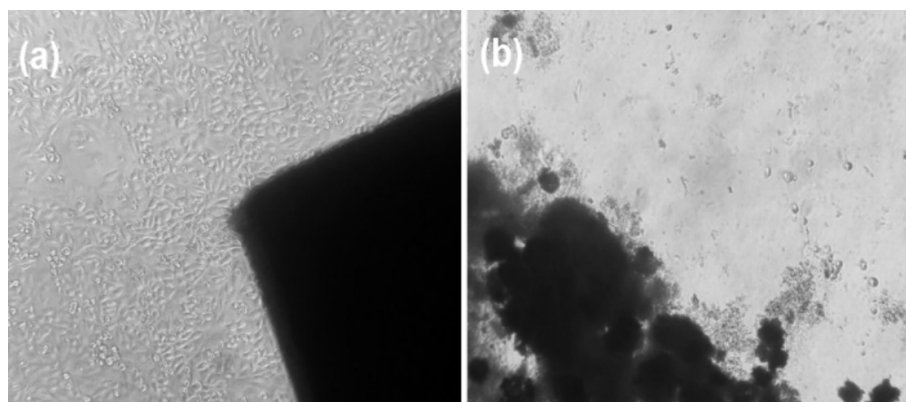


Figura 10. Células HeLa 10 X, 24 h. a) Pieza de implante sin recubrimiento. b) Pieza de implante con recubrimiento.

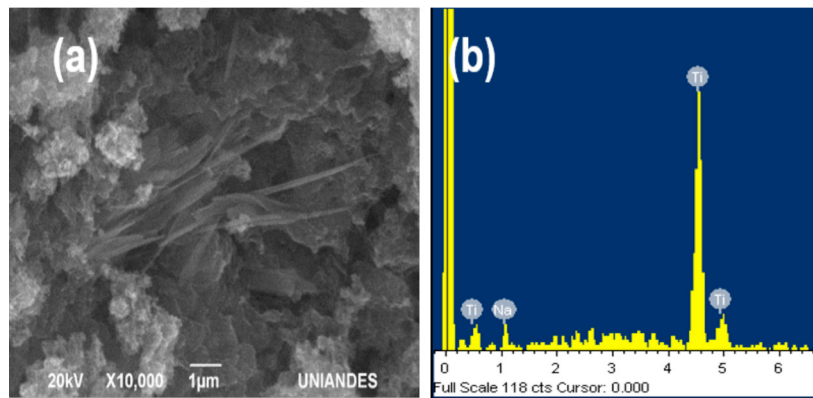


Figura 11. Material lavado obtenido por vía hidrotérmica. a) Micrografía SEM. b) Análisis EDS.

pasan a ser enlaces Ti-O-Na formando estructuras en forma de nanohojas (Figura 12b). Luego del proceso hidrotérmico, el producto es lavado con ácido provocando una carga superficial por los iones  $\text{H}^+$ , que son capaces de retirar iones  $\text{Na}^+$  provocando la conversión en nanohojas con enlaces Ti-OH, que a temperaturas superiores a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , logran separarse entre sí (Figura 12c). Posteriormente, en el proceso de deshidratación (secado y calcinado) se consiguen cerrar las nanohojas formando nanotubos

por la presencia de enlaces Ti-O (Figura 12d). Finalmente, Vu y colaboradores [19] estudiaron la morfología de  $\text{TiO}_2$ -NTs, sintetizados también por vía hidrotérmica, y propusieron un mecanismo de crecimiento sustentado en el análisis realizado por microscopía electrónica de transmisión (TEM, de sus siglas en inglés), donde las reacciones de síntesis propuestas buscan dilucidar los productos intermedios y sus morfologías durante la reacción;

