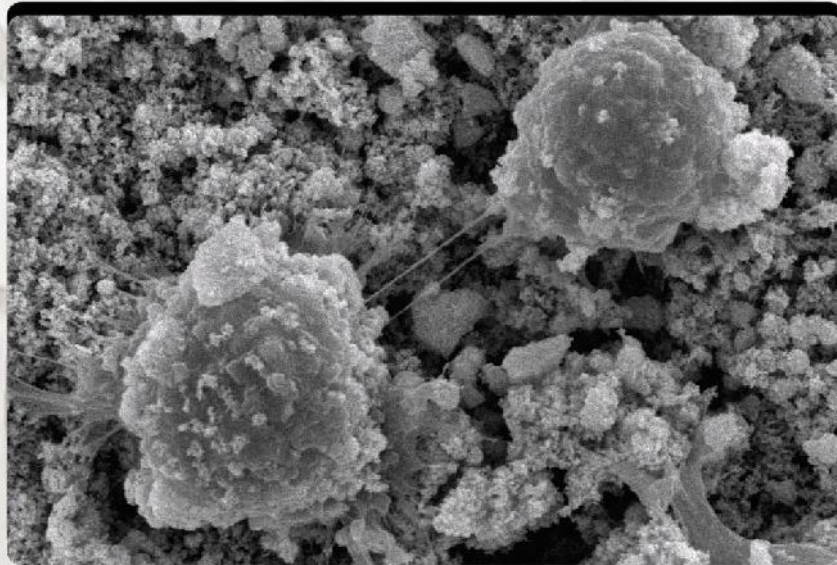


BIOCERÁMICOS POROSOS COMPUESTOS DE HIDROXIAPATITA Y DIÓXIDO DE TITANIO



Quím. Gloria Mercedes Hernández Ortiz

Tesis presentada para optar por el título de grado académico de
Doctor en Ciencia de Materiales

Directora: Dra. Ma. Alejandra Fanovich
Codirector: Dr. Rodrigo Parra



I N T E R M A

Mar del Plata, Argentina, 2020





RINFI se desarrolla en forma conjunta entre el INTEMA y la Biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Mar del Plata.

Tiene como objetivo recopilar, organizar, gestionar, difundir y preservar documentos digitales en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Materiales y Ciencias Afines.

A través del Acceso Abierto, se pretende aumentar la visibilidad y el impacto de los resultados de la investigación, asumiendo las políticas y cumpliendo con los protocolos y estándares internacionales para la interoperabilidad entre repositorios



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).

*A mis abuelitos,
mi madre & Jhon
y mi amado esposo, Luciano*

*Pues todas las cosas provienen de él y existen por su poder y son para su gloria. ¡A
Él sea toda la gloria por siempre! Amén. Rom. 11;35*

Agradecimientos

Ser agradecidos es una cualidad que debemos tener en todo momento, puesto que Dios nos da cada día infinidad de motivos para hacerlo. Sin embargo, es difícil agradecer en unas cuantas líneas a todos aquellos que de una u otra forma hicieron parte del cumplimiento de este propósito, de alcanzar esta meta, siempre mirando hacia adelante.

Comenzaré agradeciendo a CONICET por la beca otorgada, a la Universidad Nacional de Mar del Plata y al INTEMA por el espacio y los recursos brindados para mi crecimiento como profesional.

A Fernando Cuenú y a José Castillo por haberme facilitado la oportunidad de continuar con mis estudios.

A mi directora de tesis Alejandra Fanovich, quien me brindó su apoyo en cada etapa tanto profesional como personalmente, me recibió como una amiga y me hizo sentir como en casa.

A mi codirector Rodrigo Parra, quien también fue muy importante acompañando todo mi proceso, y a quien admiro por su pasión por la ciencia y profesionalismo.

A Martín Lere por su ayuda y colaboración en la fabricación del quipo hidrotermal y asistencia con el equipo de alta presión y Luciana Barbini por su colaboración con los ensayos de adhesión celular

A Miriam, mi compañera de oficina, amiga, “mamá”, etc. Gracias por estar siempre, por cada consejo, cada charla, por enseñarme tantas cosas valiosas de esta hermosa profesión.

A mis compañeros de la división de cerámicos que más que compañeros fueron familia. Gracias por enseñarme que cada momento de felicidad se celebra con una rica torta, por las risas, los asados y por siempre estar al pendiente.

A Andrés, “Shoon”, Vane, Dai, Marcos, Adrián, Laurita, Botta, Hernán, Andreita, Carol y Pedro por su compañerismo, por hacer del día a día un tiempo agradable y ameno. Gracias por las risas, el cariño, el apoyo y cada uno de los momentos vividos.

A Luis Fernando, Martha Liliana y Arielita por su apoyo al emprender el inicio de esta conquista. Así como también a Roxana, Lisandro, Samuel y Raquel y Dani y Mariana por estar pendientes de mí.

A Romi, Juli, Viki y Ceci por su apoyo incondicional y hacer de este tiempo el mejor.

A mis amigos Jose, Anita y Sandrita por animarme desde la distancia, como si estuvieran a mi lado. Gracias por vivir este sueño como uno propio.

A mi familia en Colombia por creer en mí y brindarme siempre su amor, por hacer de cada llamada un momento inolvidable.

A mi nueva familia, gracias por el ánimo y el aguante. Gracias Suegri por tu amor, apoyo y por hacerme sentir parte de ustedes.

A mi mamá y Jhon por confiar siempre en mí, por hacer que cientos de kilómetros se trasformen en 1. Gracias por tanto amor, por cada llamada, por cada abrazo a la distancia, por cada palabra de aliento.

A mis abuelitos queridos, mis amores gracias por creer y confiar tanto en mí. Por ser parte del motorcito que me impulsa siempre a seguir adelante cada día. Gracias por enseñarme a luchar por lo que se quiere y ser persistente. Simplemente gracias.

A mi amado esposo, Luciano. Gracias por los mates, la compañía, por tu ayuda, tu comprensión, por levantarme cada vez que no daba más y sacarme siempre una sonrisa, pero principalmente por tu amor. También, te doy gracias por tu gran ayuda con los gráficos de esta tesis y embellecerla.

Finalmente quiero dar gracias al dador de vida, a mi amado Dios porque hasta aquí me han acompañado tu fidelidad y tu amor. Gracias por permitirme crecer como persona y profesional.

Índice

Resumen	I
Abstract	III
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII

Capítulo I

Estado general del tema: Marco teórico

1.1. Biomateriales	2
1.2. Biomateriales compuestos nanoestructurados	6
1.3. Biocerámicos	10
1.3.1. Biocerámicos inertes	11
1.3.2. Biocerámicos biodegradables o reabsorbibles	11
1.3.3. Biocerámicos bioactivas	12
1.4. Motivación	12
1.5. Objetivos	14
1.5.1. Objetivo general	14
1.5.2. Objetivos específicos	14
1.6. Hipótesis general del tema	15

Capítulo II

Técnicas de caracterización

2.1. Difracción de rayos X de polvos (DRX)	17
2.2. Método Rietveld	17
2.3. Espectroscopia Raman	18
2.4. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	19

2.5.	Determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS)	19
2.6.	Microscopia electrónica de barrido (SEM)	20
2.7.	Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	21
2.8.	Análisis térmico: gravimétrico (TGA) y diferencial (DTA)	21
2.9.	Métodos reológicos	22
2.10.	Nanoindentación	24
2.11.	Medidas de densidad aparente	24
2.12.	Ensayos de adhesión celular	25

Capítulo III

Síntesis hidrotérmica de hidroxiapatita

3.1.	Introducción	28
3.2.	Metodología	34
3.2.1.	Método 1: síntesis a partir de hidróxido de calcio y fosfato ácido de calcio.	34
3.2.2.	Método 2: síntesis a partir de hidróxido de calcio y ácido ortofosfórico	41
3.3.	Conclusiones parciales	50

Capítulo IV

Geles precursores de TiO₂ y sistemas compuestos de HA-TiO₂

4.1.	Introducción	53
4.2.	Metodología	62
4.3.	Resultados y discusión	63
4.3.1.	Ensayos preliminares	63
4.3.2.	Primera serie de ensayos	63
4.3.3.	Segunda serie de ensayos	65

4.3.4. Tercera serie de ensayos	67
4.3.5. Cuarta serie de ensayos	68
4.3.6. Quinta serie de ensayos	71
4.3.7. Morfología para el conformado de las muestras	74
4.4. Conclusiones parciales.....	75

Capítulo V

Secado de geles precursores de TiO₂ y sistemas compuestos de HA-TiO₂ con CO₂ en condiciones supercríticas

5.1. Introducción	78
5.1.1. Técnicas de secado de geles	79
5.2. Secado de geles utilizando un fluido supercrítico	82
5.2.1. Métodos de secado supercrítico	83
5.2.1.1. Secado supercrítico a alta temperatura (HTSCD)	84
5.2.1.2. Secado supercrítico a baja temperatura (LTSCD)	95
5.3. Dióxido de carbono como fluido supercrítico	86
5.4. Metodología	87
5.4.1. Secado de geles compuestos	87
5.4.2. Geles compuestos como portadores de agentes activos	100
5.5. Conclusiones parciales	102

Capítulo VI

Tratamientos térmicos y caracterización

6.1. Introducción	105
6.2. Medidas de densidad aparente	106

6.3. Nanoindentación	107
6.4. Caracterización y estudio de la inclusión de nanopartículas de HA...	108
6.5. Caracterización y evaluación del efecto del agente porógeno	117
6.5.1. Serie con 30% m/m de PVP	117
6.5.2. Serie con 40% m/m de PVP	122
6.6. Interacción entre fases de TiO₂ y HA	124
6.7. Ensayos <i>in vitro</i> de adhesión celular	125
7. Conclusiones generales	132
Referencias	134

Resumen

Los materiales basados en hidroxiapatita son los protagonistas en el desarrollo de soportes para la osteogénesis (proceso de formación de nuevo tejido óseo) dado que presentan una composición química similar al componente mineral natural del hueso. Estos materiales se caracterizan por ser biocompatibles y bioactivos, sin embargo, en algunos casos la presencia de fases secundarias genera deficiencias en el desempeño del material dando lugar a una velocidad de degradación inadecuada o a una baja resistencia mecánica. Para mejorar el comportamiento de estos materiales se ha reportado una combinación de gran potencial tecnológico que conjuga una fase con suficiente resistencia mecánica para soportar el crecimiento de nuevo hueso, y otra que sea capaz de promover el mecanismo de reparación y al mismo tiempo unirse al hueso formado. Este concepto ha dado lugar al desarrollo de materiales nanoestructurados biocompatibles basados en hidroxiapatita (HA) como fase bioactiva, y dióxido de titanio (TiO_2) como fase bioinerte que otorga resistencia mecánica.

En el presente trabajo se propone desarrollar una secuencia metodológica que permita obtener soportes porosos nanoestructurados compuestos de hidroxiapatita y dióxido de titanio. En la primera parte de este trabajo de tesis, se estudió la síntesis de nanopartículas de HA por vía hidrotermal a partir de suspensiones acuosas de hidróxido de calcio y ácido ortofosfórico. Se analizó la influencia que tienen la naturaleza y concentración de aditivos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y hexametilentetramina (HMTA) sobre la morfología de las partículas obtenidas. También se analizó la influencia de la velocidad de enfriamiento del sistema de reacción sobre las características morfológicas y estructurales de las partículas de hidroxiapatita. Se determinó que a mayores velocidades de enfriamiento se generan mayor número de defectos superficiales, lo que le conduciría a un aumento en la capacidad de biointegración de las nanopartículas de HA. En la segunda parte de este trabajo, se implementaron procedimientos experimentales que proporcionaron la integración de las nanopartículas de HA en una matriz de dióxido de titanio a partir de la técnica sol-gel. Se realizaron diversos ensayos que permitieron ajustar las variables de síntesis para la formación de los sistemas porosos compuestos. Además, se analizó el efecto de la concentración de HA sobre el tiempo de gelación y la integridad final de los geles compuestos obtenidos. En una tercera parte, se presenta el estudio del proceso de secado de los geles, que representa la etapa crítica del desarrollo debido a que se requiere eliminar el solvente contenido en los poros sin que

se deteriore la microestructura tridimensional generada en el proceso de formación del gel. En este trabajo se estudió el proceso de secado con dióxido de carbono en condiciones supercríticas, que consiste básicamente en una extracción del solvente contenido en los poros del gel. Se analizó la influencia de la presión y la temperatura en el proceso de secado asociado a la integridad final y microestructura desarrollada en los materiales compuestos.

Finalmente, se analizan las características de los materiales desarrollados vinculados a su resistencia mecánica y comportamiento biológico frente a células específicas del tejido óseo y se discuten los alcances de sus aplicaciones.

Abstract

Hydroxyapatite-based materials have a chemical composition similar to the mineral component of bones. For this reason, these materials are the protagonists in the development of supports for osteogenesis (process of formation of new bone tissue). Hydroxyapatite materials are biocompatible and bioactive, however, in some cases the presence of secondary phases generates deficiencies in the performance, resulting in an inadequate degradation rate or a low mechanical resistance. The behavior of these materials can be improved through a combination of great technological potential that merges a phase mechanically resistant (to support the growth of new bone), and another that can stimulate the repair mechanism and, at the same time, join the bone formed.

This concept has led to the development of biocompatible nanostructured materials based on hydroxyapatite (HA) as a bioactive phase, and titanium dioxide (TiO_2) as a bioinert phase that provides mechanical resistance.

In the present work, the development of a sequence of methods that allows obtaining nanostructured porous supports composed of titanium dioxide and hydroxyapatite is proposed. In the first part of this thesis, the hydrothermal synthesis of HA nanoparticles was studied from aqueous suspensions of calcium hydroxide and orthophosphoric acid. The influence of the nature and the concentration of additives such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and hexamethylenetetramine (HMTA) on the morphology of the particles obtained was analyzed, as well as the influence of the cooling rate of the system on the morphological and structural characteristics of the hydroxyapatite particles. When a high cooling rate is used, a greater number of surface defects can be generated, which would lead to an increased biointegration capacity of HA nanoparticles. The second part of this work shows a procedure that provided the integration of HA nanoparticles in a titanium dioxide matrix from the sol-gel method. The synthesis variables for the formation of porous composites were adjusted by previous tests. Moreover, the effect of HA concentration on gelation time and the final integrity of the obtained gels were analyzed. In a third part, the study of the gel drying process is presented, which is the critical stage of development because it is necessary to eliminate the solvent contained in the pores without cracking of the three-dimensional microstructure of the arranged gel. In this work we studied the drying process with carbon dioxide under supercritical conditions, which consists of an extraction of the solvent contained in the pores of the gel. The influence of the

pressure and the temperature on the drying process associated with the integrity and the developed microstructure was analyzed.

Finally, the developed materials were characterized analyzing the crystalline structure of the phases, the microstructure (porosity, pore size), as well as the response of the surfaces of these materials to the adhesion of bone tissue cells, and the scope of their applications are discussed.

Índice de figuras

Figura 1.1: clasificación de los materiales según su naturaleza.....	2
Figura 1.2: clasificación de biomateriales de regeneración ósea por generación.....	5
Figura 1.3 Estructura jerárquica de un hueso típico en diferentes escalas	8
Figura 1.4: Ejemplos de cerámicas inertes, alúmina (izquierda) y zirconia (derecha).....	11
Figura 1.5: Aspecto clínico del β -TCP.....	11
Figura 2.1 Diagrama esquemático del módulo de almacenamiento, G' , y de pérdida G'' , vs. La frecuencia (S^{-1}	23
Figura 3.1. Estructura cristalina de la hidroxiapatita	28
Figura 3.2. Efecto del pH, temperatura, y duración del tratamiento hidrotérmico sobre la fase, morfología y tamaño de las partículas de un polvo de CaP	31
Figura 3.3: Diagrama de flujo para la síntesis de HA método 1.....	35
Figura 3.4: Patrones de DRX para los productos obtenidos de las preparaciones #1(pH 7) y #2 (pH 9).....	36
Figura 3.5: Espectros Raman para los productos obtenidos de las preparaciones #1(pH 7) y #2 (pH 9).	37
Figura 3.6: Micrografía SEM del producto de la preparación a) #2 (pH 9) y b) #1 (pH 7) a 150°C.....	37
Figura 3.7: a) Patrones de DRX y b) espectros Raman de muestras obtenidas a 100, 120 y 150 °C (pH 7 durante 24 h)	38
Figura 3.8: Patrones DRX de muestras obtenidas a distintos tiempos de reacción a pH=7.....	39
Figura 3.9: Imágenes SEM de muestras sintetizadas a 120 °C y pH 7 con a) CTAB/ Ca^{2+} (1:1); b) CTAB/ Ca^{2+} (1:2); c) y d) con TTX, 2 % m/v.	40
Figura 3.10: Patrón de DRX para la muestra obtenida a pH 9, 150°C por 24 h y calcinada a 800 °C por 1 h.....	41
Figura 3.11: Diagrama de flujo para la síntesis de HA con (H) HMTA y (C) CTAB.....	43
Figura 3.12: Patrones DRX para las muestras sintetizadas a) sin aditivo con proporciones estequiométricas y con un 10% de Ca^{++} en exceso; b) con HMTA con proporciones estequiométricas y con un 10% de Ca^{++} en exceso.....	44
Figura 3.13: Patrones DRX: (a) y espectros Raman(b) de los polvos obtenidos con enfriamiento rápido (parte superior) y enfriamiento lento (parte inferior)	45
Figura 3.14: Micrografías SEM de partículas de HA: a) con enfriamiento lento (Muestra S); b) con enfriamiento rápido (Muestra F)	46
Figura 3.15: Curvas de distribución de tamaño de partícula por DLS: a) partículas de HA obtenidas sin aditivo (muestras S y F), b) partículas de HA obtenidas con CTAB y enfriamiento rápido c) partículas obtenidas con HMTA y enfriamiento rápido	46
Figura 3.16: Esquema representativo de lo que sucede en la síntesis hidrotermal con: A. HMTA y B. CTAB.....	48

Figura 3.17: Curvas comparativas de distribución de tamaño de partícula por DLS para las muestras.....	59
Figura 3.18: Tamaño de cristalito (nm) de muestras de HA determinado la ecuación de Scherrer.....	50
Figura 3.19: Micrografías TEM para a) HA comercial Sigma-Aldrich, b) HA sintetizada método hidrotermal (HF05).....	51
Figura 3.20: Patrones DRX para la muestra HF05 calcinada a diferentes temperaturas....	51
Figura 4.1: Esquema de las etapas del proceso sol-gel.....	53
Figura 4.2: Esquema del proceso sol-gel y productos que pueden desarrollarse.....	55
Figura 4.3: Estructuras cristalinas de TiO ₂ a) Anatasa, b) Rutilo y c) Brookita.....	56
Figura 4.4: Estructuras cristalinas de TiO ₂	57
Figura 4.5: Esquema del mecanismo antibacterial del matrial híbrido TiO ₂ @SiO ₂ sobre E. Coli.....	59
Figura 4.6: Proceso de obtención de los sistemas compuestos de TiO ₂ - HA.....	62
Figura 4.7: Aspecto del gel de TiO ₂ obtenido a partir de la preparación M9.....	67
Figura 4.8: Aspecto de los geles de TiO ₂ obtenidos en la tercera serie de ensayos (preparación M13).....	68
Figura 4.9: Curvas de G' (módulo elástico) y G'' (módulo de pérdida) para los geles compuestos con distinta proporción de nanopartículas de HA.....	72
Figura 4.10: Curvas de G' (módulo elástico) y G'' (módulo de pérdida) para los geles compuestos con a) 30% de PVP (TP3) y b) con 30% de PVP y 40% de HA (TP3H4).....	73
Figura 5.1: Estructura porosa generada a partir de una reacción sol-gel.....	78
Figura 5.2: Métodos de secado de un gel húmedo para dar: un xerogel, un criogel o un aerogel.....	79
Figura 5.3. Contracción debida a las fuerzas capilares en poros de diferentes radios durante el proceso de secado convencional.....	80
Figura 5.4. Presión capilar de diferentes solventes en función del tamaño de poro.....	81
Figura 5.5: Características que presenta un fluido supercrítico.....	83
Figura 5.6: Esquema del secado supercrítico del método HTSCD utilizando metanol como ejemplo.....	84
Figura 5.7: Equipamiento básico para procesos de extracción con FSC.....	85
Figura 5.8: Diagrama de fases para el dióxido de carbono (M= 44 g/mol).....	86
Figura 5.9: Curvas de secado con CO ₂ -SC para los geles de TiO ₂ con 30% m/m de PVP Muestra TP3: a) T=60°C; b) T= 90°C.....	89
Figura 5.10: Curvas de secado con CO ₂ -SC para los geles compuestos de TiO ₂ con 30% m/m de PVP y 40% m/m HA, Muestra TP3H4: a) T=60°C; b) T= 90°C.....	90
Figura 5.11: Curva de extracción integral. Cantidad total de extracto vs tiempo de extracción. Parte I es lineal; Parte II es no-lineal y puede aproximarse a un valor límite, dado por la cantidad de sustancia extraíble.....	91

