

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOTUBOS DE TIO₂ SINTETIZADOS POR
VÍA HIDROTÉRMICA CON APLICACIÓN EN INGENIERÍA DE MATERIALES**

**NICOLÁS ESTEBAN OBANDO SALGADO
DAVID ALBERTO PINILLA MORALES**

**PROYECTO DE GRADO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO**

**MODALIDAD
TRABAJO DE FORMACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN**

**DIRECTORA
ALIS YOVANA PATAQUIVA MATEUS, IQ., MSc., Ph.D.**

**CO-DIRECTOR
HUGO RICARDO ZEA, IQ., MSc., Ph.D.
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA**

**UNIVERSIDAD DE BOGOTÁ JORGE TADEO LOZANO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA
PROGRAMA INGENIERÍA DE QUÍMICA
BOGOTÁ D.C.
2017**

Contenido

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Metodología	5
3.1 Fabricación de TiO₂-NTs	5
a. Síntesis hidrotérmica de TiO ₂ -NTs.....	5
b. Síntesis de TiO ₂ -NTs con pretratamiento de precursores.....	6
c. Síntesis de TiO ₂ -NTs sin pretratamiento de precursores	7
3.2 Caracterización química, física y biológica de TiO₂-NTs.	7
a. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	7
b. Difracción de rayos X (XRD)	8
c. Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)	8
d. Cultivo celular <i>in vitro</i>	8
3.3 Degradación de Orange II empleando H₂O₂/TiO₂-NTs/UV	8
a. Diseño de experimentos.....	8
b. Montaje	9
4. Resultados y discusión	10
4.1 Evaluación de los TiO₂-NTs obtenidos por vía hidrotérmica	10
a. Diseños experimentales con y sin pretratamiento de precursores.....	10
b. Análisis FT-IR	13
c. Análisis XRD	15
d. Cultivo celular <i>in vitro</i>	17
4.2 Mecanismo de crecimiento propuesto	18
4.3 Desempeño de TiO₂-NTs en la degradación de Orange II	19
5. Conclusiones	24
6. Recomendaciones	24
7. Agradecimientos	24
8. Referencias bibliográficas	25

1. Resumen

Los nanotubos de dióxido de titanio (TiO₂-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 TiO₂-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 las mejores morfologías y tamaños. 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 que predice una degradación del 97% a un valor de pH de 8, con una concentración de H₂O₂ de 1.5 g/L y una concentración de colorante inicial de 25 ppm.

Palabras clave: Síntesis, nanotubos de dióxido de titanio, vía hidrotérmica, fotocatalisis, Orange II, CHO, HeLA, colorante azo.

Abstract

Titanium dioxide nanotubes (TiO₂-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, TiO₂ nanotubes with 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 structures like nanosheets and microtubes can be found too employing this processing route. Synthesis conditions such as pretreatment of precursors, NaOH concentration and reaction time were studied through two experimental designs in order 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 a H₂O₂ 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

2. 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 (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 (Roy, Berger, & Schmuki, 2011), entre otras.

Para sintetizar TiO_2 -NTs hay tres vías: la hidrotérmica (Kasuga, Hiramatsu, Hoson, Sekino, & Niihara, 1998), anodización (Macák, Tsuchiya, & Schmuki, 2005) y por membranas (Zhang, Bando, & Wada, 2001). 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 (Liu, Chen, Zhang, & Schwank, 2014). 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 TiO_2 y luego se lleva a un autoclave por varias horas a presión y temperaturas por encima de 100°C (Safaei, Sarraf-Mamoory, b. Rashidzadeh, & c. Manteghian, 2010; Zhang et al., 2001) obteniendo estructuras nanotubulares.

Entre las aplicaciones de los TiO_2 -NTs se han reportado estudios relacionados con: liberación de fármacos (Wang et al., 2016), como catalizador en celdas solares (*dye sensitized solar cell*) (Roy, Kim, Lee, Spiecker, & Schmuki, 2010) y recubrimiento de implantes óseos, logrando buenos resultados en cuanto actividad celular y recuperación ósea tanto *in vitro* como *in vivo* (von Wilmowsky et al., 2009).

En cuanto a las propiedades fotocatalíticas de 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 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 OH^- , (ii) generación de O_2^- por la reducción de O_2 ; los dos pueden reaccionar con contaminantes para degradarlos o transformarlos en compuestos menos perjudiciales (Pelaez et al., 2012). Dentro de las reacciones de óxido-reducción, se busca la transformación de compuestos altamente tóxicos a compuesto menos tóxicos o CO_2 y H_2O . Las propiedades fisicoquímicas de los fotocatalizadores se distribuyen en su rendimiento, tamaño, forma, morfología y composición (Khan, Adil, & Al-Mayouf, 2015).

Los radicales $\cdot\text{OH}$ producidos por el TiO_2 es de las especie oxidante más fuerte con un potencial de 2.8 V (Liang, Li, & Nowotny, 2010). 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 CO_2 . En el caso del

TiO₂ 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 TiO₂-NTs como lo son tiempo de reacción, concentración de NaOH y efecto del ultrasonido como pretratamiento de los precursores, (ii) caracterizaron física, química y biológica de los TiO₂-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 TiO₂-NTs como catalizador.

3. Metodología

3.1 Fabricación de TiO₂-NTs

a. Síntesis hidrotérmica de TiO₂-NTs

La vía hidrotérmica empleada en este proyecto fue basada en el trabajo realizado por el grupo de Liu y colaboradores (Liu et al., 2014) y modificado a partir de los resultados obtenidos de los diseños experimentales reportados en la literatura (Camposeco, Castillo, Mejia-Centeno, Navarrete, & Gómez, 2014; Safaei et al., 2010). Esto último en base a tomar las variables más relevantes para la preparación de nanotubos de TiO₂ por vía hidrotérmica.

El procedimiento realizado consistió en tomar 2.5 g del precursor de TiO₂ comercial Degussa P-25 y 25 mL de solución de hidróxido de sodio (NaOH) concentrada. Esta mezcla se llevó al reactor tipo *teflon-lined* Hydrion scientific, HTR-100 (Fig. 1). Inicialmente, la muestra fue introducida en el tubo interno de teflón (Fig. 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 (Fig. 1b) asegurando un buen sello de tal manera que el reactor quede como se muestra en la Fig. 1c.

El reactor debidamente cerrado se llevó a la autoclave (All American, No.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.



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

b. Síntesis de TiO_2 -NTs con pretratamiento de precursores

Según estudios reportados en los trabajos de Kustiningsih (Kustiningsih, ., & Purwanto, 2014) 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_2 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 (Branson, M3800H) a una potencia de 110 W, a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se continuó el tratamiento hidrotérmico mencionado en el numeral 3.1 (a).

Los valores empleados para el diseño experimental seleccionado (central compuesto) están plasmados en la Tabla 1, para lo cual se tomó un valor α de 1.75, con el objetivo de asegurar ortogonalidad y rotabilidad.

Tabla 1. Diseño experimental central compuesto con pretratamiento de ultrasonido

Nombre	Unidades	Factor (- α)	Factor (-1)	Factor (0)	Factor (+1)	Factor (+ α)
Concentración hidróxido de sodio NaOH	M	3.12	5	7.5	10	11.88
Tiempo tratamiento hidrotérmico	h	1.25	2	3	4	4.75

c. Síntesis de TiO₂-NTs sin pretratamiento de precursores

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 (Safaei, Sarraf-Mamoory, b. Rashidzadeh, & c. Manteghian, 2010).