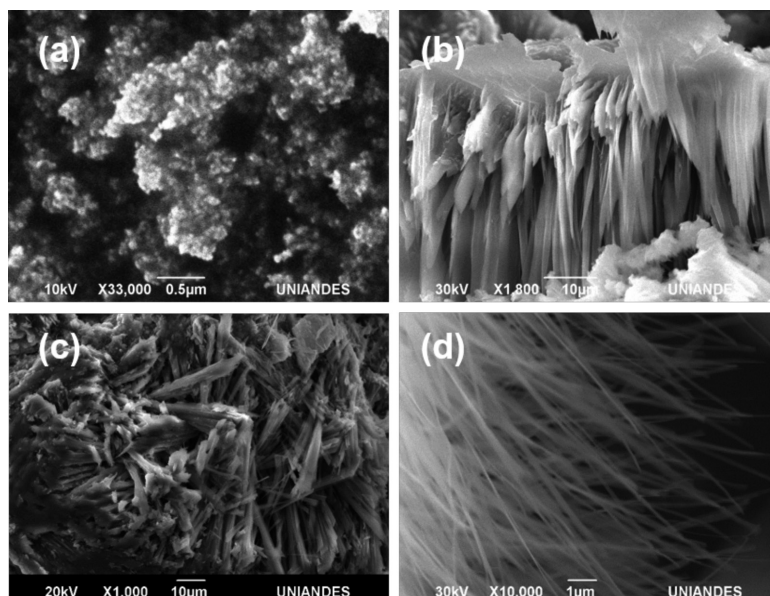


Figura 12. Mecanismo de crecimiento de estructuras tubulares por vía hidrotérmica (a) Micrografía SEM  $\text{TiO}_2$  Degussa- p. 25. (b) Aglomeración y crecimiento de nano hojas. (c) Nanohojas y microtubos. (d) Nanotubos de  $\text{TiO}_2$ .

encontrándose similitud con el presente trabajo desde dos análisis diferentes de morfología (SEM y TEM).

### DESEMPEÑO DE TiO<sub>2</sub>-NTS EN LA DEGRADACIÓN DE ORANGE II

Luego de 90 min de reacción y de las correspondientes lecturas de absorbancia en cada muestra, se calculó el porcentaje de degradación con la ecuación (1) obteniendo los resultados de la Tabla 6.

$$\% \text{ Degradación} = \frac{Abs - Abs \text{ final}}{Abs \text{ inicial}} * 100 \quad (1)$$

Tabla 6. Resultados diseño de experimentos Box-Behnken degradación fotocatalítica de Orange II.

Muestra	pH	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (g/L)	[O II] (ppm)	% Degradación
1	+	0	+	69,8
2	-	0	+	74
3	0	0	0	91,8
4	+	+	0	93,8
5	0	0	0	91,2
6	0	0	0	87,25
7	+	-	0	9,1
8	-	-	0	4,2
9	+	0	-	94,3
10	0	-	-	31,6
11	0	+	-	93,28
12	0	0	0	80,3
13	-	0	-	93,25
14	0	+	+	77,6
15	-	+	0	71,5
16	0	0	0	87,0
17	0	-	+	3,0

### SUPERFICIE DE RESPUESTA

A través del software Design-Expert® se hizo un estudio estadístico de los datos obtenidos, generando así un modelo cuadrático capaz de predecir la variable respuesta %Degradación en función de las 3 variables trabajadas. El modelo de superficie de respuesta con un R<sup>2</sup> de 0,98 en términos de las variables actuales, es el siguiente:

$$\hat{Y} = 21.95 + 5.19 \text{ pH} + 97.3 [\text{H}_2\text{O}_2] - 1.02 [\text{Orange}] - 0.35 \text{ pH}^2 - 37.16 [\text{H}_2\text{O}_2]^2 + 4.55^{-3} [\text{Orange}]^2 + 1.08 \text{ pH} [\text{H}_2\text{O}_2] - 0.021 \text{ pH} [\text{Orange}] + 0.21 [\text{H}_2\text{O}_2] [\text{Orange}] \quad (2)$$

En el modelo graficado en la Figura 13, se aprecia que en concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el porcentaje de degradación es bajo ya que la reacción no tiene un coadyuvante para generar radicales necesarios, mientras que a valores de 1.5 g/L y un pH de 8 se obtiene mayor degradación. El modelo a su vez, fue evaluado por ANOVA al 95% de significancia proporcionando un valor-p de 0.0001, lo cual permite concluir que el experimento fue significativo y las medidas fueron acertadas.

### Efecto del pH

En la degradación fotocatalítica, el pH afecta el avance del proceso debido a las propiedades de las cargas superficiales del TiO<sub>2</sub>. En este caso, el efecto del pH en la degradación de Orange II con UV/TiO<sub>2</sub> NTs/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se estudió teniendo como referencia una concentración de este colorante de 25 ppm y 1 g/L de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, debido a que estas condiciones corresponden a los puntos centrales del diseño experimental.