Figura 5.12: Evolución del secado supercrítico de geles húmedos: (a) poro lleno del solvente líquido del gel, (b) poros llenos de líquido expandido, (c) poro lleno de mezcla de fluido supercrítico, (d) poro con solvente restante principalmente en las paredes, y (e) poro seco.....	93
Figura 5.13: Aspecto de los geles compuestos secados a 60°C y 250 bar con CO ₂ -SC de dos geometrías diferentes a) prismas; b) pastillas.....	96
Figura 5.14: TGA y DTA de muestras de TiO ₂ (T) y de TiO ₂ con diferentes contenidos de HA (TH2, TH4, TH6) luego del secado con CO ₂ -SC.....	97
Figura 5.15: TGA y DTA de muestras conteniendo PVP (TP3) y diferente proporción de HA (P3H2, P3H4 y P3H6) luego del secado con CO ₂ -SC.....	98
Figura 5.16: Imágenes SEM para los geles secados con CO ₂ -SC a 250 bar y 60 °C muestras a) T, b) TH2, c) TH4, y d) TH6.....	99
Figura 5.17: Imágenes SEM para los geles secados con CO ₂ -SC a 250 bar y 60 °C muestras a) TP3H2, b) TP3H4, y c) TP3H6.....	100
Figura 5.18: Esquema de preparación de geles compuestos funcionalizados con ácido úsnico y nanopartículas de Fe, secados con CO ₂ -SC a 250 bar y 60 °C.....	102
Figura 6.1: Esquema de la variación de densidad del gel compuesto TP3H4 durante su proceso de obtención.....	107
Figura 6.2: (a) Patrones de DRX de polvos con diferente contenido de HA tratados a 800 °C y (b) Evolución de fases en la muestra TH4 a diferentes temperaturas.....	109
Figura 6.3: Evolución de fases en la muestra T a diferentes temperaturas.....	110
Figura 6.4: Refinamiento Rietveld para muestras HA, TH4 y TH6.....	112
Figura 6.5: Espectros FT-IR para TiO ₂ (T) y sistemas compuestos TiO ₂ -HA (TH2, TH4 y TH6) calcinados a 800°C.....	114
Figura 6.6: (a) Espectros Raman para TiO ₂ (sin HA) y sistemas compuestos TiO ₂ -HA (TH2, TH4 y TH6) calcinados a 800°C y (b) Detalle de la región 750-1000 cm ⁻¹	115
Figura 6.7: Imágenes SEM de los materiales con diferentes % de HA (a. T, b. TH2, c. TH4 y d. TH6) tratados térmicamente a 800 °C durante 1 h.....	116
Figura 6.8: Imágenes SEM de la muestra 60% HA (TH6) con diferentes magnificaciones.....	116
Figura 6.9: Patrones de DRX para muestras con 30 % de PVP (P3) y diferentes cantidades de HA calcinadas a 800 por 1 h.....	118
Figura 6.10: Patrones de DRX para muestras TP3H2-7 y PT3H4-7 calcinadas a 800°C.....	119
Figura 6.11: Patrones de DRX para la muestra TP3H6 calcinada a distintas temperaturas.....	119
Figura 6.12: Microestructuras de las muestras a) TP3, b) TP3H2, c) TP3H4 y d) TP3H6, calcinadas a 800°C.....	120

Figura 6.13: Microestructuras de las muestras TP3 y TP3H6 con diferentes magnificaciones.....	121
Figura 6.14: Microestructuras de la muestra TP3H6 calcinada a diferentes temperaturas.....	122
Figura 6.15: Patrones de DRX y microestructuras de las muestras TP4H4 y TP4H6 calcinadas a 800°C.....	123
Figura 6.16: Mapeo EDS de la muestra TP4H4 secada con CO ₂ -SC y calcinadas a 800°C.....	123
Figura 6.17: Aumento en la región de 750-1000 cm ⁻¹ para las muestras obtenidas en presencia de PVP tratadas térmicamente a 800°C.....	125
Figura 6.18: Materiales porosos preparados a partir de la dispersión de HA nanométrica obtenida por síntesis hidrotérmica en geles de TiO ₂ , con la adición de PVP, secados con CO ₂ supercrítico y sinterizados a 800°C.....	125
Figura 6.19: Esquema de las proteínas involucradas en la unión de células eucariotas derivadas del hueso sobre materiales.....	127
Figura 6.20: Micrografías SEM de la superficie de los materiales ensayados in vitro con la línea celular MG63.....	128
Figura 6.21: Micrografías SEM de los materiales TP3H4 y TP3H6 luego del ensayo de adhesión celular.....	130

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Aplicaciones de biomateriales sintéticos en medicina.....	3
Tabla 3.1: Trabajos de los últimos años de síntesis de HA por el método hidrotermal.....	33
Tabla 3.2: variación del pH en la síntesis hidrotérmica de hidroxiapatita.....	36
Tabla 3.3. Condiciones de síntesis empleando HMTA y CTAB como aditivos.....	42
Tabla 3.4: Datos del análisis de las distribuciones de tamaño de partícula.....	47
Tabla 4.1: Condiciones de síntesis utilizados en la serie de ensayos preliminares empleando una concentración [BuTi] de 0,8 mol/L y un tiempo de envejecimiento de 3 meses.....	63
Tabla 4.2: Condiciones de síntesis y características del producto para la primera serie de ensayos.....	64
Tabla 4.3: Influencia de las velocidades relativas de hidrólisis y condensación en la estructura del gel.....	65
Tabla 4.4: Condiciones de síntesis y características del producto para la segunda serie de ensayos.....	66
Tabla 4.5: Condiciones de síntesis y características del producto para la tercera serie de ensayos.....	67
Tabla 4.6: Porcentaje de HA nanométrica incorporada a la preparación M13 y características del producto.....	69
Tabla 4.7: Condiciones de síntesis y características del producto para la quinta serie de ensayos.....	72
Tabla 4.8: Diferentes tipos de conformado para las muestras rodillos, pastillas y prismas.....	75
Tabla 5.1: Condiciones críticas de algunos solventes.....	84
Tabla 5.2: Propiedades de las fases líquida, gaseosa y supercrítica del CO ₂	87
Tabla 5.3. <i>Pérdida de masa y disminución del tamaño de las muestras TP3 y TP3H4 luego del secado con CO₂-SC y del calcinado.....</i>	94
Tabla 5.4: <i>Pérdida de masa y disminución del tamaño de las muestras TP3 y TP3H4 luego del secado con CO₂-SC y del calcinado.....</i>	100
Tabla 6.1. Densidad y porosidad abierta para las muestras TP3, TP3H2, TP3H4 y TP3H6 calcinadas a 800 °C.....	106
Tabla 6.2. Registros de scratch para las muestras TP3 y TP3H6.....	108
Tabla 6.3. Tamaño de cristalito (β) y parámetros estructurales obtenidos a temperatura ambiente mediante refinamiento Rietveld.....	112
Tabla 6.4. Datos cuantitativos de la fase rutilo y anatasa.....	113
Tabla 6.5: Condiciones de preparación de geles compuestos de TiO ₂ -HA.....	117

Capítulo I

*Estado general del
tema: Marco teórico*



1.1. BIOMATERIALES

A través de la historia el hombre ha desarrollado diferentes materiales según su necesidad, logrando mejorar así su calidad de vida. El empleo de diversos materiales de uso común como las conchas de moluscos, el marfil, piezas de madera o metales y minerales, eran usadas en la antigüedad para sustituir las partes perdidas del cuerpo humano. La creciente necesidad que enfrentaban las personas por reemplazar, reparar o reconstruir tejidos u órganos que habían sido dañados por enfermedades, defectos congénitos, accidentes, entre otros, llevó a un incremento en el interés de este tema. Sin embargo, fue entrando al siglo XX cuando la ciencia de los biomateriales se desarrolló rigurosamente, como respuesta a una necesidad de ofrecer tratamientos paliativos a un buen número de afecciones y accidentes asociados a grandes guerras, sobre todo la Segunda Guerra Mundial. En 1982, se enunció el concepto de biomaterial como cualquier sustancia (distinta de una droga) o combinación de sustancias, de origen natural o sintético, que puede ser usada por cualquier período de tiempo, como parte o totalidad de un sistema que trata, aumenta o reemplaza algún tejido, órgano o función del cuerpo.[1–3]

Sin embargo, la Sociedad Europea de Biomateriales, en 1986, por consenso acordó una definición más simple: Biomaterial, un material – no vivo - utilizado en un dispositivo médico destinado a interactuar con sistemas biológicos. [4–6] En este sentido el diseño de nuevos biomateriales requiere tener conocimiento de la naturaleza y características fisicoquímicas de las fases que se utilizarán para su desarrollo. La figura 1.1 ordena a los biomateriales según su naturaleza.

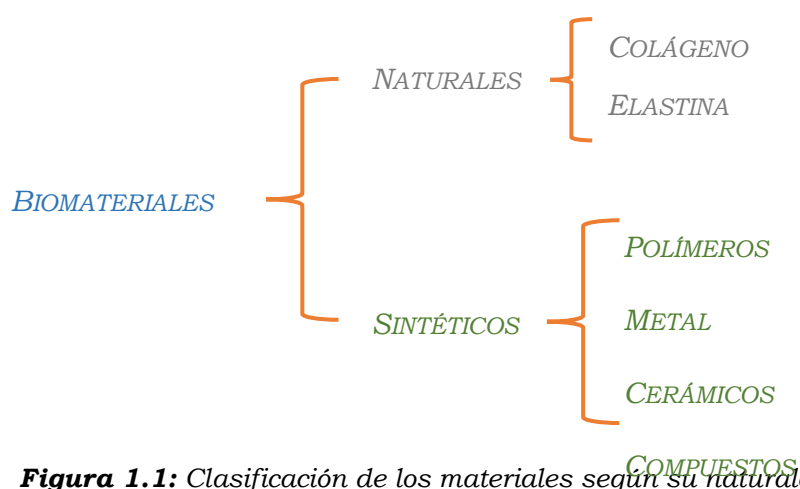



Figura 1.1: Clasificación de los materiales según su naturaleza

Como muestra la figura anterior, son varios los biomateriales de origen sintético. Estos gracias a su amplia disponibilidad, con el paso del tiempo han evolucionado y experimentado un gran desarrollo que, dependiendo de sus características, propiedades de estructuras y comportamientos, permiten la elaboración de nuevos materiales con aplicaciones de avanzada tanto para tejidos duros como blandos, bioestables, biodegradables, sistemas de regeneración ósea, entre otros. En la Tabla 1.1 figuran algunas de las aplicaciones de los biomateriales en la medicina. [1,2,5]

Tabla 1.1: Aplicaciones de biomateriales sintéticos en medicina[1,7]

MATERIAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS	APLICACIONES
<p>Polímeros: silicona, Teflon, Nylon, PMMA, polietileno, polipropileno</p>	<p>Fácil de producir, baja densidad</p>	<p>Baja resistencia, no fácilmente degradables</p>	
<p>Metales: Acero 316, 316L, plata, titanio, cobalto F-75, aleaciones de Ti, Cr Co y Cr Co Mo</p>	<p>Dúctiles, alta resistencia a la fractura y desgaste</p>	<p>Baja biocompatibilidad, se pueden corroer, propiedades muy diferentes a las encontradas en el cuerpo humano</p>	
<p>Cerámicos: óxidos de aluminio, aluminatos de calcio, óxidos de titanio, fosfatos de calcio, carbón</p>	<p>Alta biocompatibilidad, resistencia a la corrosión, alta resistencia a la compresión y al desgaste, baja conductividad eléctrica</p>	<p>Baja resistencia al impacto, difícil fabricación</p>	
<p>Compuestos: metales con cerámicos, materiales recubiertos con carbón.</p>	<p>Inertes, alta biocompatibilidad, resistencia a la corrosión</p>	<p>Falta de consistencia, difícil de fabricar</p>	

En particular los biomateriales destinados a la reparación de tejido óseo han evolucionado durante varias décadas, lo que ha permitido clasificarlos en generaciones donde, a lo largo de los años, han aparecido nuevos conceptos vinculados con el trabajo interdisciplinario. Esto ha permitido la siguiente clasificación:

- Materiales de primera generación: una primera generación de materiales fue desarrollada en los años '50 para su uso en el cuerpo humano. El objetivo de estos primeros biomateriales era “alcanzar una combinación conveniente de propiedades físicas para reemplazar las del tejido sustituido con una respuesta tóxica mínima del receptor”. Se buscaban materiales que fueran inertes en el cuerpo con el fin de reducir la respuesta inmune y la reacción a un cuerpo extraño a un nivel mínimo. La elección de los materiales usados en dispositivos médicos era fundamentalmente empírica. Esta generación de materiales tiene relación con el desarrollo de la industria aeronáutica y con materiales como el titanio y sus aleaciones, cuyas características relevantes son la inercia y la pasividad. Los materiales representativos de esta clase son el acero y el polietileno [8,9].

- Materiales de segunda generación: gracias al desarrollo del conocimiento científico en el campo de los biomateriales y de la inmunología en los años 1970 surgió la generación de los materiales bioactivos y de los materiales bioabsorbibles. Los materiales bioactivos tienen la habilidad de interactuar con el medio biológico para mejorar la respuesta biológica y lograr la unión entre el tejido y la superficie del biomaterial. Los materiales bioabsorbibles tienen la habilidad de sufrir una degradación progresiva mientras el nuevo tejido se regenera y se cura. El objetivo era producir componentes biocompatibles y capaces de interactuar con el medio biológico favoreciendo su integración. En el ámbito ortopédico y odontológico, esta generación ha conducido a la elaboración de los primeros injertos óseos como los vidrios bioactivos, cerámicas, vitrocerámicas y materiales compuestos, encontrándose como ejemplos característicos los fosfatos de calcio, la hidroxiapatita y los biovidrios [10].

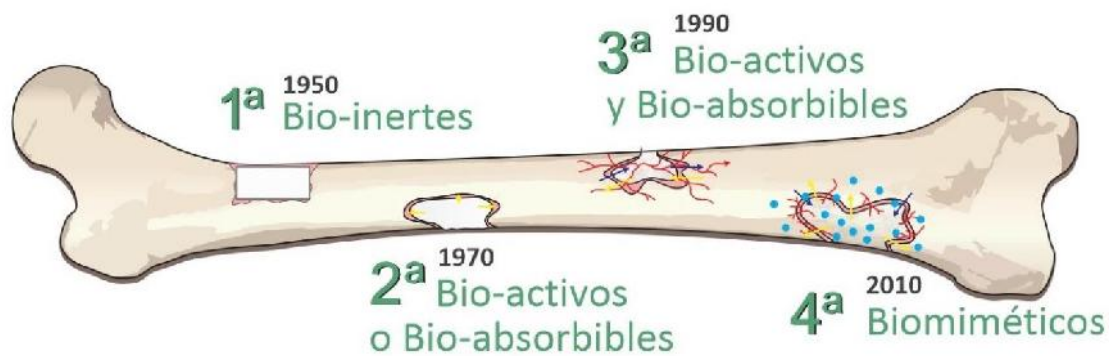


Figura 1.2: Clasificación de biomateriales de regeneración ósea por generación

-Materiales de tercera generación: Mientras que en la segunda generación los biomateriales pueden ser bioactivos o bioabsorbibles, en la tercera generación se desarrollan materiales que combinan estas dos propiedades. Además, se pueden diseñar de tal forma que puedan responder a estímulos externos, por ejemplo, haciéndolas capaces de cargarse con moléculas biológicamente activas, en unos casos para liberarlas de forma controlada en el momento preciso y en el lugar adecuado, como podría ser el caso de fármacos antitumorales, o en otros para unirlos covalentemente a la superficie del material y facilitar su unión a los osteoblastos y así acelerar la formación de nuevo hueso [10].

- Materiales de cuarta generación: Gracias al desarrollo del conocimiento sobre la interacción biomaterial/medio biológico a nivel molecular, celular y tisular, ha sido posible elaborar biomateriales que se caracterizan por la capacidad de estimular células específicas para ayudar al cuerpo a curarse y a reparar sus propios tejidos de manera natural siguiendo procesos fisiológicos. En esta etapa, hay una clara evolución en el conocimiento y enfoque del trabajo a realizar, y los mundos de la medicina y la ciencia de los materiales se abren y coordinan con la bioquímica y la biología para lograr obtener esos materiales cuya misión es regenerar los tejidos vivos. Estos materiales son los biomateriales de cuarta generación, también llamados “biomateriales inteligentes” [10,11].

La cuarta generación pretende obtener materiales que interactúen en profundidad con los sistemas biológicos mediante la regularización del proceso biológico, integrándose en el organismo y con una capacidad de degradarse y de luchar contra las infecciones. Se denominan materiales inteligentes, ya que adaptan

sus propiedades al estímulo exterior o contienen sensores para vigilar las funciones e interactuar con los sistemas biológicos [6].

Como se ha mencionado en la definición de biomaterial, el fin de éste será entrar en contacto con un sistema biológico por lo que debe poseer propiedades particulares tanto mecánicas como biológicas. La característica esencial y que deben cumplir todos los biomateriales es la biocompatibilidad, la cual se entiende como la cualidad de no inducir efectos tóxicos o dañinos sobre los sistemas biológicos donde actúan, devolviendo una respuesta apropiada por parte del receptor y con un fin específico. Debido a las características del sistema inmunológico cuando se introduce un cuerpo extraño en el organismo éste tiende a rechazarlo o incluso a atacarlo, generando dolores, inflamaciones, que pueden provocar la necesidad de retirar dicho material. Es por ello por lo que los materiales biocompatibles no deben generar toxicidad, ni anticuerpos, ni respuesta antigénica, ni respuesta inflamatoria [12].

La BIOCOPATILIDAD es la habilidad de un material para ser aceptado por el cuerpo del paciente y que, además, no irrite a los tejidos circundantes, no provoque una respuesta inflamatoria, no produzca reacciones alérgicas y que no tenga efectos carcinogénico, o sea, que no produzca cáncer.

Por otro lado, es necesario que los biomateriales para regeneración ósea presenten ciertas características físicas y mecánicas, que lo hagan útil para la función requerida en el sitio implantado, lo que se conoce como biofuncionalidad [13].

1.2. BIOMATERIALES COMPUESTOS NANOESTRUCTURADOS

Un material compuesto o *composite*, es el resultado de la combinación de dos o más materiales diferentes: metal-metal, metal-cerámico, metal-polímero, polímero-cerámico, polímero-polímero y cerámico-cerámico; de tal modo que se puedan aprovechar las propiedades de ambos. Su fabricación se lleva a cabo mezclando los diferentes materiales, de manera que la dispersión de uno de ellos en el otro pueda ser controlada y se alcancen propiedades óptimas [7,14]. Cada constituyente cumple una función específica y difiere en forma o composición, además:

- Los constituyentes mantienen su identidad física o química; es decir, no se disuelven o fusionan completamente uno en el otro, aunque actúan concertadamente,
- Los componentes pueden normalmente identificarse y exhiben una interfaz entre uno y el otro,
- Las propiedades del material resultante, usualmente mecánicas, son superiores a las de sus componentes individuales por separado.
- Los constituyentes tienen que manifestarse con una abundancia razonable, por ejemplo, mayor que el 5% en volumen.[3]

Una de las ventajas principales de los materiales compuestos es que, con el refuerzo adecuado, se pueden modificar o mejorar algunas propiedades de la matriz. Estas propiedades pueden ser mecánicas, como mayor resistencia, rigidez, resistencia al desgaste o a la fatiga; de tipo químico, como mayor resistencia a la corrosión, mayor bioactividad, o de tipo físico, como mejoras en el comportamiento de los materiales a campos eléctricos y acústicos o a la temperatura y la presión. Debido a estas ventajas, estos materiales tienen una gran aplicación en áreas donde las propiedades de cada material son fundamentales y complementarias para el desarrollo de nuevos materiales que garanticen la integración de éstos con el tejido circundante, como es el caso de los materiales de sustitución ósea.