Tabla 2. Diseño experimental central compuesto sin pretratamiento

Nombre	Unidades	Factor (- α)	Factor (-1)	Factor (0)	Factor (+1)	Factor (+ α)
Concentración Hidróxido de sodio NaOH	M	3.12	5	7.5	10	11.88
Tiempo tratamiento hidrotérmico	h	2.5	4	6	8	9.5

3.2 Caracterización química, física y biológica de TiO₂-NTs.

a. 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 TiO₂-NTs se empleó el software Image J (Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012).

b. 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 2 θ), 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.

c. 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.

d. 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 TiO₂-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 (Bransonic, 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 TiO₂ 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 TiO₂-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 TiO₂-NTs. Se realizaron pruebas por triplicado de acuerdo al manual "Cytotoxicity Detection kit (LDH)" de Roche.

3.3 Degradación de Orange II empleando H₂O₂/TiO₂-NTs/UV

a. Diseño de experimentos

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 TiO₂-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 (Betianu et al., 2008; Fernández et al., 2002) se seleccionaron los valores que se encuentran en la Tabla 3.

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

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

b. Montaje

En un beaker de vidrio se introdujeron 200 mL de solución de colorante Orange II (C₁₆H₁₁N₂NaO₄S, Sigma -Aldrich®) junto a 100 mg del catalizador TiO₂-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 (H₂O₂ 30% v/v) y luego la solución se llevó a exposición de luz ultravioleta (UV-C 280nm-200nm) con una intensidad de luz de 388 lumen, a temperatura ambiente bajo agitación magnética a 300 rpm, en el equipo (Fig. 2) que se encuentran ubicados 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.

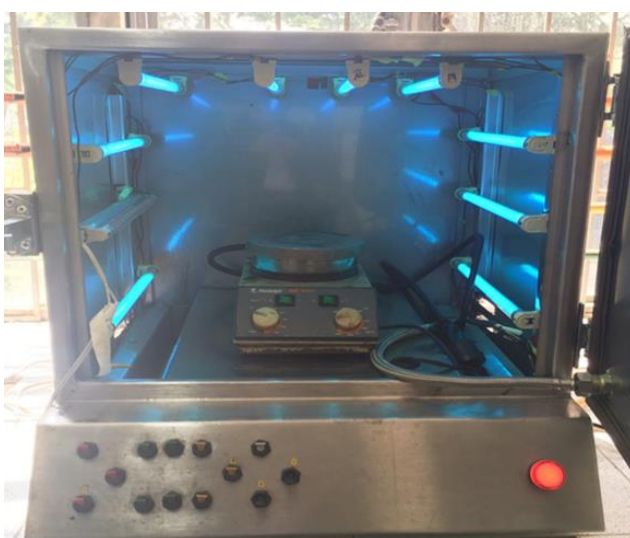


Fig. 2 Equipo experimental para la exposición de luz UV-C

4. Resultados y discusión

4.1 Evaluación de los TiO₂-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 (Vu et al., 2014) 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. (Schneider et al., 2012).

a. Diseños experimentales con y sin pretratamiento de precursores

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

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

Muestra	[NaOH] M	Tiempo tratamiento hidrotérmico (Horas)	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)

Según el trabajo de Liu y colaboradores (Liu et al., 2014) la sonicación puede generar nanohojas incluso antes del tratamiento hidrotérmico lo cual facilitaría la conversión hacia nanotubos. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación muestran la obtención de microtubos (Fig. 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 84-100nm (Fig. 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 (Yutao, Yuan, Xurui, Xiaowen, & Xueping, 2006).

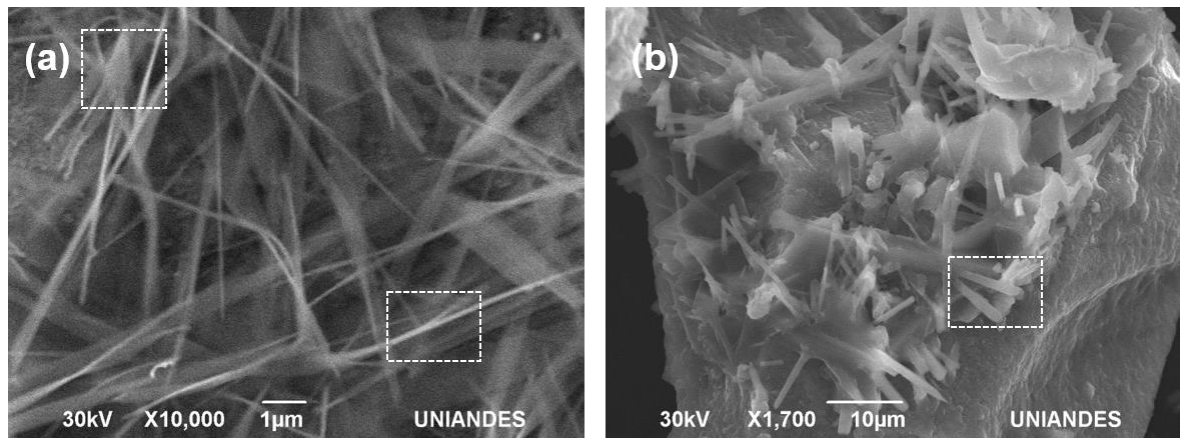


Fig. 3 Micrografías SEM de las estructuras obtenidas del diseño experimental con pretratamiento ultrasonido a) Nanotubos y nanohojas presentes en la muestra 10 y b) Microtubos presentes en la muestra 9

Con base en los resultados arrojados por el primer diseño experimental con pretratamiento de precursores, se decidió realizar la síntesis hidrotérmica sin pretratamiento, pero a su vez incrementando los tiempos de reacción para conseguir un rendimiento más alto hacia nanotubos (Liu et al., 2014).

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

Muestra	[NaOH] M	Tiempo tratamiento hidrotérmico (Horas)	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: Nanohojas MTs: Microtubos (diámetro > 100 nm)

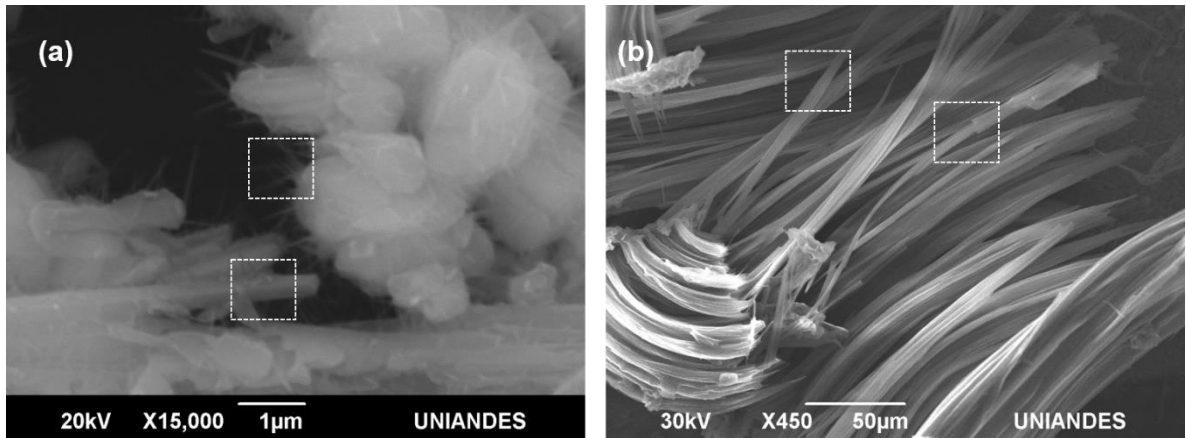


Fig. 4 Micrografías SEM diseño experimental sin pretratamiento. a) Nanotubos presentes en la muestra 1 y b) Microtubos y nanohojas presentes en la muestra 10.