Con el rango de pH entre 3 y 11 (Figura 14), se evidencia un comportamiento parabólico, teniendo como punto óptimo un pH ~ 8; esto se debe a que a mayor valor pH hay mayor presencia de hidroxilos en la superficie del TiO<sub>2</sub>-NTs, resultando en la formación de radicales ·OH, causando un incremento en la degradación del colorante [26]. No obstante, luego del punto óptimo se observa un descenso de la degradación, esto debido a que a pH mayores a 8, la cantidad de radicales OH<sup>-</sup> aumenta, induciendo la reducción de la fotoactividad del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por su descomposición en agua y oxígeno molecular, como se presenta a continuación [27]:

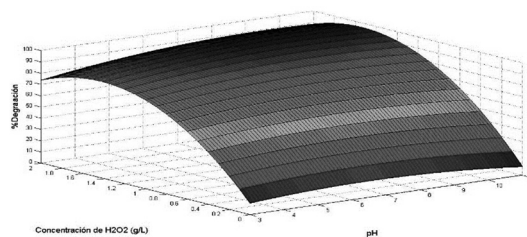


Figura 13. Modelo superficie de respuesta degradación fotocatalítica de Orange II. Efecto del pH y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a valor constante de concentración inicial de Orange II en 25 ppm.

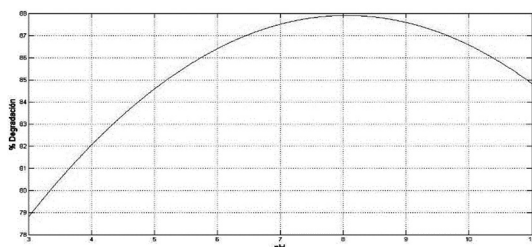
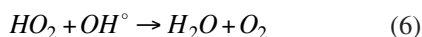
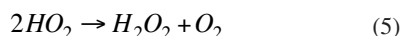
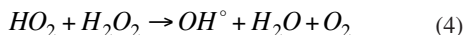
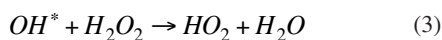
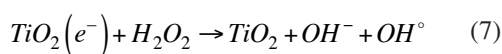


Figura 14. Efecto del pH en la degradación del colorante Orange II.

#### Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

En la Figura 15, se observa que a pH 7 y concentración inicial de Orange II de 25 ppm y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> variable, hay un comportamiento parabólico donde el punto óptimo es 1,5 g/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lo anterior se debe a que el TiO<sub>2</sub> se ve favorecido ampliamente por la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dado a que este último puede oxidar directamente generando radicales ·OH, mejorando la degradación como se establece en la ecuación (7) [28].



Además, esto se debe a que en la fotodegradación se generan mayor número de ·OH por la presencia de peróxido; no obstante, después del punto óptimo (1,5 g/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) de peróxido, se observa un descenso del 10% en la fotocatalisis pues cuando hay exceso de reactivo, se lleva a cabo de nuevo la

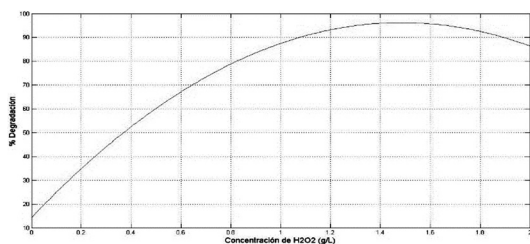
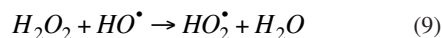
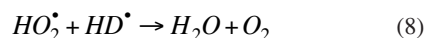


Figura 15. Efecto de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la degradación del colorante Orange II.

completa descomposición en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O perdiendo su poder fotocatalítico [29].



#### Efecto de la concentración inicial de Orange II

Se reporta que la degradación de este colorante tipo azo, se lleva a cabo de mejor manera a bajas concentraciones. En la Figura 16 a pH constante de 7 y concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 g/L, se evidencia una disminución de la degradación del colorante en un 20% entre la concentración de 10 ppm y 40 ppm esta diferencia se debe a que una solución con mayor concentración de colorante, absorbe mayor cantidad de luz ultravioleta en comparación a aquellas con una concentración baja, induciendo así que los fotones se den en menor cantidad y se impida la formación de radicales ·OH, lo cual impide un alto rendimiento de fotodegradación [30].

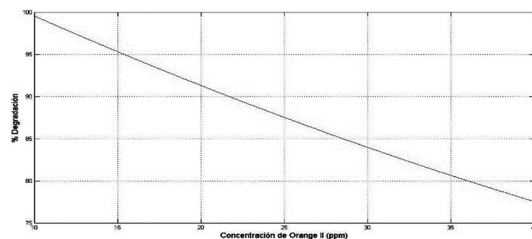


Figura 16. Efecto de la concentración inicial de colorante en la degradación fotocatalítica del mismo.