Recientemente, los materiales para uso como sustituto óseo han cobrado un gran interés, especialmente los materiales compuestos, donde se pretende, por medio del uso de diferentes componentes, tratar de imitar la estructura y funciones del hueso, tanto a nivel celular como estructural, sin producir reacciones inmunológicas y permitiendo un crecimiento adecuado del tejido natural. Se dice que el hueso se puede describir como un *composite*, el cual está constituido por una matriz de apatita reforzada por fibras de colágeno. Esta configuración le proporciona al tejido óseo la resistencia necesaria para cumplir con éxito su función de sostén del organismo, así como la adecuada elasticidad para absorber, sin colapsar, los grandes esfuerzos instantáneos que se generan durante la actividad del ser vivo.[3,15] Figura 1.3

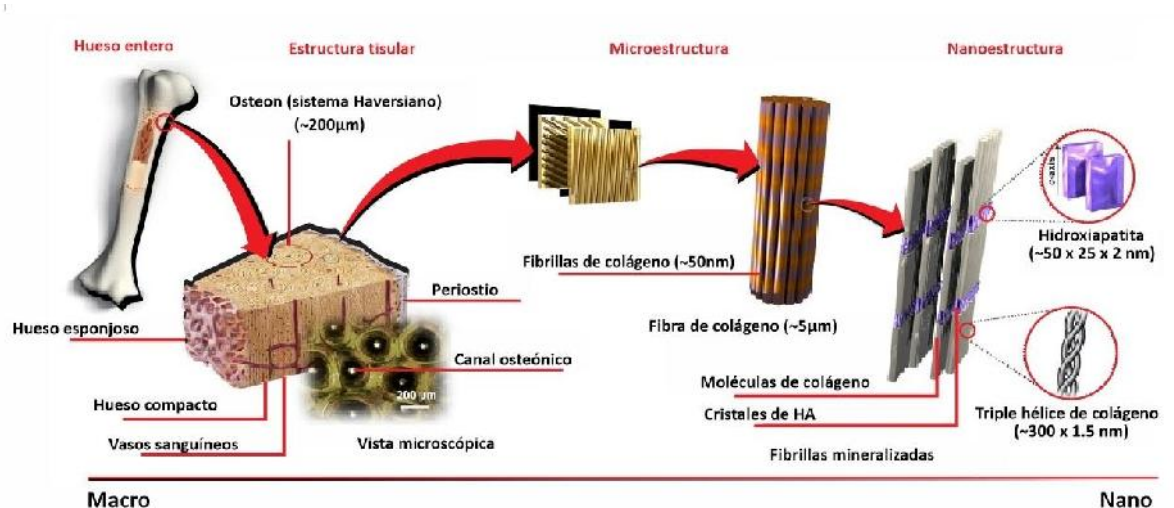
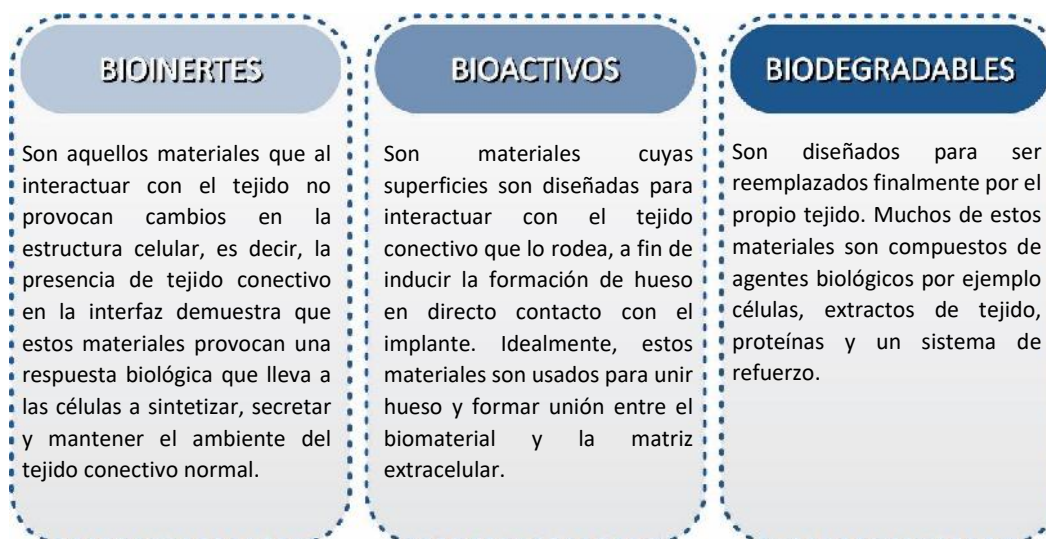


Figura 1.3 Estructura jerárquica de un hueso típico en diferentes escalas [16]

Entre los biomateriales utilizados para regeneración ósea, se encuentran los de relleno o injerto y, por otro lado, los materiales de aislamiento o barrera. Los primeros son productos biológicos destinados al relleno de defectos óseos. Los materiales de aislamiento o barrera son biomateriales naturales o sintéticos que permiten la proliferación de grupos celulares específicos evitando la invasión de ciertos tipos de células en un determinado espacio.

Tras el implante de materiales para la regeneración ósea, se produce una interacción entre las partículas de este con el tejido, conocida como interfaz tejido-material. La interfaz tejido-material es la conexión física entre dos sistemas independientes; el tejido biológico circundante y el implante. Diversos estudios en esta comunicación molecular plantean que el tejido biológico posee diferentes mecanismos que permiten reconocer detalles moleculares, que influyen directamente en las interacciones producidas a partir de la introducción del implante en el organismo. Según los diferentes niveles de interacción y el tipo de respuesta celular, éstos materiales se pueden clasificar a su vez, en tres categorías: biotolerantes o bioinertes, bioactivos y biodegradables [6,17].



De las tres categorías mencionadas anteriormente, los materiales con propiedades de bioactividad son objeto de estudio en la actualidad (correspondiente a los materiales de tercera generación). Éstos han cobrado importancia, ya que no se trata solo de reparar, sino de regenerar, de estimular los mecanismos ya presentes de forma natural en el cuerpo humano. Estos materiales son capaces de inducir la formación de tejido óseo alrededor del implante y una fuerte integración con el mismo (osteointegración). En la aplicación ortopédica y dental, los materiales bioactivos inducen la formación de apatita similar al hueso tanto *in vitro* como *in vivo*.

La **osteointegración** es una conexión firme, estable y duradera entre un implante y el hueso que lo rodea. El éxito de esta conexión o interfaz hueso-implante depende de factores biológicos y sistemáticos del paciente y de las características del implante y su superficie. La primera definición (*Bränemark*, 1986) de osteointegración hace referencia a la conexión directa, estructural y funcional del hueso vivo con la superficie del implante, sin intervención del tejido circundante. Sin embargo, con el tiempo y el desarrollo de nuevos materiales con mayor interacción entre ambos, fue redefinida por Albrektsson y Zarb en 1993 como “el proceso por el cual se consigue una fijación rígida y asintomática de materiales aloplásticos” [18], es decir, consiste en la adhesión química demostrable del hueso al implante. No obstante, el éxito de la unión del biomaterial al hueso depende de la función de dos procesos previos tales como:

- La **osteinducción** permite la diferenciación de las células osteoprogenitoras. Se dice que un biomaterial es osteoinductivo cuando presenta la facultad de formar tejido óseo en un sitio donde no hay hueso preexistente.[19]
- La **osteokonducción**, es la capacidad que tiene un biomaterial de guiar el crecimiento, bien sea en su superficie (biomateriales densos) o en su volumen

(biomateriales porosos), buscando el crecimiento en el volumen del biomaterial injertado y por lo tanto son ideales los biomateriales con porosidad abierta. Esta capacidad depende de varios factores que establecen la afinidad entre su superficie y las proteínas y las células responsables de la formación del nuevo tejido óseo. La superficie tiene que poder acoger los osteoblastos, células constructoras del tejido óseo, y permitir su proliferación, dando lugar a la colonización del biomaterial por las células, las cuales llevan a cabo la osteogénesis (formación de nuevo hueso).[19]

Por otro lado, para que haya una regeneración del hueso, cabe destacar que los biomateriales compuestos, deben contar con ciertas características de vital importancia como lo son: (a) **propiedades superficiales**, entre ellas las propiedades químicas y topográficas de la superficie del biomaterial, las cuales pueden afectar de manera directa en la adhesión y por ende la proliferación celular; (b) **propiedades mecánicas**, cuyo desarrollo es uno de los principales desafíos de la ingeniería tisular, ya que al mejorar estas propiedades, se obtienen materiales con mayor resistencia, lo cual permite que puedan, de alguna manera, ejercer la función de soporte que el hueso cumple; (c) **porosidad**, son importantes en este tipo de materiales debido a la necesidad de integrar espacios que puedan albergar a células y polipéptidos activos para favorecer la penetración del tejido regenerado. Los mismo deben ser abiertos e interconectados con el fin de permitir la difusión de nutrientes y gases producto de la actividad celular; (d) **tamaño de poro**, el control de tamaño de poro es de gran importancia para una correcta vascularización del tejido y a su vez una adecuada osteogénesis. [15,20].

En este sentido, desde hace más de dos décadas, diversas investigaciones se han enfocado en la elaboración de materiales compuestos porosos y bioactivos con la finalidad de utilizarlos como soportes en procesos de regeneración de tejido óseo. En este campo, se han desarrollado materiales que pueden imitar la morfología y función de la estructura ósea, con el objeto de optimizar la integración con el tejido circundante y obtener así soportes para la osteogénesis. Los biocerámicos son los protagonistas de este escenario gracias a las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad que presentan [17].

1.3. BIOCERÁMICOS

Los cerámicos utilizados en la reparación y reconstrucción de partes del cuerpo dañadas o enfermas se denominan biocerámicos. La norma ISO/TR 10993-9 (1994)

define un biocerámico como un material cerámico diseñado para lograr un comportamiento fisiológico específico al ser usado en la construcción de prótesis u órganos artificiales internos. [3] Entre los biocerámicos encontramos:

1.3.1. Biocerámicos inertes: son aquellos que muestran pocos cambios químicos durante la exposición a las disoluciones fisiológicas. La respuesta del tejido a estos biocerámicos es la formación de una membrana fibrosa muy fina de varias micras, que rodea al implante, esto se debe a que los tejidos fibrosos no se enlazan químicamente al material biocerámico inerte.[21] Ejemplos de este tipo de materiales son, dióxido de titanio (TiO_2), alúmina (Al_2O_3) y zirconia (ZrO_2)[3]. (Figura 1.4).



Figura 1.4: Ejemplos de cerámicas inertes, alúmina (izquierda) y zirconia (derecha)

1.3.2. Biocerámicos biodegradables o reabsorbibles: Son aquellos que, al ser implantados, se disuelven con el tiempo y son reemplazados gradualmente por el tejido natural. Estos materiales deben tener una composición que contenga solo elementos fácilmente metabolizables por el organismo como es el Ca, P, H_2O y CO_2 . Uno de los pocos biocerámicos que cumple parcialmente estas características es el fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2/\beta\text{-TCP}$). [3,21] (Figura 1.5).



Figura 1.5: Aspecto clínico del $\beta\text{-TCP}$ [22]

1.3.3. Biocerámicos bioactivos: se caracterizan por la unión directa del biomaterial al hueso sin formación de tejido conectivo en medio. La interfase adherida al tejido, desarrollada por estos cerámicos bioactivos, posee una gran resistencia a la fractura, de tal manera que la ruptura se produce bien en el implante o en el hueso, pero casi nunca en la interfase. [3] Un ejemplo son los biovidrios, vitrocerámicos, hidroxiapatita y materiales compuestos con actividad superficial.

Dentro de los biocerámicos de tipo bioactivo, se encuentra la hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Ésta cristaliza en el sistema hexagonal, grupo de simetría P63/m, con valores de red $a = b = 9,432 \text{ \AA}$ y $c = 6,88 \text{ \AA}$. La misma, [3] es un fosfato de calcio que tiene una composición química similar al componente inorgánico del hueso y dientes. Con una relación molar (Ca/P) = 1.67. Este material se utiliza actualmente en diversas formas como sustituto óseo, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, bioactividad y osteoconducción. [23,24] Sin embargo, el polvo de hidroxiapatita nanoestructurado se ha convertido en uno de los materiales funcionales más útiles en varios campos en los últimos años, [25] debido a su composición y estructura. Posee alta capacidad de intercambio iónico [16] y de adsorción superficial, que resulta de los grupos funcionales superficiales y de su constitución química. Cabe destacar también su capacidad osteoconductor, ésta se debe a que el material puede proporcionar el entramado que facilite la penetración del nuevo hueso en el implante. Un material osteoconductor, puede llegar a ser osteointegrado, si se llega a formar una unión fisico-química entre el implante y el hueso vivo a partir del crecimiento óseo. Para ello se requieren áreas de íntimo contacto, estabilidad primaria y material bioactivo y compatible con el hueso. Es importante el papel que tiene la hidroxiapatita como componente de los materiales compuestos para la regeneración ósea, como fase bioactiva. [26–29] En el Capítulo III se desarrolla este tema de forma más detallada.

1.4. Motivación de este trabajo de tesis

En la ciencia de los materiales se conocen diversos métodos que permiten la obtención de materiales nanoparticulados, con poros de tamaño controlados y con características superficiales específicas. Dentro de esta gran área de trabajo, la síntesis por sol-gel es uno de los métodos más atractivos, debido a la fácil implementación para la fabricación de materiales monofásicos o compuestos [30]. Esta técnica permite obtener diferentes fases en condiciones suaves de síntesis, como así también facilita la inclusión de diversos aditivos, mediante los cuales es posible

otorgar propiedades específicas al material final. Una de las etapas críticas de esta metodología es la del secado del material en su condición de gel, que es una red interconectada de partículas sólidas que forman una entidad continua a lo largo de una fase secundaria, generalmente líquida.

Por otro lado, la tecnología de fluidos supercríticos brinda opciones para el procesamiento de diversos materiales, entre ellos el secado de geles obtenidos por sol-gel. Esa tecnología no convencional, permite preservar la nanoestructuración de los materiales desarrollados por sol-gel y, además, facilita la funcionalización. [31,32]. En particular, el empleo de dióxido de carbono en condiciones supercríticas (CO₂-SC) como solvente para diversos procesos es considerado un “proceso limpio” (o green process) debido a las características del CO₂-SC. [33]

Por ello, la motivación de este trabajo de tesis se centra en la integración de metodologías de síntesis para el desarrollo de biomateriales cerámicos útiles en el área de regeneración de tejido óseo. El presente trabajo, se enfoca en la obtención de sistemas compuestos nanoestructurados de dióxido de titanio (material bioinerte) e hidroxiapatita (material bioactivo) mediante la integración de técnicas como: síntesis hidrotermal, síntesis sol-gel y secado supercrítico de geles.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo general

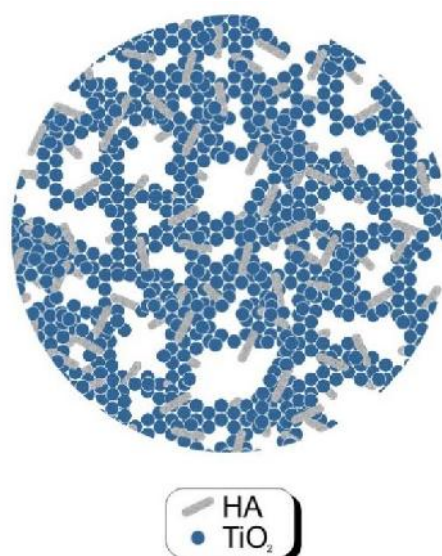
Desarrollar materiales compuestos nanoestructurados porosos de dióxido de titanio e hidroxiapatita (TiO_2 -HA) mediante la integración de metodologías de síntesis y procesamiento que contemplan procesos a alta presión.

1.5.2. Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas de HA por el método hidrotérmal, utilizando aditivos con el objeto de controlar la morfología de las partículas y evitar la formación de aglomerados.
- Sintetizar y procesar geles precursores TiO_2 y de sistemas compuestos TiO_2 -HA para lograr microestructuras homogéneas de porosidad abierta y poros de tamaño controlado.
- Estudiar el proceso de secado de geles precursores de TiO_2 y de sistemas compuestos TiO_2 -HA con dióxido de carbono en condiciones supercríticas.
- Evaluar procesos que utilicen dióxido de carbono en estado supercrítico para desarrollar materiales basados en TiO_2 -HA funcionalizados de alto valor agregado y de interés tecnológico.
- Evaluar las características estructurales, morfológicas, mecánicas y biológicas de los materiales obtenidos.

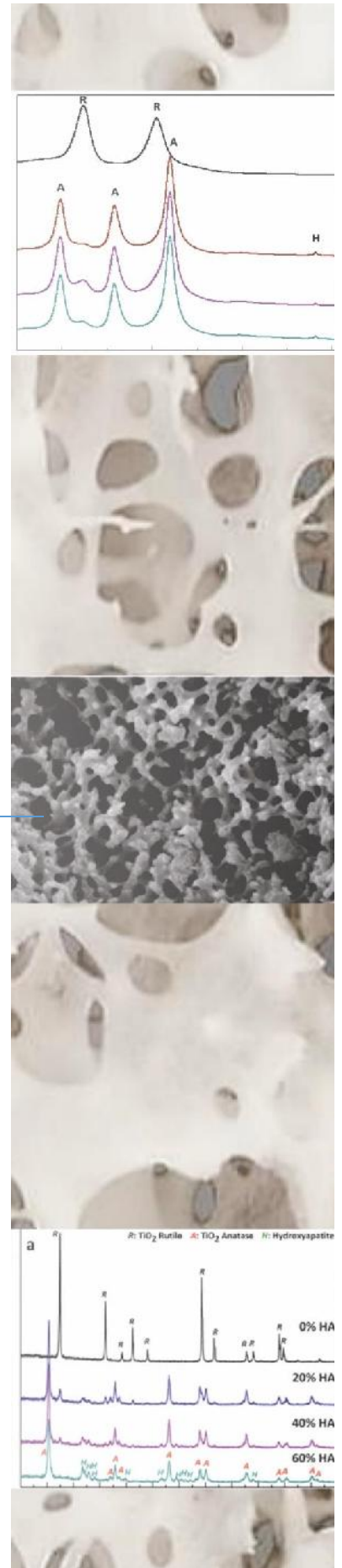
1.6. HIPÓTESIS GENERAL DEL TRABAJO

Como hipótesis general del trabajo, se plantea aprovechar la morfología controlada de las partículas de HA obtenidas por el método hidrotérmal para generar superficies de HA con hidroxilos superficiales activos. Estas funcionalidades hacen posible que los alcóxidos de Ti y las cadenas de Ti-O-Ti originadas a partir de la hidrólisis y condensación de estos precursores, puedan unirse químicamente a la superficie de las partículas de HA. De esta manera se logra un gel precursor compuesto de TiO₂-HA con una óptima dispersión a escala nanométrica. Los geles compuestos pueden ser secados utilizando CO₂-SC, empleando un disolvente adecuado que permita mantener la estructura porosa. Adicionalmente, agentes generadores de poros, incluidos en la composición del gel, pueden permanecer uniformemente distribuidos en éste para luego ser eliminados durante el proceso de secado mediante CO₂-SC. En consecuencia, ajustando las condiciones de síntesis y procesamiento se obtiene un material monolítico compuesto formado por la distribución homogénea de HA en TiO₂ con una microestructura porosa a escala nano y micrométrica obtenida por medio del control de los parámetros de secado con CO₂-SC.



Capítulo II

Técnicas de análisis y caracterización



En este capítulo se describen las técnicas y métodos empleados durante el desarrollo de este trabajo de Tesis que permitieron la caracterización de los reactivos utilizados y de los materiales obtenidos en cada etapa del proceso de síntesis.

2.1. Difracción de rayos X de polvos (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica versátil y no destructiva, comúnmente empleada para determinar la composición química y la naturaleza cristalográfica de un material. Los rayos X son una clase particular de radiación electromagnética de energía elevada, cuya longitud de onda es del orden de los espaciados interatómicos existentes en los materiales sólidos. Consiste en la incidencia de rayos X de forma angulada sobre la muestra y un detector coordinado para estar en un ángulo congruente. Así, se busca el ángulo en el cual la difracción de la radiación incidente causa una interferencia constructiva.