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 (Fig. 4a), así como microtubos con diámetros entre 1 y 4.4 µm (Fig. 4b) y nanohojas (Fig. 4b). Se establece que tiempos de reacción más largos, brindan mejores resultados en cuanto a morfologías de TiO₂-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, ente otras.

A continuación, se muestra un análisis de las variables más significativas del diseño experimental, donde se correlacionaron con el resultado en la morfología y tamaño de los analitos mostrados en las Fig. 5 y Fig. 6.

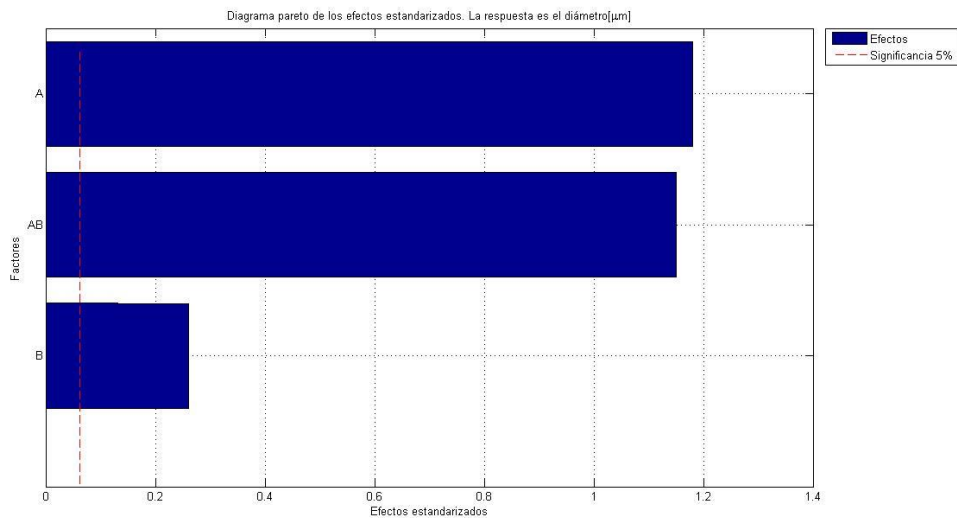


Fig. 5 Diagrama de Pareto para el diseño experimental con pretratamiento. Efectos: A) concentración NaOH [M]. B) Tiempo [h]. AB) Combinación efectos AB

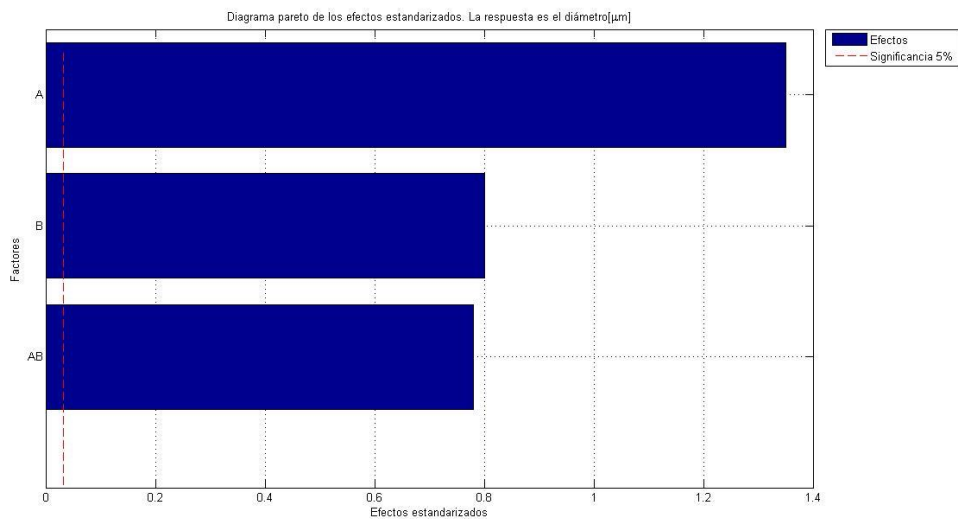


Fig. 6 Diagrama de Pareto para el diseño experimental sin pretratamiento. Efectos: A) concentración NaOH [M] B) Tiempo[h] AB) Combinación efectos AB

El análisis de Pareto del diseño experimental con pretratamiento (Fig. 5) muestra que los efectos A (NaOH), B (Tiempo) y la combinación de ellos contribuyen a la respuesta del diámetro de los micro y nanotubos en un 59.25, 20.89 y 19.86%, respectivamente. El análisis de Pareto del diseño experimental sin pretratamiento (Fig. 6) estudia los efectos A (NaOH), B (Tiempo) y la combinación de ellos contribuyen en un 50, 47.65 y 2.35%, respectivamente. Con un 95% de confianza se encuentra que el efecto NaOH es el mayor contribuidor debido lo mencionado anteriormente sobre la relación Ti/Na. Finalmente, el tiempo y la combinación NaOH-Tiempo sugieren efectos similares en contribución debido a que el tiempo mejora la interfaz Ti/Na para el diseño con pretratamiento, sin embargo, para el diseño sin pretratamiento se evidencia que el tiempo de reacción no podría ser significativo sin el acompañamiento del tratamiento alcalino.

b. 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^-) con un ancho de banda agudo entre 3742 y 3675 cm^{-1} o 3720 y 3640 cm^{-1} (Busca, Saussey, Saur, Lavalley, & Lorenzelli, 1985; Camposeco et al., 2014) lo que se evidencia en las Fig. 7 y 8. 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^{-1} que se evidencia en las Fig. 8 y 9 en las muestras b, c, d y e, por la capacidad que tiene la anatasa de generar ácidos tipo Brönsted 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 incrementar la relación Ti/Na lo que resulta en la exfoliación de los planos Ti-O (Camposeco et al., 2014).

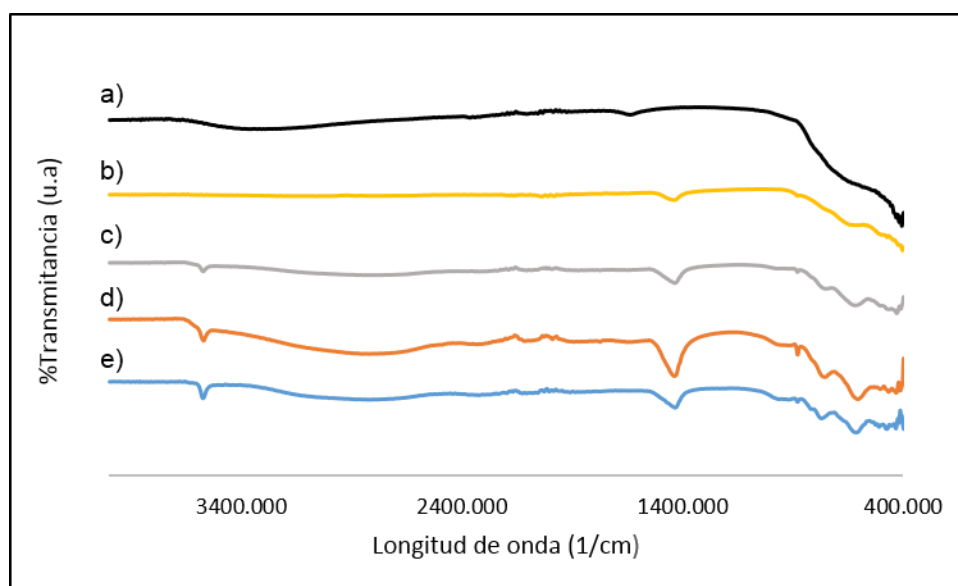


Fig. 7 FT IR Muestras obtenidas del diseño experimental con pretratamiento de ultrasonido a) TiO_2 Degussa P-25 b) Muestra 10. c) Muestra 8. d) Muestra 5. e) Muestra 1.