## CONCLUSIONES

Se concluyó que (i) con un 95% de confianza las variables influyentes en la síntesis por vía hidrotérmica son la concentración de NaOH y tiempo de reacción, donde a concentraciones mayores a 5 M y tiempos de reacción superiores a 5 h se pueden tener estructuras tubulares con diámetro entre 65-100 nm, además que la sonicación como pre tratamiento no ofreció una buena conversión a morfologías de nanotubos deseadas. (ii) La caracterización realizada vía XRD, FT-IR y SEM evidenció la presencia de estructuras nanotubulares y estructuras intermedias como nanohojas y sales de titanio. Por medio de la caracterización biológica

con las líneas celulares CHO y HeLa se establece que el material es citotóxico por la presencia de remanente de NaOH lo cual llevó a una mejora del material al agregar un abundante lavado con agua destilada y HCl 0,1 M. (iii) En cuanto a la degradación fotocatalítica de Orange II el efecto más significativo fue la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como coadyuvante de la reacción, mejorando el rendimiento del material al generar radicales OH necesarios para la ruptura de los enlaces azo. El material sintetizado por vía hidrotérmica, lavado hasta pH 7, funcionó como catalizador para la foto degradación de Orange II, donde a partir de una superficie de respuesta se predice una degradación del 97% con condiciones óptimas de pH 8, 1,5 g/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 25 ppm inicial de colorante.

### REFERENCIAS

- [1] P. Roy, S. Berger and P. Schmuki. "TiO<sub>2</sub> nanotubes: synthesis and applications". *Angew. Chemie*. Vol. 50 N° 13, pp. 2904-2939. 2011.
- [2] T. Kasuga, M. Hiramatsu, A. Hoson, T. Sekino and K. Niihara. "Formation of Titanium Oxide Nanotube". Vol. 14 N° 12, pp. 3160-3163. 1998.
- [3] J.M. Macák, H. Tsuchiya and P. Schmuki. "High-Aspect-Ratio TiO<sub>2</sub> Nanotubes by Anodization of Titanium". *Angew. Chemie Int. Ed.* Vol. 44 N° 14, pp. 2100-2102. Mar. 2005.
- [4] M. Zhang, Y. Bando and K. Wada. "Sol-gel template preparation of TiO<sub>2</sub> nanotubes and nanorods". *J. Mater. Sci. Lett.* Vol. 20 N° 2, pp. 167-170. 2001.
- [5] N. Liu, X. Chen, J. Zhang and J.W. Schwank. "A review on TiO<sub>2</sub>-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications". *Catal. Today*. Vol. 225, pp. 34-51. 2014.
- [6] M.A. Safaei, R. Sarraf-Mamoory, M.B. Rashidzadeh and M.C. Manteghian. "Experimental design for determination of effective parameters in hydrothermal synthesis of TiO<sub>2</sub>-derived nanotubes". Vol. 7 N° 11-12, pp. 2727-2730. 2010.
- [7] Q. Wang, *et al.* "TiO<sub>2</sub> nanotube platforms for smart drug delivery: a review". *Int. J. Nanomedicine*. Vol. 11, p. 4819. 2016.
- [8] P. Roy, D. Kim, K. Lee, E. Spiecker and P. Schmuki. "TiO<sub>2</sub> nanotubes and their application in dye-sensitized solar cells". *Nanoscale*. Vol. 2 N° 1, pp. 45-59. 2010.
- [9] C. von Wilmowsky, S. Bauer, S. Roedl, F. W. Neukam, P. Schmuki and K.A. Schlegel. "The diameter of anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes affects bone formation and correlates with the bone morphogenetic protein-2 expression in vivo". *Clin. Oral Implants Res.* Vol. 23 N° 3, pp. 359-366. 2012.
- [10] C. von Wilmowsky *et al.* "In vivo evaluation of anodic TiO<sub>2</sub> nanotubes: an experimental study in the pig". *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* Vol. 89 N° 1, pp. 165-171. 2009.
- [11] M. Pelaez, *et al.* "A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications". *Appl. Catal. B Environ.* et al. 125, pp. 331-349. Aug. 2012.
- [12] M.M. Khan, S.F. Adil and A. Al-Mayouf. "Metal oxides as photocatalysts". *J. Saudi Chem. Soc.* Vol. 19 N° 5, pp. 462-464. Sep. 2015.
- [13] H.-C. Liang, X.-Z. Li and J. Nowotny. "Photocatalytical Properties of TiO<sub>2</sub> Nanotubes". 2010.
- [14] R. Camposeco, S. Castillo, I. Mejia-Centeno, J. Navarrete and R. Gómez. "Effect of the Ti/Na molar ratio on the acidity and the structure of TiO<sub>2</sub> nanostructures: Nanotubes, nanofibers and nanowires". *Mater. Charact.* Vol. 90, pp. 113-120. Apr. 2014.
- [15] I. Kustiningsih, Slamet and W.W. Purwanto. "Synthesis of Titania Nanotubes and Titania Nanowires by Combination Sonication-hydrothermal Treatment and their Photocatalytic Activity for Hydrogen Production". *Int. J. Technol.* Vol. 5 N° 2, p. 133, Jan. 2014.
- [16] C.A. Schneider, W.S. Rasband and K.W. Eliceiri. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nat. Methods*. Vol. 9 N° 7, pp. 671-5. Jul. 2012.
- [17] C. Betianu, F.A. Caliman, M. Gavrilescu, I. Cretescu, C. Cojocar and I. Poulis. "Response surface methodology applied for Orange II photocatalytic degradation in TiO<sub>2</sub> aqueous suspensions". *J. Chem. Technol. Biotechnol.* Vol. 83 N° 11, pp. 1454-1465. Oct. 2008.