Esta técnica fue utilizada para identificar las fases cristalinas de los reactivos de partida en la síntesis de hidroxiapatita (Capítulo IV), para analizar la cristalinidad de la HA obtenida y el tamaño de cristal (Capítulo IV), así como también para analizar las fases cristalinas presentes en los materiales obtenidos de TiO₂-HA (Capítulo VI).

Los análisis de las muestras en polvo se realizaron utilizando un difractómetro PANalytical con radiación de Cu-K α (longitud de onda $\lambda = 1,54050 \text{ \AA}$) a 40 kV y 30 mA. Los difractogramas se registraron entre 20° y 80° 2 θ a una velocidad del goniómetro de 1°/min. El tamaño de cristal promedio (τ) de las partículas, se calculó a partir de la medida de ensanchamiento de la línea de DRX usando la ecuación de Scherrer:

$$\tau = \frac{0,9\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde τ es el tamaño del cristal de la HA sintetizada, λ es la longitud de onda (Cu-K α), β es el ancho total en la mitad del máximo pico (002) y θ es el ángulo de difracción correspondiente.

2.2. Método Rietveld

Este método es un procedimiento para refinar estructuras cristalinas usando datos de difracción de rayos X. El mismo requiere del conocimiento previo aproximado de la estructura cristalina de todas las fases de interés que aparezca en el patrón de difracción. Consiste básicamente en ajustar los parámetros estructurales o parámetros de red teóricos, deslizamientos atómicos, anisotropía,

tensiones de la red, entre otros, así como los experimentales, que dependen de las condiciones de experimentación, al perfil completo del difractograma, suponiendo que el difractograma es la suma de un número de reflexiones de Bragg centradas en sus posiciones angulares respectivas. Luego los parámetros escogidos van siendo ajustados en un proceso iterativo hasta que se alcanza una condición de convergencia con los valores de las intensidades experimentales y el modelo teórico.

Para realizar el refinamiento de la estructura por el método Rietveld, se evaluó la cristalinidad de las fases por difracción de rayos x (DRX) usando Empyrean PANalytical diffractometer, equipado con monocromador de grafito, usando Cu K α radiación ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) at 40 kV and 40 mA. Todos los difractogramas fueron obtenidos en el rango de 20° a 80° (2θ) con tamaño de paso de 0.02° y un tiempo de 4 segundos,

2.3. Espectroscopia Raman

Es una técnica espectroscópica empleada para el análisis de prácticamente cualquier material, ya sea orgánico o inorgánico. Se basa, en la incidencia de un haz de luz monocromático (de frecuencia ν_0), dispersándose de manera elástica (dispersión Rayleigh) en su mayor parte, pero existiendo una cantidad de luz que ha sido dispersada inelásticamente, y por tanto presenta un cambio en su frecuencia. Estos cambios en la frecuencia son característicos de la naturaleza química y del estado físico de la muestra, y por tanto son los datos que permiten identificar distintos compuestos y características moleculares. Una de sus principales ventajas radica en que no es necesaria ninguna preparación de la muestra a estudiar y que se trata de un proceso no destructivo.

El análisis de espectroscopia Raman se llevó a cabo en un instrumento Renishaw In Via Reflex multicanal. La excitación fue proporcionada por línea de 785 nm de un láser Ar. Para mejorar la relación señal-ruido, se acumularon 3 barridos para la HA sintetizada y para los sistemas compuestos de TiO₂-HA, cada uno con una exposición de 15 s (HA) y 10 s (TiO₂-HA) a la potencia del láser que oscila entre 30 y 300 mW. Esta técnica contribuyó a la identificación de grupos funcionales de las fases de HA y TiO₂ en los materiales obtenidos y a la interacción entre ambas fases (Capítulo VI).

2.4. Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica de análisis cualitativo para la identificación de compuestos. La misma brinda información de la naturaleza de los grupos funcionales moleculares, y también ofrece datos vinculados a la estructura de las especies presentes en una muestra. Para esto, la técnica se basa en el uso de luz infrarroja que se produce entre 0,7 y 500 μm en el espectro electromagnético entre las regiones visible y microondas. Cuando dicha luz interactúa con una molécula, esta última se excita a un estado vibracional más alto debido a la absorción de energía; donde la longitud de onda de la luz absorbida por una molécula particular es una función de la diferencia de energía entre los estados vibracionales en reposo y excitados. Siendo, la longitud de onda absorbida por una muestra dada característica de su estructura molecular. La interpretación de los espectros FTIR se lleva a cabo comúnmente a través de los parámetros que caracterizan a las bandas de absorción, es decir, frecuencia e intensidad.

Con el fin de evaluar por FTIR los grupos funcionales y cambios estructurales de la HA sintetizada y de los sistemas de TiO_2 -HA obtenidos (Capítulo III y VI) se realizaron análisis en un Espectrofotómetro infrarrojo (FTIR) con accesorios, Nicolet 6700, Thermo Scientific en el modo de transmisión dispersando la muestra en KBr. Cada espectro se obtuvo a partir de 40 barridos con una resolución de 2 cm^{-1} en el rango de 4000 a 400 cm^{-1} .

2.5. Determinación de tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz.

La dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés Dynamic Light Scattering) es una técnica no invasiva para determinar el tamaño y distribución de partículas en el rango submicrónico. La aplicación típica de la DLS es la caracterización de partículas, emulsiones o moléculas que se han dispersado o disuelto en un líquido determinado. El mismo mide la velocidad del movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de la partícula, haciendo que la luz de un láser se disperse en diferentes intensidades, a partir de lo que se determina el coeficiente de difusión traslacional (D) que está relacionado con el tamaño de partícula por la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = kT/6\pi\eta d(h)$$

Donde

$d(h)$ = diámetro hidrodinámico

k = constante de Boltzman ($1,38 \times 10^{-23}$)

T = temperatura absoluta

h =viscosidad del medio dispersante

D = coeficiente de difusión traslacional

El movimiento browniano es un movimiento al azar de las partículas debido al “golpeteo” de las moléculas del solvente alrededor de ellas. A mayor tamaño, menor movimiento. La velocidad del movimiento browniano se define por una propiedad conocida como coeficiente de difusión traslacional, el cual no solo dependerá del tamaño del núcleo de la partícula sino también de cualquier estructura de superficie, y de la concentración y tipo de iones que se encuentren en el medio.

Esta técnica fue utilizada en esta tesis para determinar la distribución de tamaños de partícula de los polvos de HA sintetizados en el Capítulo III. Para ello, se empleó un equipo Malvern Zetasizer nano S90 con un láser de 532 nm. Los polvos fueron dispersados en alcohol isopropílico (5 µg en 10 mL) y la suspensión fue agitada por 2 h con punta ultrasónica antes de cada medición.

2.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía SEM es una de las técnicas más usadas para la caracterización de la microestructura de materiales. Las imágenes proporcionadas por el microscopio electrónico de barrido se obtienen a partir de las señales emitidas por la muestra y se forma a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido (scanning) se realiza línea por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular. Esta zona es la que se visualiza amplificada en la imagen final. A medida que el haz explora la muestra de esta manera la intensidad de la señal generada varía según el punto particular analizado en cada instante. La señal detectada puede ser entonces analizada y amplificada, tanto en su forma analógica como digital, y finalmente procesada convenientemente.

Esta técnica ha sido utilizada para caracterizar la morfología y el tamaño de las partículas obtenidas de HA (Capítulo III). Además, permitió revelar la microestructura desarrollada en los materiales compuestos porosos de TiO₂-HA obtenidos (Capítulo V). Los análisis fueron realizados en un microscopio Jeol JXA-8600, previo recubrimiento de las muestras con una delgada película conductora de oro/paladio.

2.7. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Esta técnica se basa en los mismos principios físicos involucrados en la microscopía SEM, sin embargo, en este caso las muestras analizadas deben tener espesores relativamente pequeños para permitir la transmisión de los electrones. El análisis del haz transmitido es lo que permite finalmente la obtención de las imágenes digitales de la muestra. Esta técnica es particularmente útil para obtener información sobre el tamaño y la forma de las partículas que conforman la microestructura de un determinado material en la escala de los diámetros atómicos, así como también para la detección de defectos atómicos en áreas de unos pocos nanómetros de radio.

En este trabajo la microscopía por transmisión fue utilizada para el análisis morfológico de las partículas de HA (Capítulo III). Para ello se utilizó un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 200CX. Las muestras en polvo se dispersaron sobre una película de carbono soportada por una malla de cobre para su análisis. Las micrografías fueron tomadas utilizando un voltaje acelerador de 100 kV.

2.8. Análisis térmico: Gravimétrico (TGA) y diferencial (DTA)

Un análisis Termogravimétrico (TGA) comprende el estudio de la evolución de las propiedades de una muestra cuando es sometida a un programa de temperaturas en una atmósfera controlada. Las variaciones registradas pueden deberse a una pérdida de masa o una ganancia de masa. La información que se obtiene de esta técnica permite:

- A.** Conocer el intervalo de estabilidad térmica de los materiales.
- B.** Conocer, mediante el uso de una atmósfera controlada, las condiciones en que se oxidan o se degradan.
- C.** Determinar la cinética de una reacción.

En el Análisis Térmico Diferencial, en cambio se mide la diferencia de temperatura entre la muestra y un material de referencia (térmica, física y químicamente inerte) en función del tiempo o de la temperatura cuando dicha muestra se somete a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. Es una técnica cualitativa que indica la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en estudio y si el proceso es endotérmico o exotérmico.

En el caso de que ocurra un proceso endotérmico ($\Delta H > 0$, por ejemplo, la fusión de un metal), la temperatura de la muestra, T_s , sufrirá un retraso respecto a la de la referencia, T_r , mientras continúa el programa de calentamiento. Si ocurre un proceso

exotérmico en la muestra ($\Delta H < 0$, por ejemplo, la oxidación de un metal), la respuesta será en sentido contrario.

Esta técnica fue empleada para observar los cambios de masa en los geles de TiO_2 y sistemas compuestos de TiO_2 -HA (Capítulo IV) a medida que aumenta la temperatura. También se realizaron análisis sobre las muestras secadas con CO_2 supercrítico que brindaron información sobre cambios de fases presentes en los materiales.

2.9. Métodos Reológicos

Un parámetro relevante en el procesamiento sol-gel es la viscosidad, que es función del tiempo y está relacionada al tamaño de los *clusters*; cuanto mayor es su tamaño, mayor es la viscosidad. Generalmente, se emplea el cambio repentino en la viscosidad para identificar el tiempo de gelación (t_g).

Un método para medir el t_g es a partir de la respuesta viscoelástica del sistema medida con un viscosímetro de brecha angosta cuyo cilindro oscila a determinada frecuencia. El método se basa en la medición de las componentes del módulo de corte complejo, G :

$$G = G'(\omega) + i G''(\omega)$$

El módulo de almacenamiento, G' , asociado a los efectos elásticos (relacionado a la energía almacenada durante la deformación), y el módulo de pérdida, G'' , asociado al efecto viscoso (relacionado con la energía disipada durante la deformación). G' provee información acerca de la estructura de la red y su evolución sirve para seguir la cinética de gelación. En este contexto, se tiene que a muy baja frecuencia G'' es mucho mayor que G' , por lo que predomina el comportamiento viscoso de un líquido. Al aumentar la frecuencia o tiempo, las curvas de G' y G'' se cruzan y empieza a dominar el comportamiento elástico típico de un sólido.[34] (Figura 2.1).

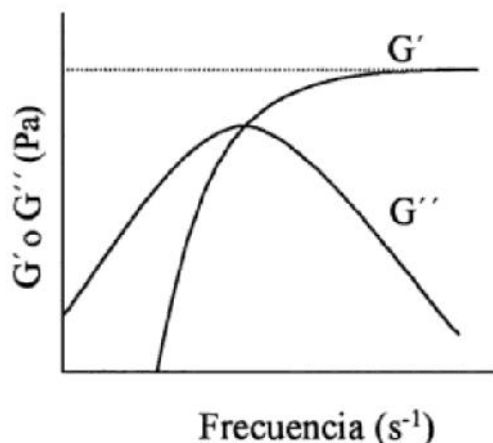


Figura 2.1 Diagrama esquemático del módulo de almacenamiento, G' , y de pérdida G'' , vs. La frecuencia (S^{-1})[34]

En este trabajo de tesis se realizaron medidas de G' y G'' para caracterizar los soles de TiO_2 preparados y los sistemas compuestos TiO_2 -HA. Para ello se utilizó un Reómetro Anton Para Physica MCR 301 con celda Peltier P-PTD 200. Las medidas se realizaron utilizando el modo de platos paralelos de diámetro de 25 mm, con las siguientes condiciones de operación:

DMA: Amplitud gamma = 0,05%

Tgel: Amplitud gamma = 1 %

Frecuencia $f = 1$ Hz

Frecuencia $f = 1$ Hz

FN = 0,5 N

$T[-1] = 20^{\circ}C$

$T[-1] = 20.....70^{\circ}C$ lin; |Rate| = $5^{\circ}C$

Frecuencia: Amplitud gamma = 0,1%

Frecuencia $f = 0,1...100$ Hz log; Slope| = 5

Pt. / dec

FN = 1N

Se prepararon muestras de 1 mL de volumen a partir de las composiciones establecidas para este estudio (según se detalla en el Capítulo IV). Se buscó determinar los puntos de intersección entre las curvas G' y G'' para medir el tiempo de gelado de los distintos sistemas preparados en forma comparativa. Los valores hallados fueron analizados en función del contenido de partículas de HA agregado en los soles de TiO_2 .

La preparación de muestra se realizó minutos antes de la medida, para ello se consideró un volumen final de sol de 1 mL, donde el alcóxido de titanio se mezcló con la suspensión que contenía el solvente, el agua, el porógeno y las partículas de HA con ayuda de una pipeta Pasteur. Posteriormente, se procedió a la adición de la mezcla en el disco oscilatorio que ya poseía la amplitud requerida.

El hecho de preparar la muestra en el momento de hacer la medida y la poca cantidad de esta da lugar a tiempos de gelación menores que los registrados en las preparaciones comunes que se hicieron en el laboratorio bajo atmósfera controlada. Además, la dificultad para colocar siempre una cantidad exacta en el plato nos da solo un indicio de los tiempos de gelado de los sistemas. Así, las medidas registradas no son asignadas a los geles preparados, sino utilizadas de manera comparativa.

2.10. Nanoindentación

La nanoindentación es una técnica de caracterización muy particular debido a su capacidad para determinar propiedades mecánicas a escala submicrónica. Una prueba de nanoindentación es en principio similar a la dureza tradicional ya que una punta dura se pone en contacto con el material a ensayar. Si bien, la dureza tradicional provee solamente un único valor de deformación a una determinada carga, la nanoindentación posee la capacidad de monitorear en forma continua la carga aplicada y el desplazamiento de la punta durante la penetración. Esto permite determinar en forma cuantitativa las propiedades mecánicas del material (Módulo de Young (E), dureza (H), resistencia al rayado, fractura, etc.).

Esta técnica fue usada para medir la dureza y el módulo de Young de los materiales obtenidos de TiO_2 y TiO_2 -HA (Capítulo V). Se utilizó un equipo Trinoindenter Hysitron. Para los ensayos de indentación, se definió una carga máxima de 0,5 mN y utilizando un indentador esférico de 500 μm de radio. Todos los ensayos fueron según lo dispuesto en la norma ISO 14577-1. Para los ensayos de *scratch* se determinó una carga normal de *scratch* de 0,5 mN y un indentador esférico de 500 μm de radio. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

2.11. Medidas de densidad aparente

La densidad aparente de una muestra se define como el cociente entre la masa de esta y su volumen (incluyendo el volumen de los poros del material). La densidad aparente puede determinarse por el método de Arquímedes en agua destilada,

utilizando una balanza para registrar la masa en aire y sumergida de las muestras, y calculando la densidad aparente según la siguiente ecuación:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{(m \text{ seca} \cdot \rho \text{ H}_2\text{O})}{(m \text{ húmeda} - m \text{ sumergida})}$$

$$\text{Porosidad abierta} = \frac{(m \text{ húmeda} - m \text{ seca})}{(m \text{ húmeda} - m \text{ sumergida})} \cdot 100$$

Las muestras obtenidas luego del proceso de secado y calcinado fueron utilizadas para la medición de porosidad y densidad. Para las medidas de las masas húmedas, fue necesario dejar las muestras por 24 h en agua para conseguir la saturación de los poros.

2.12. Ensayos de adhesión celular

Los materiales para aplicaciones médicas deben ser biocompatibles o biológicamente aceptables. La biocompatibilidad se define como la capacidad de un determinado material para dar una respuesta biológica apropiada en una aplicación específica. Esta propiedad se ve directamente afectada por las características superficiales del biomaterial, como así también por las propiedades fisicoquímicas y mecánicas. La descripción de la interacción entre las células óseas y la superficie del material es un aspecto fundamental para evaluar la aptitud del material como soporte para la osteogénesis. En este trabajo se realizaron ensayos de adhesión y proliferación celular para evaluar en forma comparativa la respuesta biológica de los materiales desarrollados.

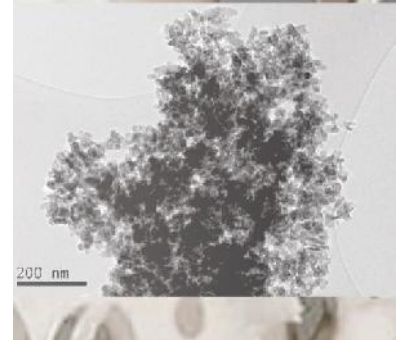
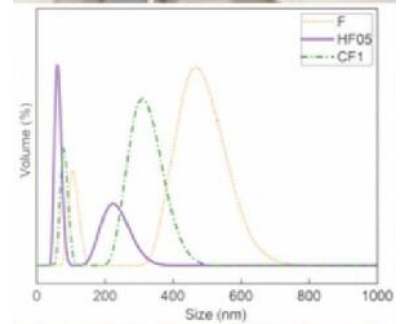
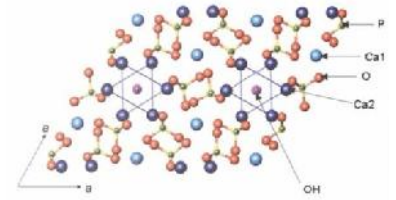
Para los ensayos de adhesión y proliferación celular, se utilizó una línea celular de osteosarcoma humano. Las células MG63 (ATCC CRL1427) fueron cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle (MEM, Gibco), suplementado con 100 mL/L de suero fetal bovino (Natocor), 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 100 UI/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina (Gibco). Se incubaron a 37 °C, en una atmósfera humidificada y con 5 % de CO₂.

Ensayo de adhesión: Para la realización de los ensayos, se tripsinizaron mococapas confluentes de células MG-63, crecidas en botellas de 25 cm³, y se agregó parte de la suspensión celular sobre las pastillas del material contenidos en material

para cultivo. Se permitió la sedimentación y adhesión de estas sobre la superficie del material y se incubaron en una estufa a 37 °C, en una atmósfera humidificada y con 5 % de CO₂ durante 48 horas. Luego de la incubación, las células se lavaron 2 veces con PBS y se fijaron con glutaraldehído 2% en PBS. Se dejaron en el fijador y almacenaron en la heladera por 24 horas. Cada pastilla fijada se lavó 3 veces con PBS durante 10 minutos y se deshidrataron en serie creciente de EtOH (30°, 50°, 70°, 90°, 96° y tres veces en 100°), incubando 10 minutos por cada deshidratación. A cada pastilla se le agregó HMDS (hexametildisilazano) y se dejó evaporar toda la noche bajo campana. Se realizó el metalizado de cada pastilla con oro en atmósfera de Argón y se visualizaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido.

Capítulo III

Síntesis hidrotermal de hidroxiapatita



3.1. INTRODUCCIÓN

Los fosfatos de calcio (CaP) son los llamados cerámicos bioactivos, ya que se fijan químicamente al hueso y, además son uno de los mayores constituyentes del hueso y dientes de vertebrados. Son utilizados en aplicaciones biomédicas, porque sus propiedades químicas, físicas y estructurales son semejantes a las propiedades del hueso. Presentan excelentes propiedades de biocompatibilidad y bioactividad, sin embargo, las únicas fases de fosfatos de calcio que son estables a la temperatura y pH del cuerpo humano son la hidroxiapatita (HA) y el fosfato de calcio dibásico (DCP). El pH del medio determina la presencia de una u otra fase; la HA es estable para $\text{pH} > 4.2$ (dentro del cual se encuentra el pH del cuerpo humano), y el DCP es estable en medios ácidos ($\text{pH} < 4.2$).