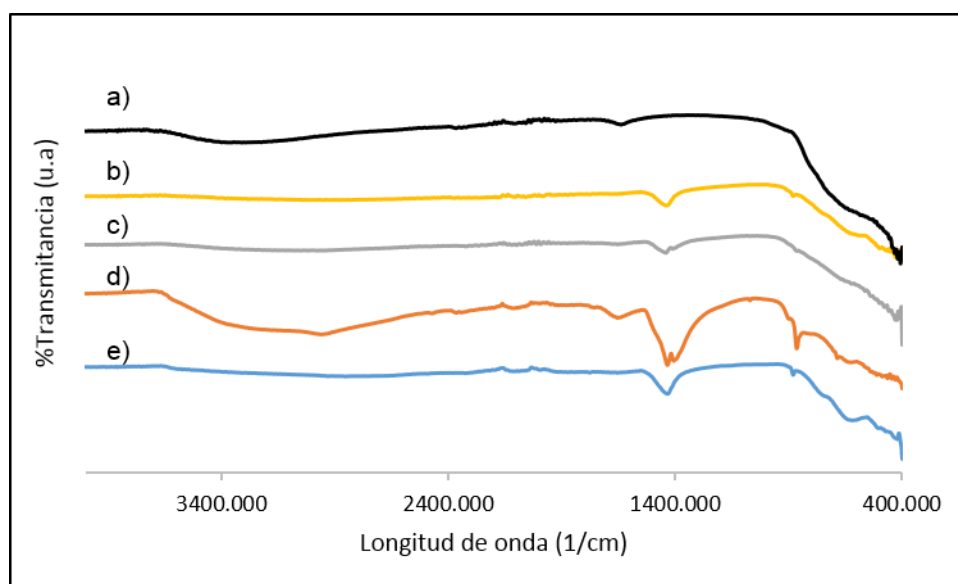


Fig. 8 FT IR Diseño experimental sin pretratamiento a) TiO_2 Degussa P-25 b) Muestra 7. c) Muestra 5. d) Muestra 3. e) Muestra 1

c. Análisis XRD

Dentro de los resultados a partir del XRD del diseño experimental sin pretratamiento (Fig.10) solo se tuvieron en cuenta las muestras en las que se obtuvo TiO_2 -NTs. Los análisis a partir de XRD muestran que luego de calcinar 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_2 Degussa P-25 (Fig. 9). 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 (Cullity & Stock, 2013).

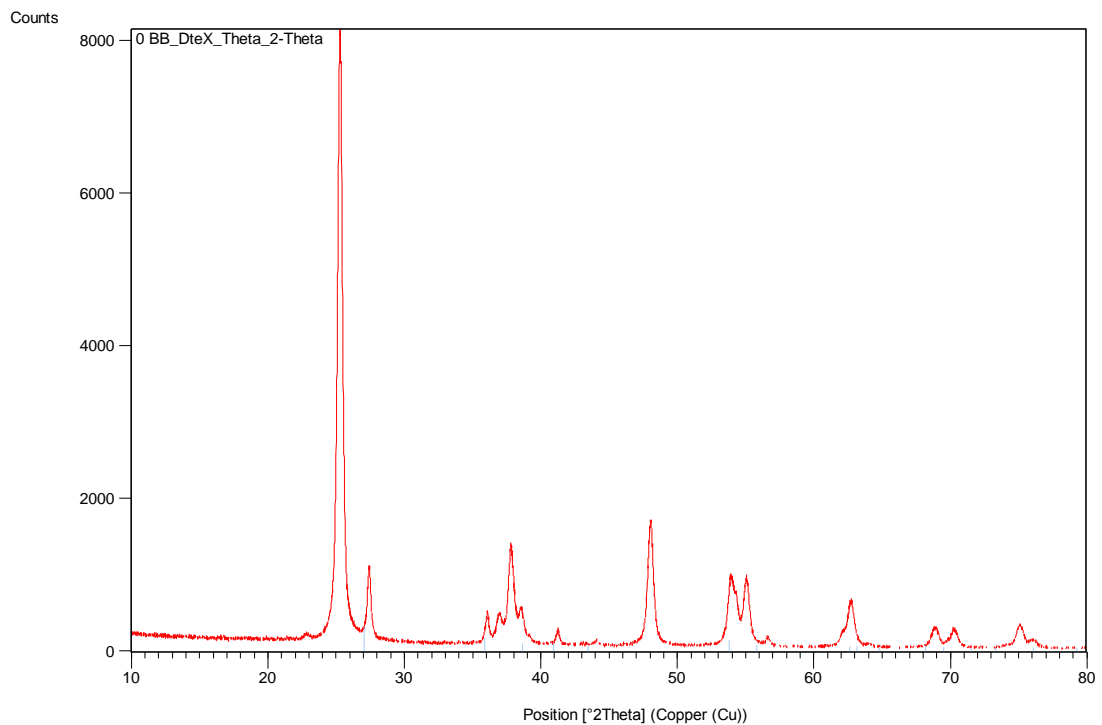


Fig. 9 Patrón de difracción de rayos X de TiO_2 Degussa-p25

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 (Meng, Liu, Chu, Wang, & Qi, 2014), al tratar muestras de TiO_2 que presentan rutilo con bases fuertes como el NaOH se presenta la conversión hacia productos intermedios como el $\alpha\text{-Na}_2\text{TiO}_2$ o el $\gamma\text{-Na}_2\text{TiO}_3$ 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^+ , generando trazas de NaOH que al momento de calcinar 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 Fig. 4b.

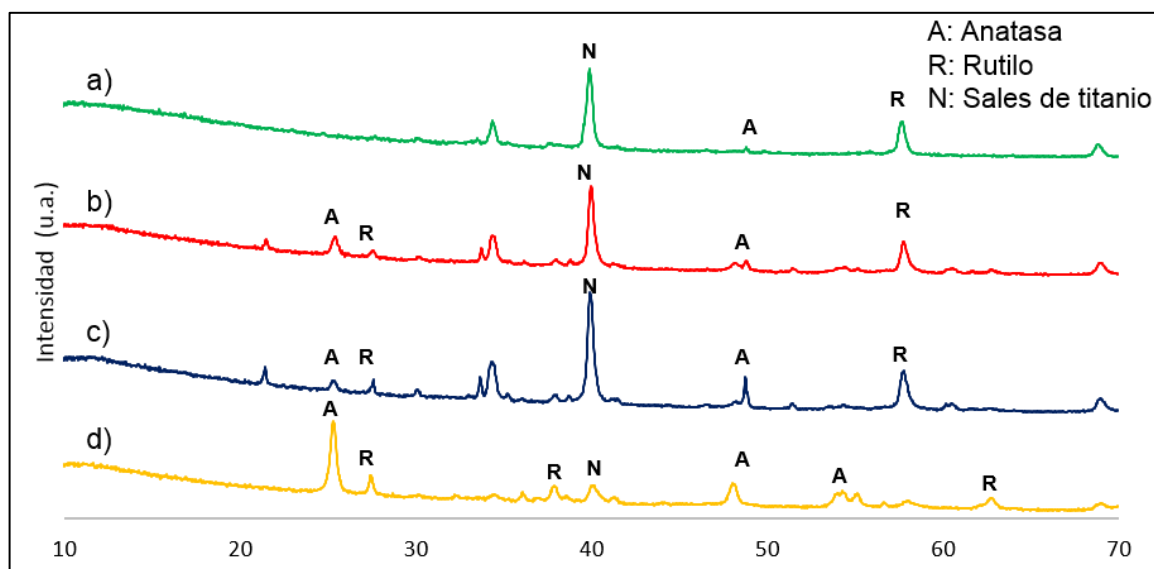


Fig. 10 Análisis XRD del diseño experimental central compuesto sin pretratamiento calcinado a 500°C por 30 minutos a) Muestra 7. b) Muestra 3. c) Muestra 1. d) Muestra 5.