- [18] J. Fernández, J. Kiwi, C. Lizama, J. Freer, J. Baeza and H.D. Mansilla. "Factorial experimental design of Orange II photocatalytic discoloration". *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* Vol. 151 N° 1-3, pp. 213-219. Aug. 2002.
- [19] T.H.T. Vu *et al.* "Synthesis of titanium dioxide nanotubes via one-step dynamic hydrothermal process". *J. Mater. Sci.* Vol. 49 N° 16, pp. 5617-5625. Aug. 2014.
- [20] M. Yutao, L. Yuan, X. Xurui, Z. Xiaowen and L. Xueping. "Sonication-hydrothermal combination technique for the synthesis of titanate nanotubes from commercially available precursors". *Mater. Res. Bull.* Vol. 41 N° 2, pp. 237-243. 2006.
- [21] G. Busca, H. Saussey, O. Saur, J.C. Lavalley and V. Lorenzelli. "FT-IR characterization of the surface acidity of different titanium dioxide anatase preparations". *Appl. Catal.* Vol. 14, pp. 245-260. Jan. 1985.
- [22] B.D. Cullity and S.R. Stock. "*Elements of x-ray diffraction*". Third edition. 2013.
- [23] F. Meng, Y. Liu, J. Chu, W. Wang and T. Qi. "Structural control of Na<sub>2</sub>TiO<sub>3</sub> in pre-treating natural rutile ore by alkali roasting for TiO<sub>2</sub> production". *Can. J. Chem. Eng.* Vol. 92 N° 8, pp. 1346-1352. Aug. 2014.
- [24] "Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Sigma-Aldrich". [Online]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11644793001?lang=en&region=CO>. [Accessed: 16-Nov-2017].
- [25] N. Kakko, N. Ivanona and A. Rantasalo. "Cell disruption methods". 2016.
- [26] N. Jallouli, K. Elghniji, H. Trabelsi and M. Ksibi. "Photocatalytic degradation of paracetamol on TiO<sub>2</sub> nanoparticles and TiO<sub>2</sub>/cellulosic fiber under UV and sunlight irradiation". *Arab. J. Chem.* Vol. 10, pp. S3640-S3645. May 2017.
- [27] J.G. Crisancho Segura and J.H. Ramírez Franco. "Decoloración fotocatalítica del colorante Orange II mediante el uso de ceniza volante". 2016.
- [28] E. Gil Pavas, L. Quintero Olaya, M. Rincon Uribe and D. Rivera Agudelo. "Degradación de colorantes de aguas residuales empleando UV/TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Fe<sup>2+</sup>". *Univ. eafit.* Vol. 42 N° 146, pp. 80-101. 2007.
- [29] J. Herney-Ramírez and L. M. Madeira. "Use of Pillared Clay-Based Catalysts for Wastewater Treatment Through Fenton-Like Processes". In *Pillared Clays and Related Catalysts*, New York, NY: Springer New York, pp. 129-165. 2010.
- [30] J. Feng, X. Hu, P. L. Yue, H. Y. Zhu and G. Q. Lu. "Discoloration and mineralization of Reactive Red HE-3B by heterogeneous photo-Fenton reaction". *Water Res.* Vol. 37 N° 15, pp. 3776-3784. Sep. 2003.