En el presente trabajo nos centraremos en la obtención de HA. La misma está formada por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, cuya estructura química es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con una relación molar $(\text{Ca}/\text{P}) = 1,67$. Presenta carácter iónico y su estructura cristalina puede describirse como un empaquetamiento hexagonal compacto de átomos de oxígeno, con los metales ocupando los huecos tetraédricos y octaédricos de la red periódica así formada (grupo espacial P63/m). Figura 3.1 [3,35]

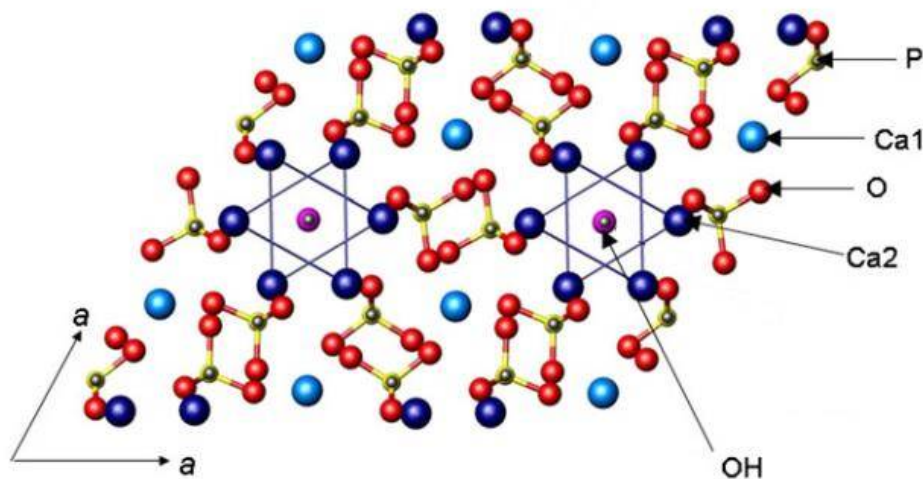


Figura 3.1. Proyección de la estructura cristalina de la hidroxiapatita en un plano.

Este material se utiliza actualmente como sustituto óseo, debido a sus propiedades de biocompatibilidad, bioactividad y osteoconducción [23,24]. El polvo nanoestructurado de HA, se ha convertido en uno de los materiales funcionales con mayor uso en los últimos años [25], gracias a su composición, estructura, alta

capacidad de intercambio iónico [16] y su capacidad de absorción superficial que resultan de sus grupos superficiales y composición química. Los nano polvos de hidroxiapatita se utilizan generalmente en la liberación de fármacos [36–38], purificación de proteínas [39], eliminación de contaminantes orgánicos e inorgánicos del agua [40] y como componentes de los materiales compuestos para la regeneración ósea, donde desarrollan un papel clave como fase bioactiva [26–29].

En la actualidad se conocen diversos métodos para la obtención de cristales de HA, tales como: los mecanoquímicos [16,41], sol-gel [16,42], precipitación química [16,43], hidrotérmicos [24,44–46], microemulsión [47], irradiación ultrasónica [48] e irradiación de microondas [49]. Entre ellos, el método hidrotermal es apropiado para la síntesis de nanopartículas de HA dado que permite sintetizar en una sola etapa una fase determinada en condiciones de reacción relativamente moderadas, como así también, modificar la morfología y el tamaño de los cristales obtenidos mediante el uso de diversos aditivos [50]. Este proceso consiste en la reacción o transformación de precursores en presencia de un solvente (agua) en un sistema cerrado a temperatura superior a la de ebullición del solvente, el cual, a temperaturas moderadas de síntesis, permite obtener polvos cerámicos con tamaños de partículas inferior a 1 μm , distribuciones estrechas de tamaños de partículas, entre otras posibilidades.

Síntesis hidrotermal

El término hidrotermal es de origen geológico, su empleo ha estado siempre unido a compuestos de origen natural formados a partir de soluciones acuosas a altas presiones y temperaturas en presencia de sustancias mineralizadoras. Con ello se consiguen disolver y recrystalizar materiales que son muy poco o nada solubles en condiciones normales. En general, la síntesis hidrotermal se basa en una relación heterogénea en medio acuoso a temperatura superior a la de ebullición del disolvente y presión superior a la atmosférica.

Los recipientes empleados para esta síntesis se conocen como autoclaves, y generalmente son de acero con interior de teflón. Las características principales que tienen son:

- Resistencia frente a ácidos, bases y agentes oxidantes
- Fácil de abrir y cerrar
- Herméticos
- Versatilidad en el rango de presión y temperatura a utilizar

En la síntesis hidrotermal se llevan a cabo principalmente dos tipos de reacciones químicas como la hidrólisis, formación de complejos, y reacciones de oxidación y reducción. Las síntesis se realizan usualmente a la presión de vapor de la mezcla de reacción a la temperatura del proceso, aunque también puede incrementarse la presión externamente para controlar la solubilidad o la velocidad de crecimiento de monocristales. Los precursores se administran en la forma de soluciones, geles o suspensiones y, la solubilidad de aquellos compuestos poco solubles en agua, o insolubles incluso a temperaturas elevadas, puede incrementarse mediante el uso de agentes mineralizantes. La presión y la temperatura durante el proceso determinan las propiedades del solvente y su interacción con los precursores. Densidad y viscosidad son parámetros que cambian notablemente y que modifican la difusión y la reactividad de las especies involucradas. En función de sus propiedades físico-químicas, el solvente determina la fase que habrá de cristalizar. Asimismo, la composición del medio de reacción tiene influencia sobre la morfología de las partículas y reacciones de óxido-reducción [51].

Otro de los aspectos relevantes de la síntesis hidrotermal es que se pueden obtener nanopartículas con diferentes morfologías como esferas, agujas, varillas, fibras y placas (Figura 3.2). Dichas morfologías se logran mediante la variación de las condiciones de reacción o la utilización de aditivos adecuados, que permitan controlar y guiar el crecimiento de los cristales. Entre estos, encontramos el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) un surfactante catiónico biocompatibles que puede ser usado como aditivo en algunos métodos de síntesis acuosa [52,53]. El CTAB se ioniza en una solución acuosa que genera monómeros cargados positivamente y que se auto ensamblan en micelas que actúan como sitios de nucleación para iones $(\text{PO}_4)^{3-}$ e iones Ca^{2+} en su superficies, generando cristales de HA a través de un proceso de precipitación [54]. Y. Wang *et al.* sintetizaron nanopartículas de HA con morfología uniforme y tamaño controlado (tamaño medio aproximadamente de 15x150 nm) por el método hidrotermal a bajas temperaturas en presencia de CTAB [53]. También, Yang *et al.* prepararon partículas de HA con diferente morfología como coloide tipo esfera, *nano-needle* similar a *lamellar-like* usando CTAB/Citrato en diversas concentraciones [52].

Por otro lado, la hexametilentetramina (HMTA) es un compuesto con una estructura similar a una jaula, como ligando presenta una gran versatilidad permitiendo diferentes modos de coordinación. La HMTA es soluble en agua y disolventes orgánicos polares y es muy buen aceptor de enlaces H [55]. Esta, es una amina alifática cíclica $(\text{CH}_2)_6\text{N}_5$ que se ha empleado para síntesis de algunos

cerámicos nanoestructurados. Sin embargo, rara vez se ha utilizado para la síntesis de HA; se podría decir que la publicación de Andrés-Vergés *et al.* es la primera evidencia del uso de HMTA en la síntesis de HA en medio acuoso a 90 °C [56]. El interés principal de HMTA reside en su actividad generadora de aniones hidróxido, puesto que produce amoníaco (junto con formaldehído) por medio de una reacción de hidrólisis que tiene lugar en las condiciones hidrotérmicas, elevando gradualmente el pH en el medio de reacción [57–59]. Aunque no se ha demostrado claramente cómo actúa la HMTA en el medio de reacción, es posible que pueda tener un papel como agente de dirección de estructura.

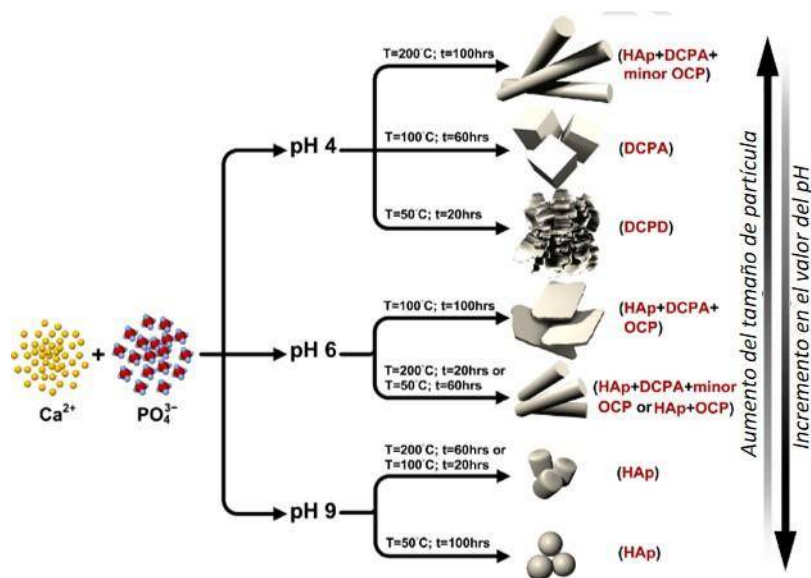


Figura 3.2. Efecto del pH, temperatura, y duración del tratamiento hidrotérmico sobre la fase, morfología y tamaño de las partículas de fosfatos de calcio [16]

Otra de las variables importantes a tener en cuenta en la síntesis hidrotérmica, y que se le ha dado poca relevancia es la velocidad de enfriamiento [60]. Sin embargo se ha demostrado que el enfriamiento rápido conduce a partículas de tamaños más pequeños y con mayores concentraciones de defectos superficiales [61]. Asimismo, el grado de cristalinidad del material será afectado por la creación de defectos superficiales; se espera que el enfriamiento rápido aumente la capacidad de biointegración de las nanopartículas de HA sintetizadas en condiciones de reacción hidrotérmica.

Recientemente, se han reportado trabajos que sintetizan nanopartículas de hidroxiapatita modificando el tipo de aditivos o componentes en el medio de reacción de modo de controlar el tamaño y la morfología de las partículas. V.R. Sivaperumala *et al.* [62] proponen una síntesis hidrotérmica para la obtención directa de nanocompuestos de hidroxiapatita y alúmina en diferentes concentraciones. Los autores encontraron que los nuevos materiales son estables a temperaturas mayores

a 900 °C y no se observa una descomposición de HA a fosfato tricálcico. Los materiales finales presentaron una morfología de nanovarillas (*nanorods*) de aproximadamente 100 nm, biocompatibilidad con células osteoblásticas (MG63 cell), una dureza y módulo de Young adecuados para su implementación en aplicaciones de ingeniería de tejidos [62].

En la tabla 3.1 se resumen trabajos publicados en los últimos años sobre síntesis de HA por el método hidrotermal, donde se obtienen partículas de diferentes tamaños o morfologías dependiendo de los parámetros de reacción y/o la inclusión de aditivos. En esta línea de investigación, el presente trabajo pretende aportar al desarrollo de nanocompuestos de HA y TiO₂ mediante el control morfológico de las nanopartículas de HA, con el fin de lograr una mayor unión entre las fases componentes que permitan desarrollar una superficie bioactiva en el material poroso final.

Tabla 3.1: Trabajos de los últimos años de síntesis de HA por el método hidrotermal

Año	Condiciones de reacción					Características del polvo			Ref.
	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	pH	Aditivo	Relación Ca/P	Morfología	fase	Tamaño	
2002	150	24	-	-	1,58 - 1,62	Fibras	HA - CaHPO ₄	150 µm	[23]
2004	120 y 180	6	7	-	-	Platos	HA	-	[63]
2006	60 - 150	12 - 24	12	CTAB	1,67	Tipo Vara	HA	15x150 nm	[53]
2009	90	6 - 72	8,1 - 8,5	Urea	-1,75	Diversas morfologías	HA	-	[50]
2010	180	10 - 15	5 - 7	Acetamida	-1.60	Whiskers-like	HA	-	[64]
2011	160	24	4 - 5	Ácido glutámico	-	Whiskers-like	HA	50 - 100 µm x 0.5 µm	[25]
2014	150 y 180	3-12 -24	9	-	-	Nano varillas	HA	Ø 50 nm	[44]
2016	180	24	-	CTAB Na ₃ (C ₆ H ₅ O ₇) • 2H ₂ O	-	Diversas morfologías	HA	Ø de 4 µm y 50 µm	[52]
2017	220	24	7	C ₄ H ₆ O ₆	1, 67	Placas asimétricas	HA	-	[65]
2018	200	15	11	C ₂₂ H ₄₄ O ₃	-	Varillas	HA	-	[46]

3.2- METODOLOGÍA

Para la síntesis hidrotermal de nanopartículas de HA se empleó un reactor de acero inoxidable con interior de PTFE con control de temperatura y presión ($P_{\text{máx}} = 15$ bar) y un volumen de 100 mL. Se realizaron dos series de síntesis utilizando distintas fuentes de fósforo. En la primera serie se utilizó hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, Merck) y fosfato ácido de calcio (CaHPO_4 , Aldrich), mientras que en la segunda se empleó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y ácido ortofosfórico (H_3PO_4 , 85%, Merck). Se estudió el efecto de la temperatura y de diversos aditivos sobre las características del polvo resultante. Se empleó ácido acético glacial (HAc) para ajustar el pH de soluciones y/o suspensiones. Se emplearon también aditivos tales como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, Cicarelli), Triton X-100 (TTX, Fluka) y Hexametilentetramina (HMTA, Biopack) con el fin de analizar la influencia de éstos sobre el tamaño y morfología de las partículas obtenidas.

3.2.1-MÉTODO 1: *Síntesis de hidroxiapatita a partir de hidróxido de calcio y fosfato ácido de calcio.*

Para la primera serie de síntesis de hidroxiapatita por el método hidrotermal se empleó hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) y fosfato ácido de calcio (CaHPO_4) como precursores; ácido acético glacial (CH_3COOH) como regulador de pH en una relación molar ácido:agua de 50:50 y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) en relaciones 1:1, 1:2 con respecto al Ca^{2+} y 2 % w/v de triton X-100 (TTX) con respecto al volumen final, como aditivos de reacción.

Se prepararon suspensiones por separado de 81000 mmol de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y de 12 mmol de CaHPO_4 en 20 mL de agua destilada respectivamente, se mezclaron ambas suspensiones con agitación constante. Se ajustó el pH de la mezcla a valores de 7 y 9 con ácido acético (un pH 12 corresponde al pH de la mezcla). A continuación, se adicionó agua destilada hasta un volumen total de 80 mL y se transfirió la mezcla a un reactor de acero inoxidable con interior de PTFE. Para evaluar la influencia de la temperatura y del tiempo de reacción, se realizaron preparaciones a 120 y 150 °C y tiempos de 6, 12 y 24 h. Las preparaciones se enfriaron a temperatura ambiente, se filtró el producto obtenido y se lavó con H_2O destilada. El material de cada síntesis se secó en estufa a 60 °C durante 24 h. El esquema general de síntesis se muestra en la Figura 3.3. Finalmente, los materiales en polvos sintetizados fueron caracterizados por diversas técnicas como difracción de rayos X (DRX), espectroscopia Raman y microscopia electrónica de barrido (SEM).

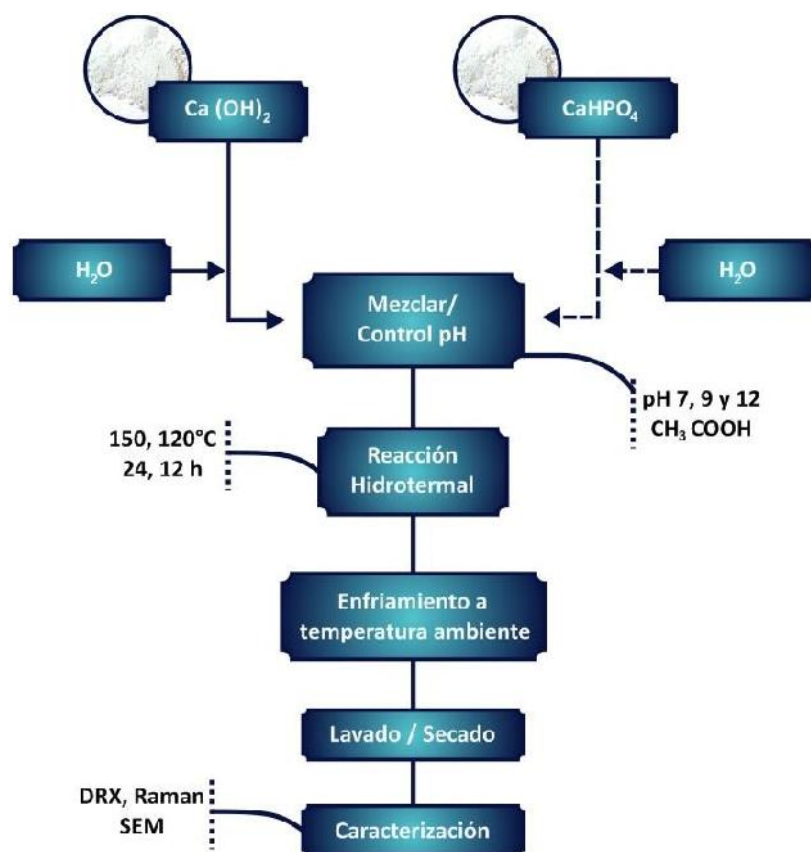


Figura 3.3: Diagrama de flujo para la síntesis de HA método 1

Resultados y discusión

Inicialmente se evaluó la influencia del pH de reacción sobre la obtención de hidroxiapatita. La Tabla 3.2 resume las preparaciones realizadas a 150 °C y 24 h a diferentes pH, en donde se observa la influencia de este sobre las características cristalinas del producto obtenido. La mayoría de las preparaciones mostraron la presencia de productos bifásicos, y varias de ellas la formación de HA.

Los productos obtenidos a pH 7 no mostraron la formación de HA como única fase, esto se asocia a que la presencia de ácido acético contribuye a la disolución completa de CaHPO₄ y se produce la precipitación de HA y de TCP, debido a una relación Ca/P en el medio insuficiente como para precipitar HA únicamente. Esta observación concuerda con lo observado en la preparación efectuada a pH 9 empleando ácido acético, donde se obtuvo HA como único producto, además de la muestra realizada a pH 12 sin ajuste con ácido, donde se encontraron picos característicos de ambos reactivos. Los resultados muestran que la presencia de iones acetato juega un rol clave en la síntesis de la fase de apatita debido a su coordinación con los iones de Ca²⁺ en el medio de reacción.

Tabla 3.2: Variación del pH en la síntesis hidrotérmica de hidroxiapatita.

Parámetros de reacción							Fases cristalinas (DRX)			
#	Ácido usado	pH Inicial	pH Final	T (°C)	t (h)	P (bar)	HA	Ca(OH) ₂	CaHPO ₄	β-TCP
1	CH ₃ COOH	7	4	150	24	11-13	X		escaso	X
2	CH ₃ COOH	9	4				X			
3	sin ácido	12	12					X	X	

La Figura 3.4 muestra los patrones de DRX y los espectros Raman para las muestras obtenidas empleando CH₃COOH para ajustar el pH inicial de mezcla (#1 y 2). Se observa que los patrones de DRX de ambas muestras presentan picos característicos de HA (JCPDS 09-0432); sin embargo, la muestra obtenida a pH 7 también mostró picos a valores de 2θ de 26.4 y 30.2, correspondientes a uno de los precursores (CaHPO₄) y un pico a 34.14 atribuido al β-TCP en correspondencia con los parámetros de red establecidos en las fichas JCPDS 9-0080 y 9-0169 respectivamente.