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 Fig. 11, 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 ($\text{Na}_4\text{Ti}_5\text{O}_{12}$).

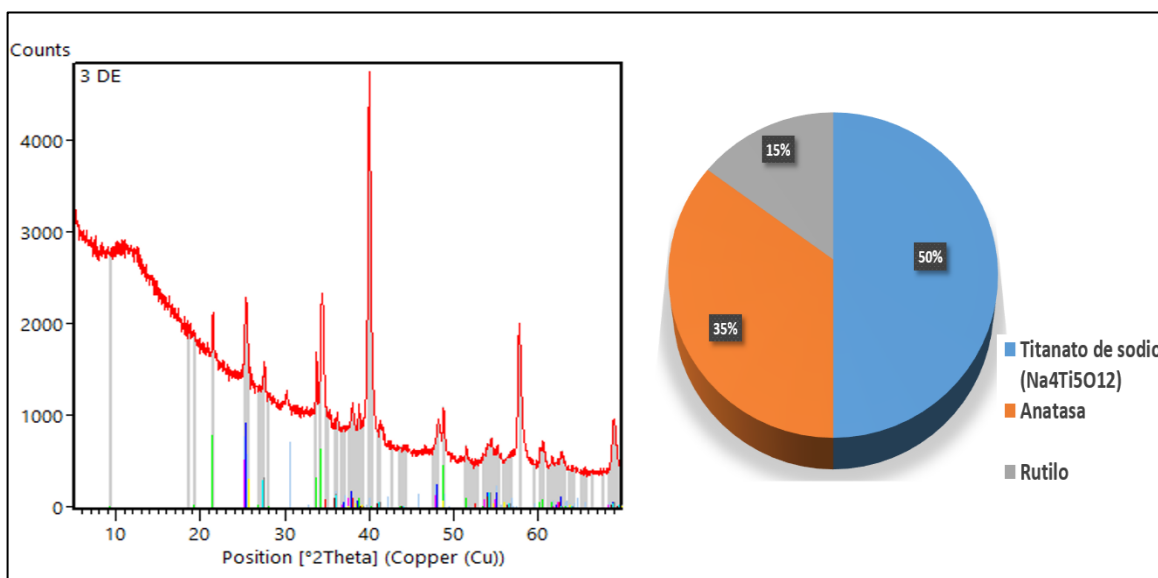


Fig. 11 Cuantificación fases presentes por medio del patrón de difracción muestra 3

d. Cultivo celular *in vitro*

La prueba de citotoxicidad realizada se basa en el método de coloración enzimática. El mecanismo se lleva a cabo cuando el NAD⁺ se reduce a NADH/H⁺ por la conversión de lactato a piruvato en presencia de la lactato deshidrogenada (LDH), luego, los H⁺ transferidos permiten un cambio de color rojo fuerte (490-500nm) del catalizador evidenciando muerte celular (“Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Sigma-Aldrich,” n.d.). 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 (Fig.12a), luego de 48 h se presentó 10% aproximadamente para los dos tipos de células. Para los implantes de titanio-platino recubiertos con TiO₂-NTs, se presentó citotoxicidad a las 24 h para HeLa y CHO de 65%, mostrando un color rojo fuerte (Fig.12b) 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 (Kakko, Ivanona, & Rantasalo, 2016).

Para una revisión más completa de los resultados obtenidos del cultivo celular revisar ANEXO 1.

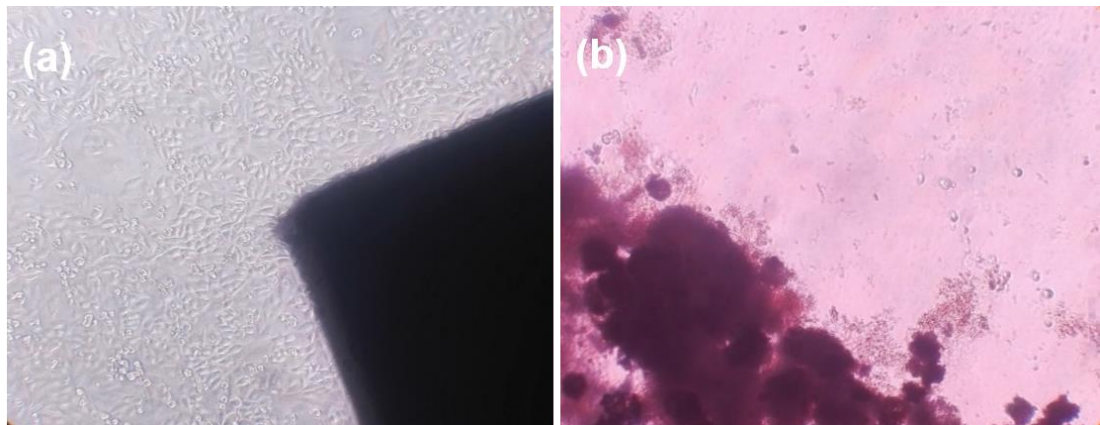


Fig. 12 Células HeLa 10 X, 24 h. a) Pieza de implante sin recubrimiento. b) Pieza de implante con recubrimiento.

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 (TiO₂-NTs), se requirió abundante lavado con agua destilada y HCl 0.1M para lograr un pH neutro antes de la calcinación. La Fig. 13a muestra el material lavado final con una menor presencia de sodio verificado por EDS en la Fig. 13b.

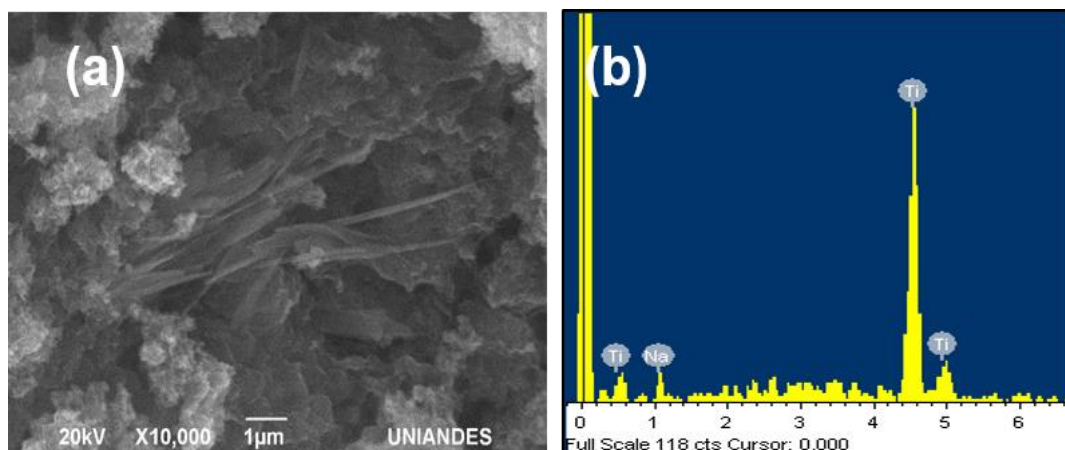


Fig. 13 Material lavado obtenido por vía hidrotérmica. a) Micrografía SEM. b) Análisis EDS

4.2 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 (Kasuga et al., 1998) establecen que en primera instancia las partículas de TiO_2 se encuentran dispersas (Fig. 14a), al agregar la solución concentrada de NaOH , que actúa como agente reductor, las partículas se aglomeran y los enlaces O-Ti-O que pasan a ser enlaces Ti-O-Na formando estructuras en forma de nanohojas (Fig. 14b). Luego del proceso hidrotérmico, el producto es lavado con ácido provocando una carga superficial por los iones H^+ , que son capaces de retirar iones Na^+ provocando la conversión en nanohojas con enlaces Ti-OH , que a temperaturas superiores a 100°C , logran separarse entre sí (Fig. 14c). Posteriormente, en el proceso de deshidratación (secado y calcinado) se consiguen cerrar las nanohojas formando nanotubos por la presencia de enlaces Ti-O (Fig 14d).