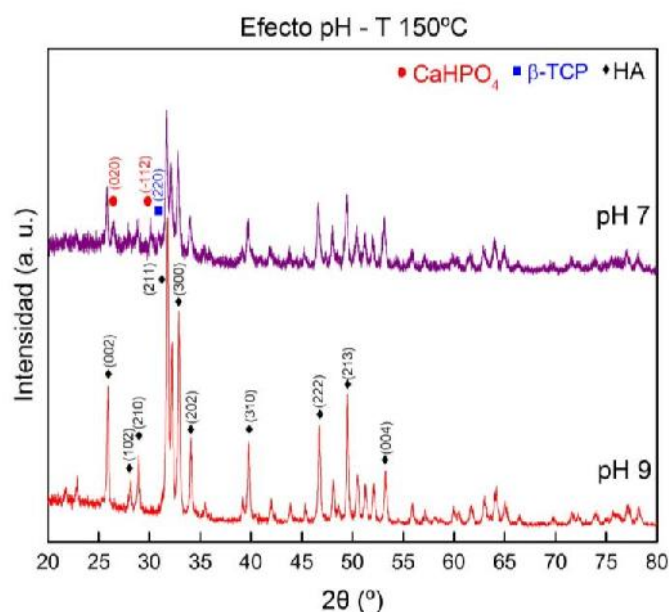


Figura 3.4: Patrones de DRX para los productos obtenidos de las preparaciones #1 (pH 7) y #2 (pH 9).

En la figura 3.5 se muestran los espectros Raman para las muestra 1 (pH7) y 2 (pH9), donde se observa en todos los casos la banda intensa a 961 cm⁻¹ correspondiente al modo de estiramiento simétrico (ν₁) del grupo PO₄³⁻ (enlace P-O) de la fase HA. También se detectan otras bandas de menor intensidad entre 450-431

cm^{-1} , $610\text{-}581\text{ cm}^{-1}$ y $1030\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ atribuidas a los modos de vibración interna de los grupos fosfatos en la fase HA [66].

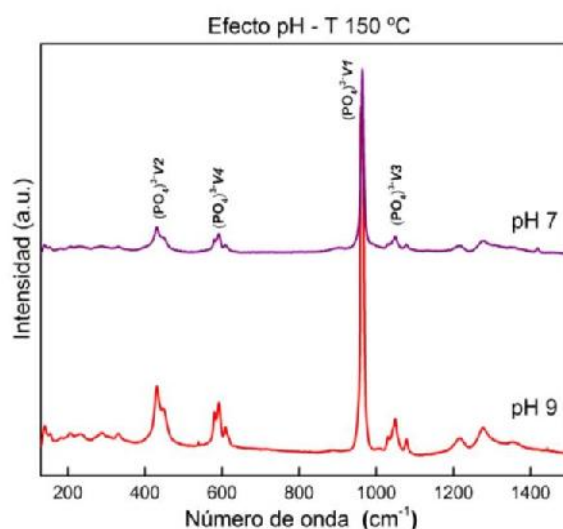


Figura 3.5: Espectros Raman para los productos obtenidos de las preparaciones #1 (pH 7) y #2 (pH 9).

En la Figura 3.6 se muestran las micrografías SEM de los productos sintetizados a pH 7 y 9. Se observa que el pH de síntesis de hidroxiapatita tiene poca incidencia en la morfología y tamaño de partícula, ya que no se evidencian diferencias relevantes. Si bien en el producto obtenido a pH 7 se observa la presencia de algunos cristales tipo varilla, sigue siendo difícil establecer una morfología o tamaño de partícula para estas muestras debido a la aglomeración de estas.

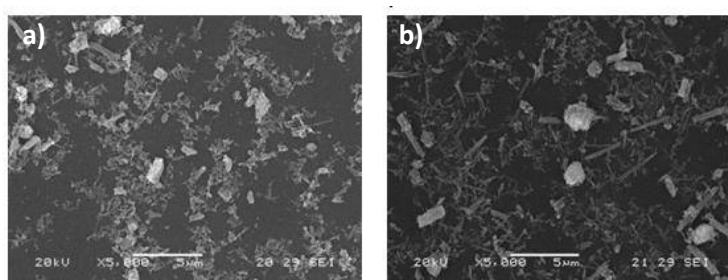


Figura 3.6: Micrografía SEM del producto de la preparación a) #2 (pH 9) y b) #1 (pH 7) a 150 °C

También se llevaron a cabo diversas síntesis a pH 9 y 7 a temperaturas de 120 y 150 °C durante 24 h con el fin de evaluar la influencia de la temperatura sobre la fase, morfología y tamaño del producto obtenido. En la Fig. 3.7 a) se muestran los patrones de DRX para las muestras obtenidas a pH 7, donde se observan señales características de una fase cristalina de HA en todos los casos. Además, se identifican

picos de muy baja intensidad a valores de 2θ de 31,1 y 34,2 que se asignan a la fase de β -TCP (JCPDS 9-0169). Las muestras obtenidas a pH 9 y a 120 o 150 °C, al igual que las de pH 7, mostraron también la presencia de HA y β -TCP (en baja proporción).

La Fig. 3.7 b) muestra los espectros Raman de las muestras sintetizadas a pH 7 a diferentes temperaturas. En todas las muestras se observa una banda intensa a 964 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento simétrico (ν_1) del grupo PO_4^{3-} (enlace P-O) presente en HA. Además, se aprecian bandas de menor intensidad a 610, 592 and 581 cm^{-1} atribuidas al modo flexión antisimétrico (ν_4) de grupo fosfato (enlace O-P-O) y bandas a 450 and 431 cm^{-1} correspondientes al modo flexión simétrico (ν_2) del grupo fosfato (enlace O-P-O). Las muestras a pH 9 con diferentes temperaturas no se presentan ya que muestran picos y bandas características de HA y β -TCP como en el caso anterior (las muestra a 120 y 150 °C tienen un mayor contenido de β -TCP en comparación con la de pH 7 [66]).

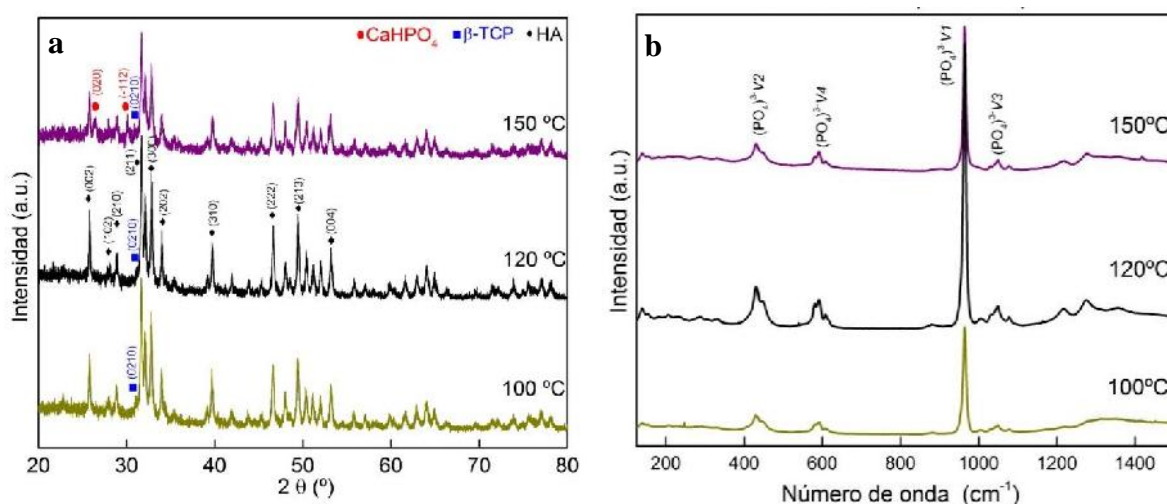


Figura 3.7: a) Patrones de DRX y b) espectros Raman de muestras obtenidas a 100, 120 y 150 °C (pH 7 durante 24 h)

Para evaluar la influencia del tiempo de reacción sobre la obtención de HA, se realizaron síntesis a (pH 7 y 9) durante 6, 12 y 24 h. Ambos pH tienen presencia de una segunda fase, en la Fig. 3.8 muestra los espectros de DRX para las muestras obtenidas a pH 7 donde es posible detectar señales características de la fase de HA en todos los casos. No obstante, se identifican señales debidas a la presencia de β -TCP, que disminuyen a medida que el tiempo de síntesis aumenta, y se observan partículas con diversidad de morfologías. Los espectros Raman de esta serie de muestras presentan bandas características de grupos fosfatos presentes en HA.

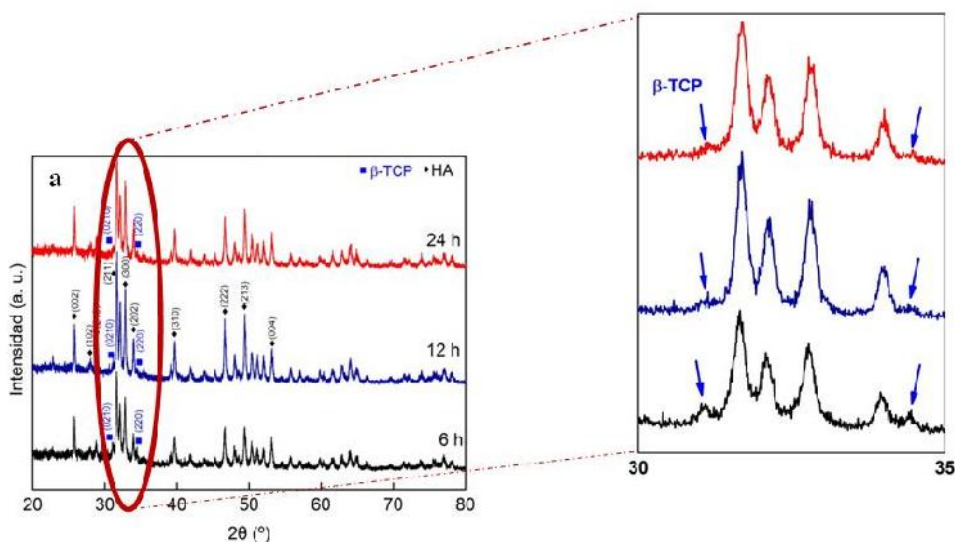


Figura 3.8: Patrones DRX de muestras obtenidas a distintos tiempos de reacción a pH=7.

Finalmente se utilizaron aditivos como bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y Triton X-100 (TTX) en la síntesis de HA para evaluar la influencia sobre la morfología y tamaño de las partículas obtenidas. En una primera etapa se evaluó la influencia de distintas concentraciones de CTAB y TTX. Se observó que el CTAB da lugar a partículas de morfología tipo varilla (Fig. 3.9 a) o bastones (Fig. 3.9 b) cuando aumentamos su concentración. Alta concentración de CTAB en la síntesis da lugar a cristales de forma hexagonal, lo que se asocia a la formación de micelas con forma cilíndrica de diferentes radios, debido a que la concentración del CTAB es mayor que su concentración micelar crítica (CMC) [67].

Por otro lado, el uso de TTX muestra que el tamaño y morfología de las partículas obtenidas es muy diferente respecto del caso anterior. En general, se observan cristales más pequeños (Fig.3.9c) que se encuentran aglomerados (Fig 3.9 d). El TTX en el medio de reacción promueve una reducción en el tamaño de las partículas de HA formadas debido a la interacción de éste con los iones Ca^{2+} formando un complejo, esto conlleva una reducción en la disponibilidad de iones calcio en el proceso de formación de HA [68].



Figura 3.9: Imágenes SEM de muestras sintetizadas a 120 °C y pH 7 con **a)** CTAB/Ca²⁺ (1:1); **b)** CTAB/Ca²⁺ (1:2); **c)** y **d)** con TTX, 2 % m/v.

El agregado de CTAB o TTX en las concentraciones utilizadas no condujo a la formación de cristales de HA de tamaño nanométrico. Por tal motivo se investigó la posibilidad de reducir el tamaño de los cristales obtenidos acondicionando el tamaño de los reactivos de partida. Para ello se procedió a la molienda previa de los reactivos. De esta manera fue posible disminuir el tamaño de las partículas obtenidas, sin embargo, no se logró obtener HA como fase única, ya que la molienda promovió la formación de otras fases en mayor proporción. En última instancia se realizó un tratamiento térmico a 800 °C para la muestra con pH 9 que fue la que presentó HA como única fase, como se observa en el patrón de DRX (Fig. 3.10) al calcinar la HA, la misma da lugar a una segunda fase β -TCP, mostrando picos de esta fase y de HA en proporciones similares, lo que nos indica entonces que la HA obtenida por este método no es apta para la siguiente etapa de este trabajo, ya que los materiales finales requieren de un tratamiento térmico a altas temperaturas. Por lo tanto, estos resultados promovieron la siguiente etapa de síntesis a partir de hidróxido de calcio y ácido ortofosfórico ya que es necesario obtener una HA que resista altas temperaturas sin desproporcionarse después del calcinado.

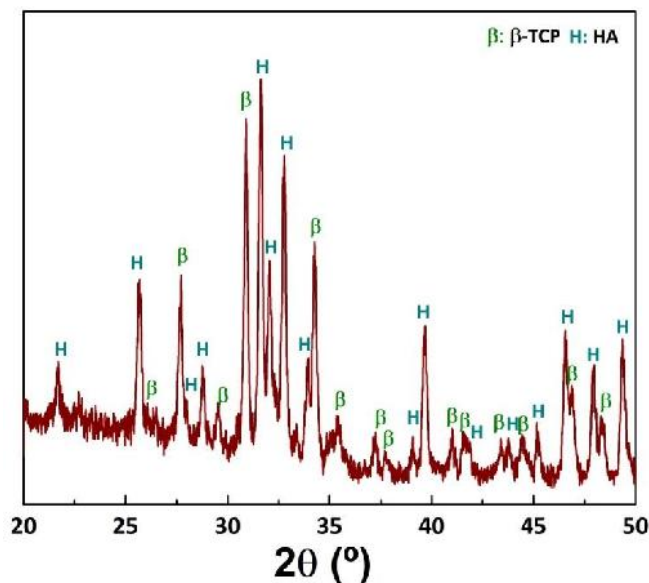


Figura 3.10: Patrón de DRX para la muestra obtenida a pH 9, 150°C por 24 h y calcinada a 800 °C por 1 h.

3.2.2. MÉTODO 2: Síntesis de hidroxiapatita a partir de hidróxido de calcio y ácido ortofosfórico:

En esta segunda serie se utilizó $\text{Ca}(\text{OH})_2$ como fuente de calcio, H_3PO_4 como fuente de fosfato. Las reacciones se llevaron a cabo en un reactor hidrotermal a 120 °C durante 12 o 24 h según corresponda. En primer lugar, se realizaron mezclas de síntesis con exceso de calcio con y sin agregado de aditivos (HMTA y CTAB). En segundo lugar, se analizó la influencia de la velocidad de enfriamiento del sistema de reacción sobre el tamaño y la morfología final de las partículas. Para las reacciones con enfriamiento rápido fue necesaria la construcción de un reactor hidrotermal de acero inoxidable con interior de PTFE.

Síntesis de HA con HMTA (Fig. 3.11 (H)): se prepararon suspensiones acuosas de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con relaciones molares de $\text{Ca}^{2+}/\text{HMTA}$ de 1:0,5, 1:1 y 1:2. Luego se adicionó solución de H_3PO_4 (6 mol/L), se agitó durante 5 min (pH 6) y se llevó el sistema a las condiciones de síntesis (120°C durante 12 h).

Síntesis de HA con CTAB (Fig. 3.11 (C)): se prepararon soluciones de H_3PO_4 (6 mol/L) con dos concentraciones de CTAB: i) concentración micelar crítica (CMC: $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L) y ii) $2 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Cada solución de ácido con CTAB se vertió sobre la suspensión acuosa de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y se agitó durante 5 min (pH 6). Luego se llevó el sistema a las condiciones de síntesis.

La Tabla 3.3 muestra las condiciones de síntesis efectuadas siguiendo el procedimiento descrito anteriormente empleando una relación molar Ca(OH)_2 : $\text{H}_3\text{PO}_4 = 5:3$.

Tabla 3.3. Condiciones de síntesis empleando HMTA y CTAB como aditivos.

Muestra	Aditivo	Relación molar Ca(OH)_2 : Aditivo	Tipo de enfriamiento
F	--	--	Rápido (F)
S			Lento (S)
HF05	HMTA	1:0,5	Rápido (F)
HF1		1:1	
HS05		1:0,5	Lento (S)
HS1		1:1	
CF1	CTAB	1: $1 \cdot 10^{-3}$	Rápido (F)
CF2		1: $2 \cdot 10^{-3}$	
CS1		1: 10^{-3}	Lento (S)
CS2		1: $2,10^{-3}$	

Las síntesis empleando enfriamiento rápido se realizaron sumergiendo el reactor (luego de estar 12 h a 120°C) en un baño de etilenglicol mantenido entre $0-4^\circ\text{C}$. Se estimó una velocidad de enfriamiento de $2^\circ\text{C}/\text{min}$ a partir de la temperatura inicial y final y el tiempo transcurrido en el proceso. En el caso de enfriamiento lento, el reactor se mantuvo 12 horas a 120°C y luego se dejó enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente. En este caso, se estimó una velocidad de enfriamiento de $0,1^\circ\text{C} / \text{min}$ a partir de los datos experimentales.

Además, a modo de referencia, se realizaron mezclas de reacción sin aditivos siguiendo los dos procedimientos de enfriamiento. El pH final medido fue 9 para todas preparaciones. En todos los casos, los productos obtenidos se centrifugaron a 5000 rpm, se lavaron con agua destilada y se secaron a 60°C . Los polvos sintetizados fueron caracterizados por Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopia Raman, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Distribución de Tamaños de Partícula (DLS).

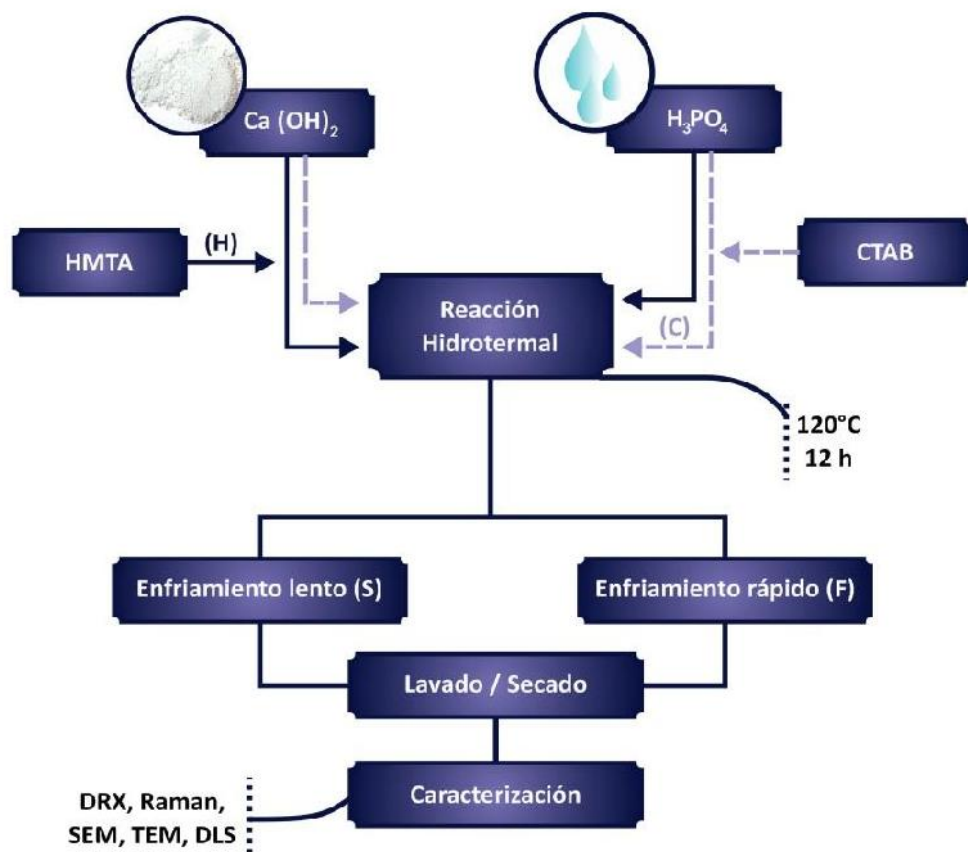


Figura 3.11: Diagrama de flujo para la síntesis de HA con (H) HMTA y (C) CTAB

Resultados y discusión

Se observó que el empleo de cantidades estequiométricas de los reactivos dio lugar a la formación de una única fase cristalina de hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) independientemente de la presencia de aditivo o no en el medio de reacción (Figura 3.12).

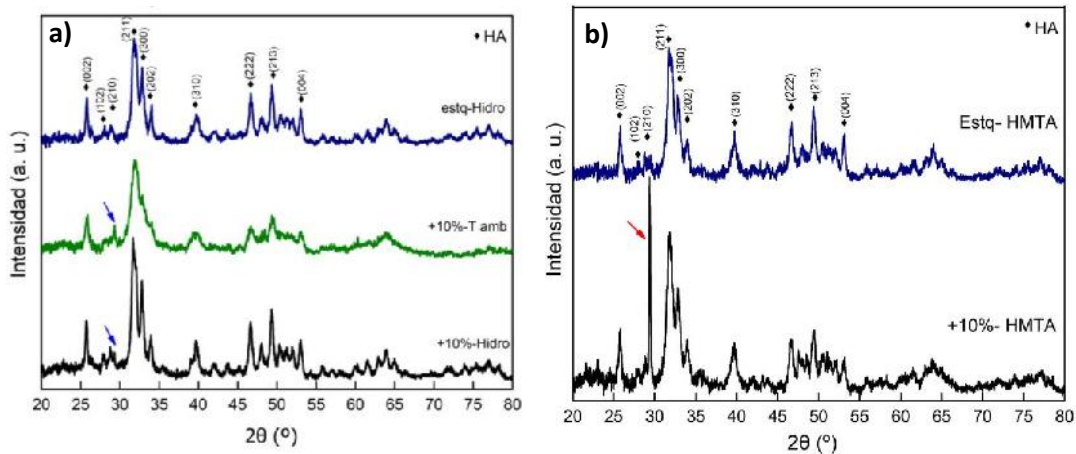


Figura 3.12: Patrones DRX para las muestras sintetizadas **a)** sin aditivo con proporciones estequiométricas y con un 10% de Ca^{2+} en exceso; **b)** con HMTA con proporciones estequiométricas y con un 10% de Ca^{2+} en exceso.

La Fig. 3.13 (a) muestra los patrones de difracción de rayos X de las muestras sintetizadas según la Tabla 3.3. Se observó que las muestras con enfriamiento rápido y lento en ausencia de aditivos (F, S), en presencia de HMTA (HF05, HF1, HS05, HS1) y en presencia de CTAB (CF1, CF2, CS1, CS2) presentaron picos característicos de HA de acuerdo con la ficha JCPDS 09-0432. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la posición de los picos. Además, no se observó crecimiento preferencial de los cristales con respecto al uso de los aditivos.

La Fig. 3.13 (b) muestra el análisis de las muestras por espectroscopía Raman. Se observa en todos los casos la banda intensa a 961 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento simétrico (ν_1) del grupo PO_4^{3-} (enlace P-O) de la fase HA. También se detectan otras bandas de menor intensidad entre $450\text{-}431\text{ cm}^{-1}$, $610\text{-}581\text{ cm}^{-1}$ y $1030\text{-}1070\text{ cm}^{-1}$ atribuidas a los modos de vibración interna de los grupos fosfatos en la fase HA: modo flexión simétrico (ν_2) del grupo fosfato (enlace O-P-O), modo flexión antisimétrico (ν_4) de grupo fosfato (enlace O-P-O) y modo de estiramiento asimétrico triplete (ν_3 : PO), respectivamente. Una señal muy pequeña a 1090 cm^{-1} aparece solo en las muestras obtenidas usando mayor concentración de HMTA en la síntesis (muestras HF1 y HS1), esta señal puede asignarse al modo de estiramiento ν_3 P-O del grupo HPO_4^{2-} en el fosfato tricálcico (TCP) [69]. Esta observación significa que la adición de HMTA en mayores concentraciones a la mezcla de reacción durante el procedimiento de síntesis (H) podría generar TCP como fase secundaria. De todos modos, la señal es de muy baja intensidad y la posible presencia de TCP cristalizado resulta insignificante, razón por la cual no es detectada por XRD [69].

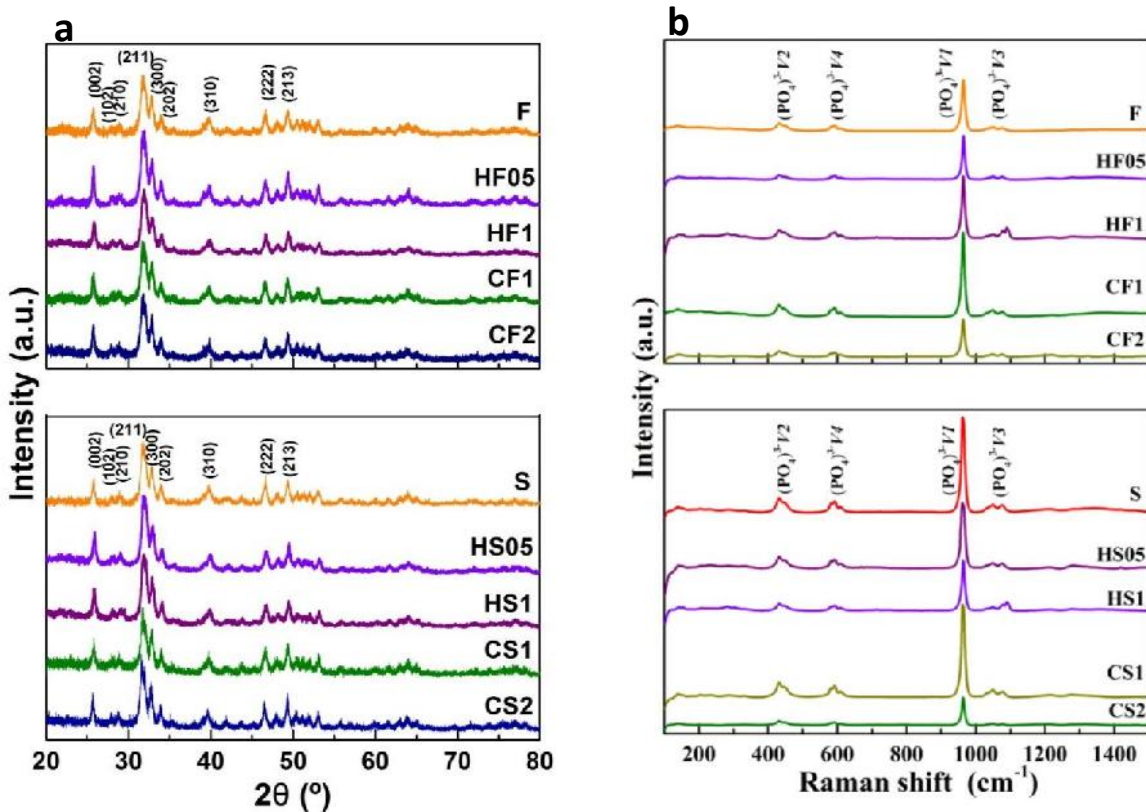


Figura 3.13: Patrones DRX: **(a)** y espectros Raman **(b)** de los polvos obtenidos con enfriamiento rápido (parte superior) y enfriamiento lento (parte inferior)

Se espera que las muestras obtenidas por enfriamiento rápido presenten un mayor número de defectos superficiales, lo que le conduciría un aumento en la capacidad de biointegración de las nanopartículas de HA. Las características de todos los patrones DRX obtenidos son similares, reforzando así la idea de que los modos de enfriamiento solo influyen en el tamaño final de las partículas obtenidas. Dejar enfriar el reactor lentamente dentro del horno, después de su permanencia a alta temperatura, es una práctica común dentro de las reacciones hidrotermales; en dichas condiciones, las partículas formadas tienen el tiempo suficiente para crecer y cristalizar, por lo que es posible obtener partículas bien cristalizadas. Sin embargo, si se buscan partículas pequeñas, el enfriamiento rápido es una forma adecuada de conseguirlas. La Figura 3.14 muestra las características morfológicas de las muestras F y S donde se aprecia el efecto de la velocidad de enfriamiento. La muestra S muestra aglomerados de 200-600 nm, mientras que la muestra F muestra partículas discretas con un tamaño medio entre 100 y 150 nm con pocos aglomerados.

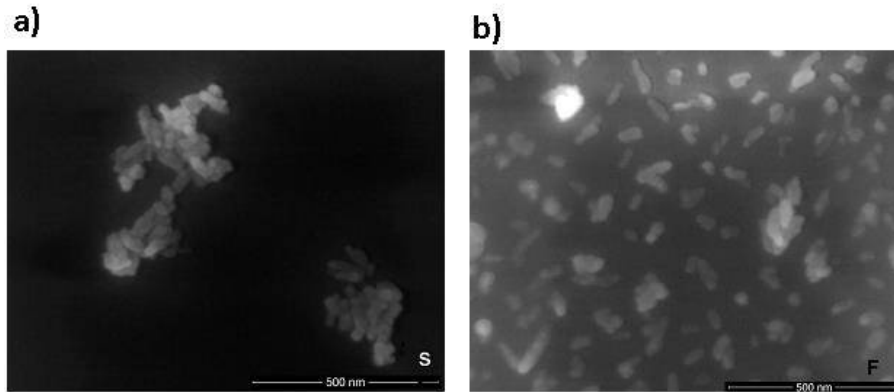


Figura 3.14: Micrografías SEM de partículas de HA: **a)** con enfriamiento lento (Muestra S); **b)** con enfriamiento rápido (Muestra F)

La figura 3.15 muestra de forma comparativa la distribución de tamaños de partícula obtenidas a través de medidas por DLS sobre distintas muestras dispersadas en isopropanol. En la Fig. 3.15 a) se presentan las distribuciones para las muestras sintetizadas sin aditivos con y sin enfriamiento rápido (muestras F y S). En la Fig. 3.15 b) se muestran las distribuciones de tamaños para las muestras sintetizadas con distinta concentración de CTAB. Finalmente, en la Fig. 3.15 c) se presentan las distribuciones de muestras sintetizadas con distinta concentración de HMTA.

Se observó que todas las muestras presentan una distribución bimodal, asociándose el pico de mayor tamaño a la presencia de aglomerados. La Tabla 3.4 muestra los datos numéricos experimentales del análisis de las distribuciones de tamaño de partícula obtenido.

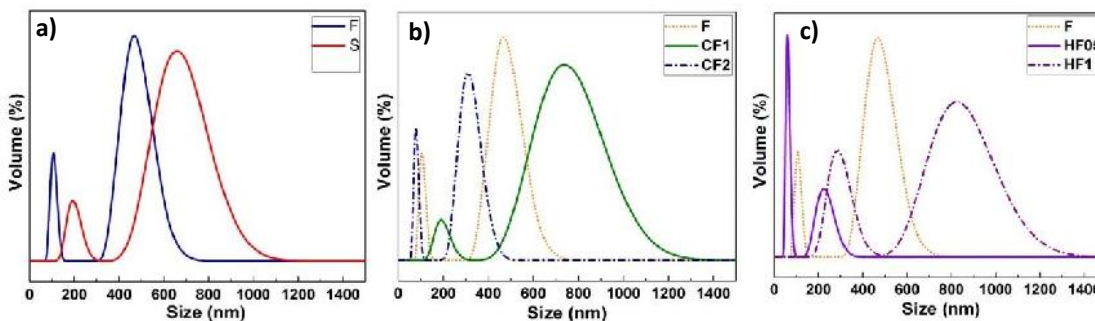


Figura 3.15: Curvas de distribución de tamaño de partícula por DLS: **a)** partículas de HA obtenidas sin aditivo (muestras S y F), **b)** partículas de HA obtenidas con CTAB y enfriamiento rápido **c)** partículas obtenidas con HMTA y enfriamiento rápido.

Tabla 3.4: Datos del análisis de las distribuciones de tamaño de partícula

	1 ^{er} pico de distribución			2 ^{do} pico de distribución			Tamaño del cristal (nm)*
	FWHM (nm)	Pico (nm)	Volumen (%)	FWHM (nm)	Pico (nm)	Volumen (%)	
S	78	195	20	292	663	80	36
F	36	106	31	172	473	69	31
HF05	23	61	74	99	226	26	29
HS05	76	183	23	283	591	77	31
HF1	129	289	42	351	831	58	32
HS1	51	121	11	285	449	89	34
CF1	83	192	15	82	738	85	39
CS1	94	194	15	329	872	85	32
CF2	27	79	39	120	310	61	43
CS2	71	163	32	333	688	68	34

*calculado a partir de la ecuación de Scherrer [70]

Los resultados muestran que cuando el material se sintetiza empleando enfriamiento lento (S), las partículas de HA aumentan su tamaño más de un 80% (de 106 a 195 nm) con respecto al tamaño medio de partícula encontrado con enfriamiento rápido (F) (Fig. 3.15a). Es decir, que el crecimiento de las partículas se detiene al enfriar rápidamente el reactor. Razón por la cual, se eligió este tipo de enfriamiento para evaluar la presencia de CTAB o HMTA.

La muestra CF1 sintetizada en presencia de CTAB en CMC (1 mmol/L), mostró valores de tamaño medio de partícula mayor respecto a los picos observados para la muestra sintetizada sin aditivo (F) (Fig.3.15 b)). El valor medio del pico detectado a menores tamaños fue de 192 nm, aunque la mayoría de estas partículas están formando aglomerados de tamaño medio de 740 nm. Sin embargo, cuando la concentración de CTAB se duplicó (CF2 en Fig.3.15 b)) se logró obtener partículas más pequeñas con un tamaño medio de 79 nm. De todos modos, se detectaron aglomerados de aproximadamente 300 nm. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Ma *et al.* quienes demostraron que el tamaño de partícula de HA disminuía al aumentar las concentraciones de CTAB [71].

Por otro lado, la muestra HF05 obtenida en presencia de HMTA dio lugar a la formación de partículas de tamaño medio menor (Fig.3,15 c)) respecto de la muestra obtenida sin aditivo. Al igual que en los casos anteriores, la distribución de tamaños resultó ser bimodal, con dos picos muy estrechos donde la mayoría de las partículas (> 70% en volumen) tienen tamaños pequeños, y el valor medio de tamaño determinado fue del orden de 60 nm. Este tamaño medio de partícula resultó ser el menor valor alcanzado en los sistemas estudiados. Por otro lado, la muestra HF1

obtenida empleando una doble concentración de HTMA presentó partículas de mayor tamaño medio mostrando una tendencia opuesta al efecto observado y reportado para el CTAB.

En lo que se refiere al rol de los aditivos, al CTAB se le atribuye la formación de micelas en solución, el cual proporciona sitios aptos para la nucleación heterogénea de HA. En soluciones acuosas el extremo polar del CTAB atrae y concentra aniones fosfato, el cual desencadena tanto la nucleación como la cristalización de HA. Cuando la concentración de CTAB aumenta por encima de la CMC, también aumenta la disponibilidad de las micelas en solución y por ende incrementa la cantidad de núcleos. De esta manera se produce, un aumento en la concentración de núcleos que conduce a una disminución en el tamaño promedio de las partículas finales. En la Figura 3.16 se presenta el esquema de lo que sucede en la síntesis hidrotermal con CTAB (Figura 3.16. B))

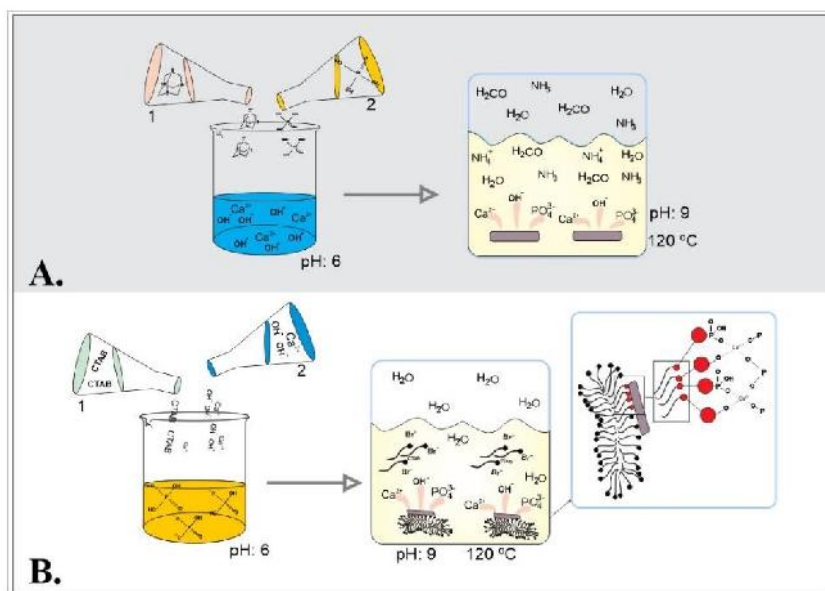


Figura 3.16: Esquema representativo de lo que sucede en la síntesis hidrotermal con: **A.** HMTA y **B.** CTAB

Por otro lado, el papel de la HMTA en la síntesis hidrotermal de materiales cristalinos no está totalmente esclarecido. Se ha usado esta tetra-amina cíclica en la síntesis de nanoestructuras de óxido de zinc por deposición química y tratamientos hidrotermales, y los resultados de esos estudios han podido ser extrapolados a la síntesis de HA. Al respecto, se han planteado dos posibles mecanismos de participación para la HMTA en la síntesis hidrotérmal, aunque la discusión aún está bajo debate. Se ha sugerido que la HMTA proporciona HO^- por medio de su lenta descomposición térmica en formaldehído y amoníaco (Figura 3.16 A). El aumento

lento del pH sería responsable de la precipitación / cristalización de los materiales inorgánicos en las reacciones hidrotermales [72,73]. Además, algunos autores han propuesto que la HMTA desempeña un papel clave como agente director de la estructura formando complejos de iones o adsorbiendo a planos cristalográficos específicos (no polares) del cristal en crecimiento [74]. Con el fin de aclarar el efecto de HMTA en la síntesis de HA, en este trabajo se preparó una solución acuosa de la amina y se la trató a 120°C durante 12 h dentro del reactor hidrotermal. Posteriormente, se observó que el pH del medio aumentó de 7 a 9. Este aumento de pH confirmó la descomposición de la HMTA en las condiciones de síntesis utilizadas, aunque no descarta su participación en la coordinación de cationes en solución.

Como se mencionó anteriormente, en las muestras HS1 y HF1 la posible formación de TCP como fase secundaria puede deberse a una menor disponibilidad de iones Ca^{2+} cuando la relación empleada $\text{Ca}^{2+}:\text{HMTA}$ fue de 1:1. La figura 3.17 ilustra comparativamente el comportamiento de cada aditivo para la síntesis de HA. Es importante señalar que el efecto del CTAB (muestra CF2) en la reducción del tamaño de partícula medio de HA con respecto a la muestra F sin aditivo, no fue tan significativo como el efecto de HMTA (muestra HF05).

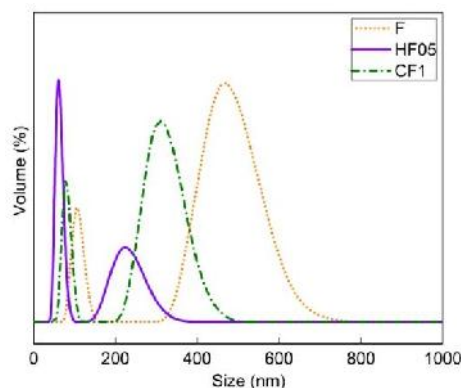


Figura 3.17: Curvas comparativas de distribución de tamaño de partícula por DLS para las muestras

La figura 3.18 muestra el tamaño de cristalito calculado a partir de la ecuación de Scherrer de todas las muestras de HA obtenidas. Los tamaños de cristalitos fueron de 36 y 31 nm para muestras S y F, respectivamente. Entonces, se podría decir que la velocidad de enfriamiento rápida llevó a nanocristales de HA ligeramente más pequeños. Se puede observar el mismo efecto entre las muestras HS05 / HF05 y HS1 / HF1. Sin embargo, los polvos obtenidos utilizando CTAB mostraron los cristalitos

más grandes. El efecto de CTAB podría deberse al hecho de que genera un entorno más ordenado antes del proceso de precipitación. Por lo tanto, en el modo de enfriamiento rápido, el cristal se forma a partir de este orden, mientras que en el modo de enfriamiento lento, los procesos de disolución-precipitación podrían tener lugar y, en consecuencia, el tamaño del cristal puede reducirse.