Finalmente, Vu y colaboradores (Vu et al., 2014) estudiaron la morfología de 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; encontrándose similitud con el presente trabajo desde dos análisis diferentes de morfología (SEM y TEM).

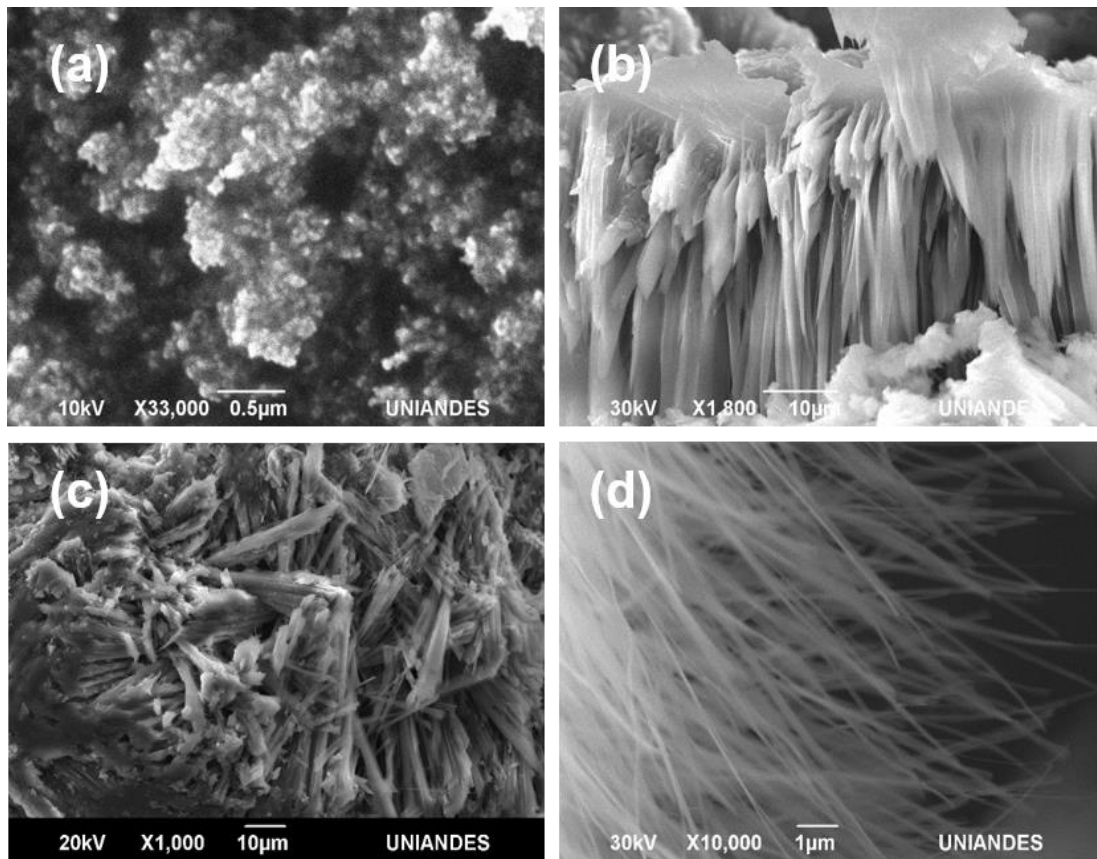


Fig. 14 Mecanismo de crecimiento de estructuras tubulares por vía hidrotérmica (a) Micrografía SEM TiO_2 Degussa- p25. (b) Aglomeración y crecimiento de nano hojas. (c) Evidencia de nano hojas y microtubos. (d) Nanotubos de TiO_2

4.3 Desempeño de TiO_2 -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.

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

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

Muestra	pH	Concentración H_2O_2 (g/L)	Concentración Orange 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 R² de 0.98 en términos de las variables actuales, es el siguiente:

$$\hat{Y} = 21.95 + 5.19pH + 97.3[H2O2] - 1.02[Orange] - 0.35pH^2 - 37.16[H2O2]^2 + 4.55^{-3}[Orange]^2 + 1.08 pH[H2O2] - 0.021 pH [Orange] + 0.21 [H2O2][Orange]$$

Ecuación (2)

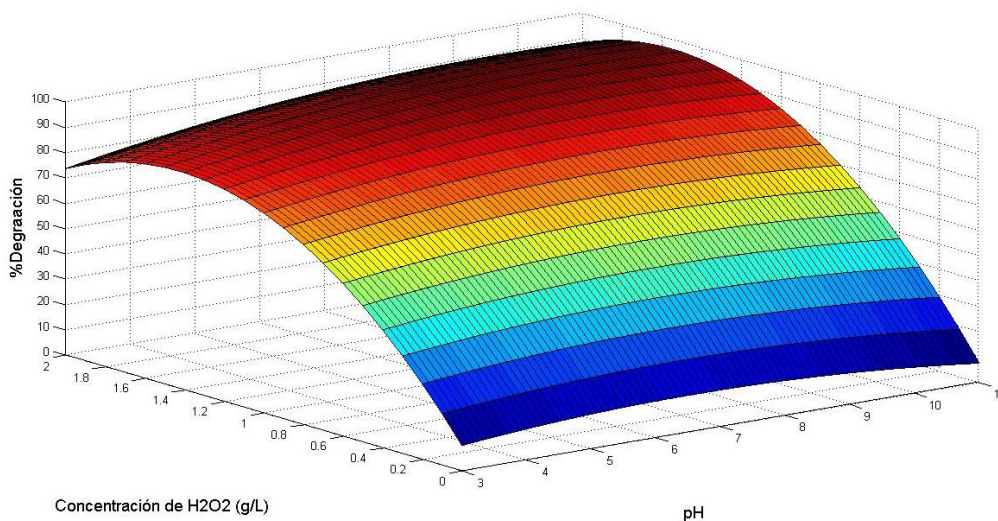


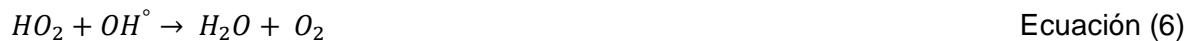
Fig. 15 Modelo superficie de respuesta degradación fotocatalítica de Orange II. Efecto del pH y la concentración de H₂O₂ a valor constante de concentración inicial de Orange II en 25 ppm.

En el modelo graficado en la Fig. 15, se aprecia que en concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno H_2O_2 , 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_2 . En este caso, el efecto del pH en la degradación de Orange II con UV/ TiO_2 NTs/ H_2O_2 se estudió teniendo como referencia una concentración de este colorante de 25 ppm y 1 g/L de concentración de H_2O_2 , debido a que estas condiciones corresponden a los puntos centrales del diseño experimental.

Con el rango de pH entre 3 y 11 (Fig. 16), 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_2 .NTs, resultando en la formación de radicales $\cdot OH$, causando un incremento en la degradación del colorante (Jallouli, Elghniji, Trabelsi, & Ksibi, 2017). 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^\cdot aumenta, induciendo la reducción de la fotoactividad del H_2O_2 por su descomposición en agua y oxígeno molecular, como se presenta a continuación (Cristancho Segura & Ramírez Franco, 2016):



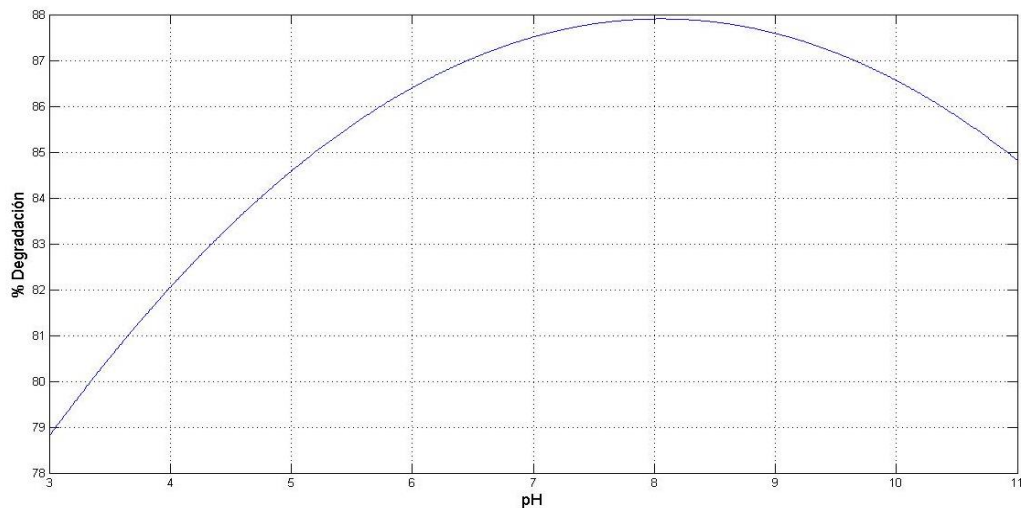


Fig. 16 Efecto del pH en la degradación del colorante Orange II

-Efecto de la concentración de H₂O₂

En la Fig. 17, se observa que a pH 7 y concentración inicial de Orange II de 25 ppm y concentración de H₂O₂ variable, hay un comportamiento parabólico donde el punto óptimo es 1.5 g/L de H₂O₂. Lo anterior se debe a que el TiO₂ se ve favorecido ampliamente por la presencia de H₂O₂, dado a que este último puede oxidar directamente generando radicales ·OH, mejorando la degradación como se establece en la Ecuación (7) (Gil Pavas, Quintero Olaya, Rincon Uribe, & Rivera Agudelo, 2007).



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 H₂O₂) de peróxido, se observa un descenso del 10% en la fotocatalisis pues cuando hay exceso de reactivo, se lleva a cabo de nuevo la completa descomposición en O₂ y H₂O perdiendo su poder fotocatalítico (Herney-Ramírez & Madeira, 2010).



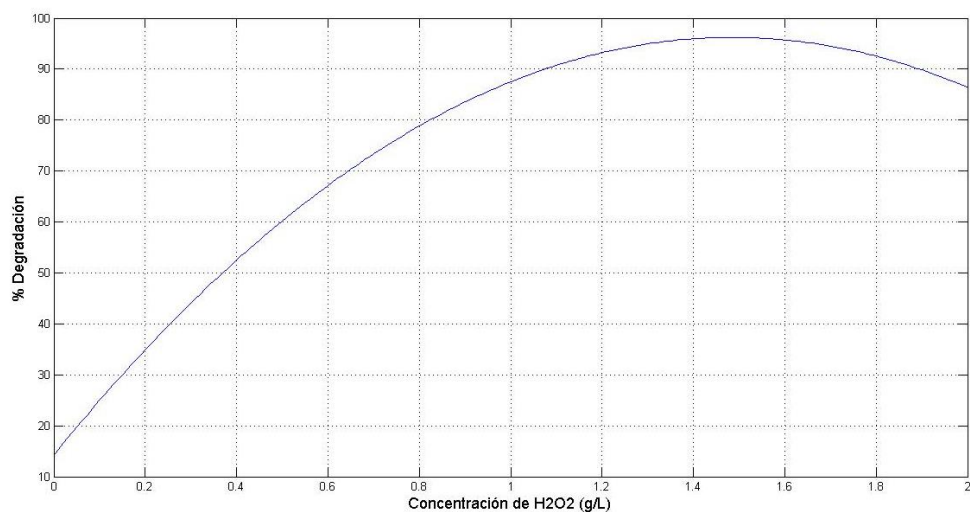


Fig. 17 Efecto de la concentración de H₂O₂ en la degradación del colorante Orange II

-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 Fig. 18 a pH constante de 7 y concentración de H₂O₂ 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 (Feng, Hu, Yue, Zhu, & Lu, 2003).

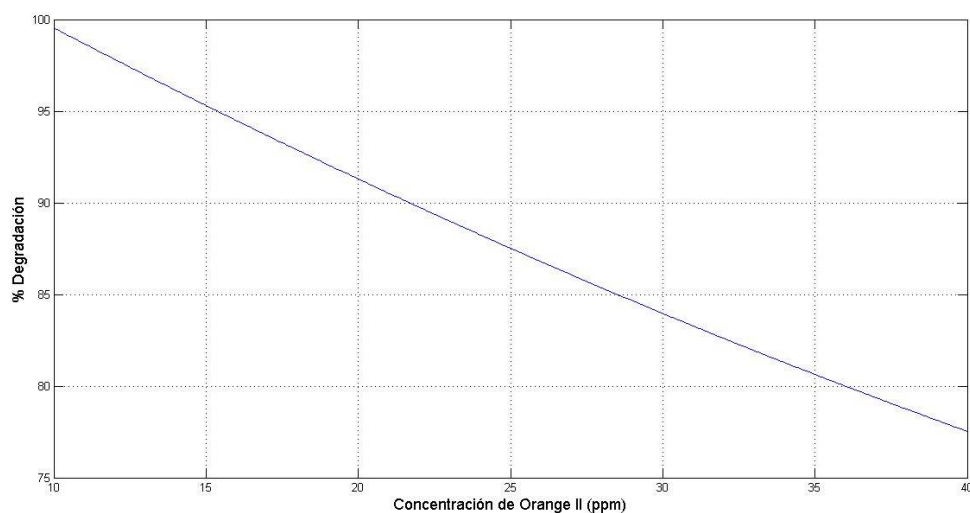


Fig. 18 Efecto de la concentración inicial de colorante en la degradación fotocatalítica del mismo

5. 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 0.1M. (iii) En cuanto a la degradación fotocatalítica de Orange II el efecto más significativo fue la concentración de H₂O₂ 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 H₂O₂ y 25 ppm inicial de colorante.

6. Recomendaciones

- (i) Se recomienda hacer un estudio de las variables de síntesis pH, agitación *in situ*, área superficial, tiempos de reacción prolongados.
- (ii) Se recomienda hacer el lavado de la muestra hasta pH neutro con el fin de asegurar una mejor pureza en miras de otras aplicaciones.
- (iii) Se recomienda realizar caracterización TEM para determinar si los nanotubos obtenidos por vía hidrotérmica son huecos o sólidos debido a que esto puede brindar diferentes propiedades y aplicaciones al material.
- (iv) Se recomienda realizar un análisis BET con el fin de correlacionar el área superficial con propiedades como biocompatibilidad y actividad fotocatalítica.
- (v) En la aplicación de fotodegradación se recomienda realizar un análisis TOC con fin el de verificar la degradación del colorante respecto a la cantidad de carbono y no solo respecto al color de la muestra. Por último, como una futura aplicación se podría incurrir en un proceso de degradación en continuo usando la carga de catalizador inmovilizada.

7. Agradecimientos

Los autores de este trabajo presentan sus agradecimientos a la Universidad Jorge Tadeo Lozano y su planta personal por el apoyo brindado en las actividades experimentales a lo largo de todo el proyecto, como también agradecen a la Universidad Nacional de Colombia

sede Bogotá por brindar su planta física y compartir su conocimiento en el campo de fotocatalisis en especial al profesor Hugo Zea y su equipo de trabajo. Al Dr. Rubén Camargo y Dr. (c) Diego Triviño de la Universidad del Valle por los estudios de cultivo celular.

8. Referencias bibliográficas

- Betianu, C., Caliman, F. A., Gavrilesco, M., Cretescu, I., Cojocar, C., & Poulis, I. (2008). Response surface methodology applied for Orange II photocatalytic degradation in TiO₂ aqueous suspensions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83(11), 1454–1465. <https://doi.org/10.1002/jctb.1973>
- Busca, G., Saussey, H., Saur, O., Lavalley, J. C., & Lorenzelli, V. (1985). FT-IR characterization of the surface acidity of different titanium dioxide anatase preparations. *Applied Catalysis*, 14, 245–260. [https://doi.org/10.1016/S0166-9834\(00\)84358-4](https://doi.org/10.1016/S0166-9834(00)84358-4)
- Camposeco, R., Castillo, S., Mejia-Centeno, I., Navarrete, J., & Gómez, R. (2014). Effect of the Ti/Na molar ratio on the acidity and the structure of TiO₂ nanostructures: Nanotubes, nanofibers and nanowires. *Materials Characterization*, 90, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2014.01.027>
- Cristancho Segura, J. G., & Ramírez Franco, J. H. (2016). Decoloración fotocatalítica del colorante Orange II mediante el uso de ceniza volante. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/55954/7/JavierG.CristanchoSegura.2016.pdf>
- Cullity, B. D., & Stock, S. R. (2013). *Elements of x-ray diffraction*. (Third). Retrieved from <https://books.google.com.co/books?id=F81wngEACAAJ&dq=Elements+of+Xray+diffraction+by+B.+D+Cullity&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjF-rfrt7XWAhVB74MKHf6cDXoQ6AEIJjAA>
- Cytotoxicity Detection Kit (LDH) | Sigma-Aldrich. (n.d.). Retrieved November 16, 2017, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11644793001?lang=en®ion=CO>
- Feng, J., Hu, X., Yue, P. L., Zhu, H. Y., & Lu, G. Q. (2003). Discoloration and mineralization of Reactive Red HE-3B by heterogeneous photo-Fenton reaction. *Water Research*, 37(15), 3776–3784. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00268-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00268-9)
- Fernández, J., Kiwi, J., Lizama, C., Freer, J., Baeza, J., & Mansilla, H. D. (2002). Factorial experimental design of Orange II photocatalytic discoloration. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 151(1–3), 213–219. [https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(02\)00153-3](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(02)00153-3)
- Gil Pavas, E., Quintero Olaya, L., Rincon Uribe, M., & Rivera Agudelo, D. (2007). Degradación de colorantes de aguas residuales empleando UV/TiO₂/H₂O₂/Fe²⁺.

- Universidad Eafit*, 42(146), 80–101.
- Herney-Ramírez, J., & Madeira, L. M. (2010). Use of Pillared Clay-Based Catalysts for Wastewater Treatment Through Fenton-Like Processes. In *Pillared Clays and Related Catalysts* (pp. 129–165). New York, NY: Springer New York.
https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6670-4_6
- Jallouli, N., Elghniji, K., Trabelsi, H., & Ksibi, M. (2017). Photocatalytic degradation of paracetamol on TiO₂ nanoparticles and TiO₂/cellulosic fiber under UV and sunlight irradiation. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S3640–S3645.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.03.014>
- Kakko, N., Ivanona, N., & Rantasalo, A. (2016). Cell disruption methods.
- Kasuga, T., Hiramatsu, M., Hoson, A., Sekino, T., & Niihara, K. (1998). Formation of Titanium Oxide Nanotube, 14(12), 3160–3163.
- Khan, M. M., Adil, S. F., & Al-Mayouf, A. (2015). Metal oxides as photocatalysts. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(5), 462–464. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2015.04.003>
- Kustiningsih, I., . S., & Purwanto, W. W. (2014). Synthesis of Titania Nanotubes and Titania Nanowires by Combination Sonication-hydrothermal Treatment and their Photocatalytic Activity for Hydrogen Production. *International Journal of Technology*, 5(2), 133. <https://doi.org/10.14716/ijtech.v5i2.400>
- Liang, H.-C., Li, X.-Z., & Nowotny, J. (2010). Photocatalytical Properties of TiO₂ Nanotubes. Retrieved from <https://core.ac.uk/download/pdf/61012889.pdf>
- Liu, N., Chen, X., Zhang, J., & Schwank, J. W. (2014). A review on TiO₂-based nanotubes synthesized via hydrothermal method: Formation mechanism, structure modification, and photocatalytic applications. *Catalysis Today*, 225, 34–51.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cattod.2013.10.090>
- Macák, J. M., Tsuchiya, H., & Schmuki, P. (2005). High-Aspect-Ratio TiO₂ Nanotubes by Anodization of Titanium. *Angewandte Chemie International Edition*, 44(14), 2100–2102. <https://doi.org/10.1002/anie.200462459>
- Meng, F., Liu, Y., Chu, J., Wang, W., & Qi, T. (2014). Structural control of Na₂TiO₃ in pre-treating natural rutile ore by alkali roasting for TiO₂ production. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92(8), 1346–1352. <https://doi.org/10.1002/cjce.21994>
- Pelaez, M., Nolan, N. T., Pillai, S. C., Seery, M. K., Falaras, P., Kontos, A. G., ... Dionysiou, D. D. (2012). A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 125, 331–349. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2012.05.036>
- Roy, P., Berger, S., & Schmuki, P. (2011). TiO₂ nanotubes: synthesis and applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(13), 2904–2939.
- Roy, P., Kim, D., Lee, K., Spiecker, E., & Schmuki, P. (2010). TiO₂ nanotubes and their

application in dye-sensitized solar cells. *Nanoscale*, 2(1), 45–59.

Safaei, M. A., Sarraf-Mamoory, R., b. Rashidzadeh, M., & c. Manteghian, M. (2010). Experimental design for determination of effective parameters in hydrothermal synthesis of TiO₂-derived nanotubes, 7(11–12), 2727–2730.
<https://doi.org/10.1002/pssc.200983805>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–5. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22930834>

von Wilmsowky, C., Bauer, S., Lutz, R., Meisel, M., Neukam, F. W., Toyoshima, T., ... Schlegel, K. A. (2009). In vivo evaluation of anodic TiO₂ nanotubes: an experimental study in the pig. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 89(1), 165–171.

Vu, T. H. T., Au, H. T., Tran, L. T., Nguyen, T. M. T., Tran, T. T. T., Pham, M. T., ... Nguyen, D. L. (2014). Synthesis of titanium dioxide nanotubes via one-step dynamic hydrothermal process. *Journal of Materials Science*, 49(16), 5617–5625.
<https://doi.org/10.1007/s10853-014-8274-4>

Wang, Q., Huang, J.-Y., Li, H.-Q., Chen, Z., Zhao, A. Z.-J., Wang, Y., ... Lai, Y.-K. (2016). TiO₂ nanotube platforms for smart drug delivery: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 4819.

Yutao, M., Yuan, L., Xurui, X., Xiaowen, Z., & Xueping, L. (2006). Sonication-hydrothermal combination technique for the synthesis of titanate nanotubes from commercially available precursors. *Materials Research Bulletin*, 41(2), 237–243.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2005.08.020>

Zhang, M., Bando, Y., & Wada, K. (2001). Sol-gel template preparation of TiO₂ nanotubes and nanorods. *Journal of Materials Science Letters*, 20(2), 167–170.
<https://doi.org/10.1023/A:1006739713220>