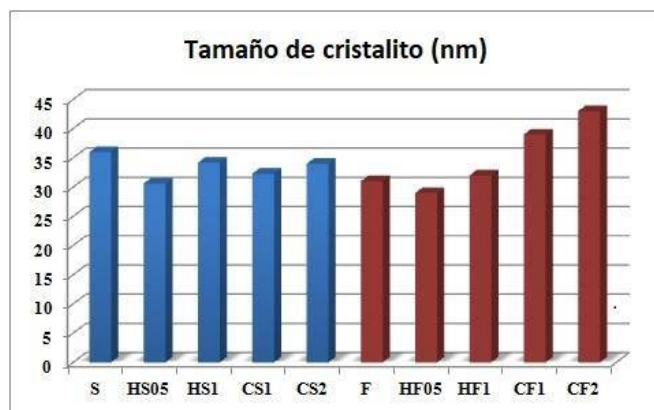


Figura 3.18: Tamaño de cristalito (nm) de muestras de HA determinado a partir de la ecuación de Scherrer.

3.3- Estabilidad de las partículas de HA y conclusiones parciales

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que la HA sintetizada en presencia de HMTA con una relación molar Ca:HMTA = 1:0,5 (HF05) y aplicando enfriamiento rápido, es la que presenta las mejores características para continuar con la segunda etapa del presente trabajo de investigación. El material de HA obtenido en estas condiciones se caracteriza por tener partículas en una distribución bimodal de tamaños medios 61 (~74%) y 225 (~26%) nm determinado por LDS. La morfología de estas partículas fue analizada por TEM y comparada con la morfología de una HA nanométrica comercial (Sigma-Aldrich CAS 12167-74-7) (Fig. 3.19). Se observó que la morfología de las partículas no tiene una geometría definida. Las partículas son irregulares con cierto grado de esfericidad, aunque con poca dispersión en el tamaño medio (16 nm). Por otro lado, en la muestra comercial se visualizan dos tipos de morfologías, partículas esféricas ($d=59$ nm) como así también partículas con forma acicular ($L=141$ nm y $h=37$ nm).

De igual forma, el análisis de tamaño de partícula y las características morfológicas que presentó la muestra obtenida por el método hidrotermal HF05 resultaron adecuados para su posterior uso en la obtención de materiales porosos

compuestos de TiO_2 e HA. La morfología homogénea y el tamaño nanométrico de las partículas de HA obtenida, favorecería su inclusión en la matriz de dióxido de titanio.

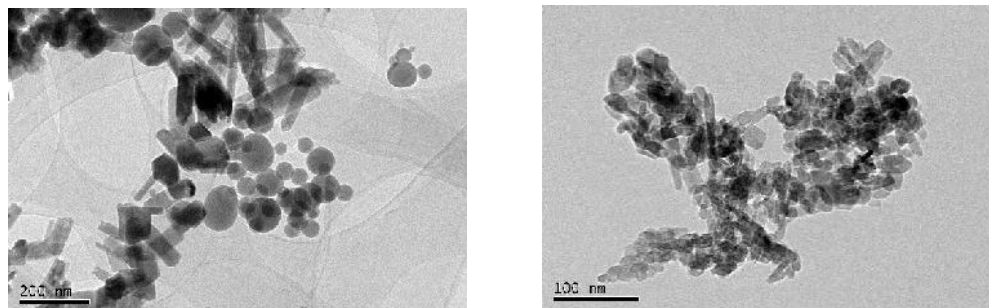


Figura 3.19: Micrografías TEM para **a)** HA comercial Sigma-Aldrich, **b)** HA sintetizada método hidrotermal (HF05)

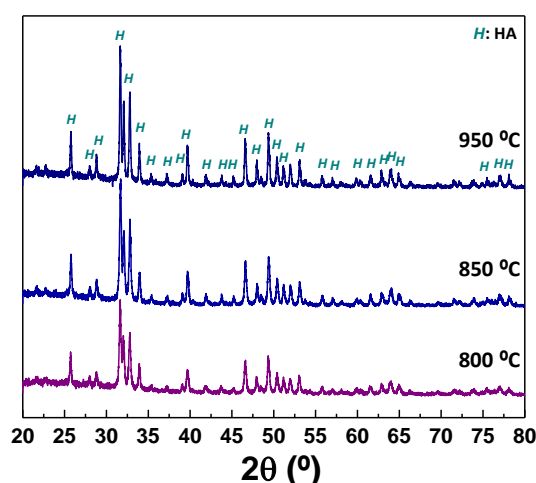
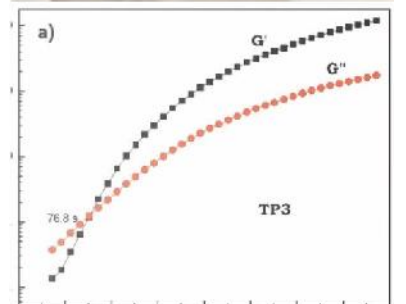
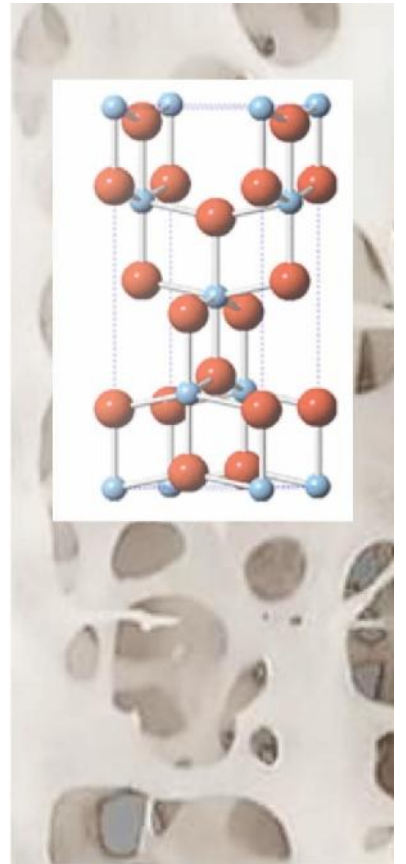


Figura 3.20: Patrones DRX para la muestra HF05 calcinada a diferentes temperaturas

Así mismo, esta HA fue tratada térmicamente para determinar su estabilidad a altas temperaturas ya que los sistemas en los cuales será adicionada requieren de un tratamiento térmico. La figura 4.20 nos muestra los DRX realizados a la muestra FH05 a temperaturas entre 800 a 950 °C por una hora. En estos se observa que la HA sintetizada soporta estas temperaturas. Asimismo, es posible notar que los picos a medida que aumenta la temperatura son más estrechos y definidos, indicándonos un incremento en la cristalinidad de la muestra.

Capítulo IV

Geles precursores de TiO_2 y sistemas compuestos HA- TiO_2



4.1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el método sol-gel ha tenido una evolución considerable, lo que ha permitido desarrollar nuevos materiales cerámicos con diseños específicos y propiedades mejoradas [75–80]. Una de las características propias del método, se centra en su versatilidad, lo que ha permitido sintetizar una multitud de materiales con una o más fases, dando lugar a materiales compuestos en diversas proporciones; así como también, materiales que pueden presentar fases integradas mediante enlaces químicos dando lugar a los denominados materiales híbridos [81,82]. Históricamente, la mayor parte de la literatura se focaliza en sistemas a base de silicio, donde los alcóxidos de silicio han mostrado una amplia utilidad para obtener materiales híbridos nanoestructurados [83–85]. En contraste, existe menos literatura dedicada al desarrollo de materiales basados en la utilización de alcóxidos de otros metales.[86–88]

El elevado número de variables para tener en cuenta en una síntesis sol-gel, hacen que el método sea muy sensible a pequeñas variaciones en la preparación. Sin embargo, si se logran ajustar las variables y se consigue un estricto control de estas, la síntesis da lugar a materiales con propiedades muy específicas y concretas. La figura 4.1 presenta las etapas que abarca un proceso sol-gel desde sus precursores hasta la obtención de un material. Este método es una de las vías más apropiadas para la síntesis de los sistemas que se desean preparar en este trabajo, dado que permite obtener diferentes fases en condiciones moderadas de síntesis, como así también, facilitar la inclusión de diversos aditivos que dan lugar a la generación de una porosidad controlada en el material final. Existen trabajos de investigación que han utilizado este método incluyendo sustancias tensioactivas para la generación de poros. [88–92].

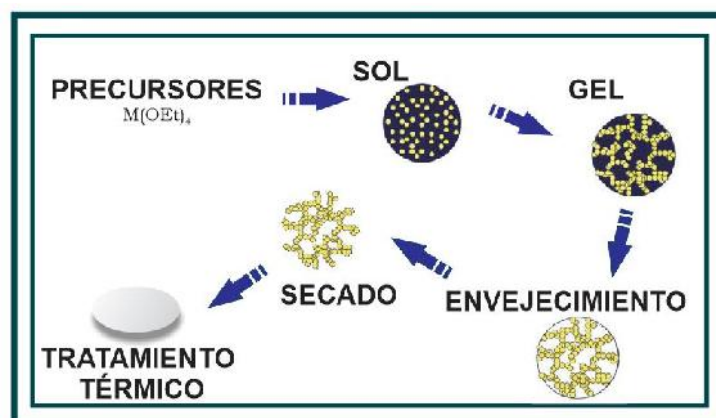


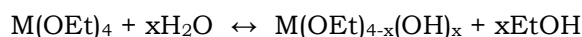
Figura 4.1: Esquema de las etapas del proceso sol-gel

El método sol-gel implica varias etapas entre las cuales se destacan: la etapa de formación de un sol, y la posterior obtención de un gel. La primera consiste en una suspensión coloidal de partículas, mientras que la etapa de formación del gel es un proceso de formación de una red interconectada de partículas sólidas que crean una entidad continua a lo largo de una fase secundaria, generalmente líquida, donde los precursores principalmente utilizados son alcóxidos metálicos y sus propiedades físicas y químicas, dependen de varios factores:

- * El carácter iónico del enlace M-O, debido a la diferencia de electronegatividades entre el átomo de oxígeno y el metal.
- * Efectos electrónicos asociados a grupos alquílicos -R, los cual pueden modificar la polaridad intrínseca del enlace M-O, por medio de donación o atracción de densidad electrónica.
- * La formación de oligómeros debido a la expansión de la esfera de coordinación del metal, la cual se lleva a cabo por un enlace intermolecular con átomos de alcóxidos vecinos.

El método sol-gel es altamente influenciado por el pH, la relación molar H₂O/alcóxido y el solvente. Su preparación es simple, eficiente y tiene lugar a temperaturas bajas. Se forma una red del tipo M-O-M (M representa el catión metálico) por reacciones de hidrólisis y condensación del alcóxido mediante la adición controlada de agua al medio. El solvente permite la miscibilidad entre el alcóxido y el agua. En algunos casos, el alcohol resultante de las reacciones de hidrólisis y condensación, es suficiente para la homogenización de las fases.[93] Las reacciones involucradas se muestran a continuación:

Hidrólisis



Condensación



Estas reacciones están fuertemente influenciadas por el contenido de agua que se adiciona al sistema, ya que el agua influye directamente en el inicio al proceso de hidrólisis y condensación, conduciendo a la formación del sol (una dispersión de partículas coloidales en fase líquida que son suficientemente pequeñas para

permanecer suspendidas por movimiento Browniano [94]. Una posterior adición de agua puede ocasionar la desestabilización del sol, transformándose en un gel, el cual es un sólido amorfo con un componente fluido (principalmente solvente) disperso y atrapado en un esqueleto tridimensional [10].

Las reacciones de hidrólisis y condensación son procesos de múltiples etapas, ocurriendo en forma secuencial y en simultáneo. Cada reacción secuencial puede ser reversible. El proceso de formación del sol y del gel depende de la evolución de estas reacciones, siendo entonces una de las variables principales para la obtención del producto final, ya que es posible controlar la velocidad de estas reacciones de varias maneras, como alterando la naturaleza de los precursores, el uso de catalizadores o moderadores, la cantidad de agua utilizada, el procesamiento físico del gel, entre otros.[88,95] El control de la competencia entre las reacciones de hidrólisis y condensación es la clave para tener un diseño de proceso que permita conseguir las características buscadas en el material final. En la figura 4.2 se muestra la versatilidad del método y la variedad de productos que pueden desarrollarse a partir del mismo.[88]

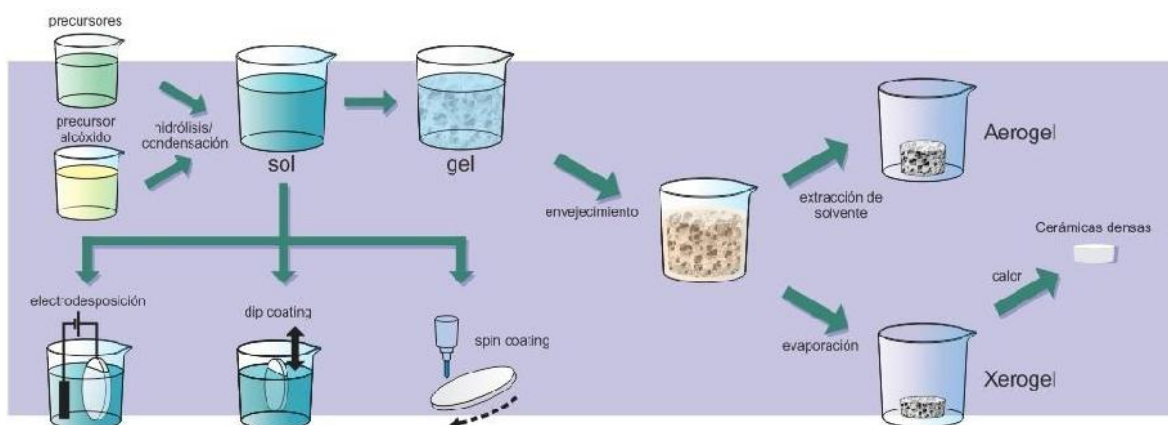


Figura 4.2: Esquema del proceso sol-gel y productos que pueden desarrollarse.

El proceso de envejecimiento, que hace referencia al tiempo que transcurre luego de la gelación, es un periodo donde tiene lugar la sinéresis, que induce a la contracción del esqueleto y a la expulsión del líquido de los poros.[96] Cuando el gel envejecido se procesa para la obtención del material final, dependiendo del tipo de secado que se realice, pueden obtenerse un xerogel o un aerogel. Si el gel envejecido se seca a presión atmosférica por evaporación del solvente se produce la formación de un xerogel. Este proceso conlleva una contracción del material final, y en la mayoría de los casos se produce la fisura de la estructura de gel previamente formada. Si el proceso de secado se diseña de modo de eliminar el solvente logrando

preservar la estructura del gel es posible obtener un aerogel. Para ello se utilizan técnicas de secado con CO_2 en condiciones supercríticas que permite la extracción del solvente sin que la estructura sufra rupturas o daños (este tema se desarrollará en el Capítulo V). La combinación del proceso sol-gel con la técnica de secado supercrítico constituye una vía singular y versátil para la preparación y diseño de materiales sólidos con nuevas propiedades estructurales y químicas que no se logran fácilmente con otros métodos de preparación. [93]

Una característica general que beneficia el desempeño de los materiales porosos utilizados para regeneración ósea es que contengan una fase bioactiva que permita la integración del material con el medio circundante, tales como biovidrios, hidroxiapatita, u otros fosfatos de calcio. Además, dichos materiales deben presentar suficiente resistencia mecánica para soportar el crecimiento del nuevo hueso. [27,97–100] El dióxido de titanio (TiO_2) se caracteriza por presentar buenas propiedades mecánicas, además de ser bioinerte y biocompatible, convirtiéndose en una muy buena opción para el desarrollo de materiales para la regeneración de hueso.[88,101–107]. Diversos estudios han mostrado que tiene propiedades osteoconductoras, es decir capacidad para guiar el crecimiento del hueso.[103,106,108]

El dióxido de titanio (TiO_2) es un compuesto inorgánico que puede existir en forma amorfa o cristalizar con diversos ordenamientos atómicos. La figura 4.3 muestra las estructuras cristalinas de los polimorfos del TiO_2 .

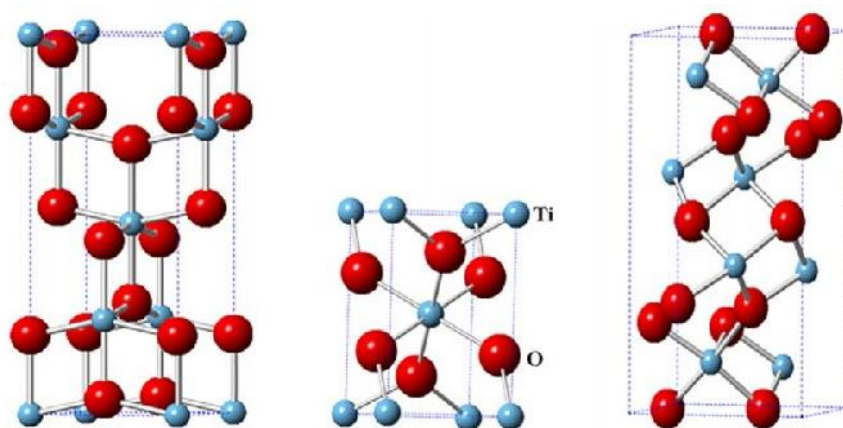


Figura 4.3: estructuras cristalinas de TiO_2 **a)** Anatasa, **b)** Rutilo y **c)** Brookita [109]

La anatasa y el rutilo tienen una estructura tetragonal, mientras que la estructura de la brookita es ortorrómbica. Éste último polimorfo del TiO_2 es menos

común que los dos primeros y es mucho más difícil de obtener. La anatasa y el rutilo son fotocatalíticamente activos, mientras que la brookita nunca ha sido probada por su actividad fotocatalítica. La anatasa pura es más activa como fotocatalizador que el rutilo, probablemente porque tiene un potencial más negativo en el borde de la banda conductora (lo que significa una mayor energía potencial de los electrones fotogenerados) y también debido a un mayor número de grupos $-OH$ en su superficie [110,111].

Existe un número abultado de publicaciones sobre las propiedades fotocatalíticas del TiO_2 . Es sabido que la pobre estabilidad térmica de la fase anatasa, más activa fotocatalíticamente, es una desventaja del TiO_2 como fotocatalizador. La anatasa es térmicamente menos estable y sufre una transformación irreversible a la fase de rutilo menos activa por encima de $600^\circ C$, lo que limita sus aplicaciones de alta temperatura ($\geq 700^\circ C$). La transformación de anatasa a rutilo (ART) es lenta por debajo de $600^\circ C$ y extremadamente rápida por encima de $700^\circ C$. La transformación implica el movimiento cooperativo de los iones individuales O^{2-} y Ti^{4+} . Durante la ART, se rompen dos enlaces $Ti-O$ de la estructura de cristal de anatasa para formar la estructura de rutilo (Fig. 4.4).

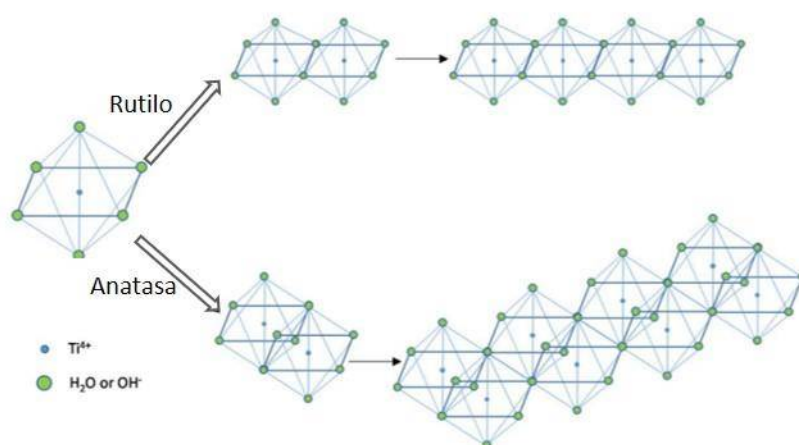


Figura 4.4: Estructuras cristalinas de TiO_2

Como se mencionó previamente, tanto el rutilo como la anatasa tienen una estructura cristalina tetragonal y en la literatura se demuestra que la estabilidad cinética de la anatasa es mayor que la del rutilo en condiciones ambientales [110]. En las últimas décadas, se ha prestado mucha atención a la ingeniería de la superficie del cristal de anatasa a nivel microscópico para una mejor comprensión de la relación entre la superficie y su actividad fotocatalítica [112]. La temperatura de ART está determinada por el tamaño de grano, las impurezas, los dopantes, los

precursores y la técnica de síntesis [113]. En general, las nanopartículas de TiO_2 se sintetizan mediante varias técnicas como sol-gel, deposición química de vapor y métodos de micelas invertidas [114–116] y en muchos trabajos se ha intentado preparar el material en forma de nanoesferas, nanocables, nanorods, nanoestrellas y nanodiscos [117].

La anatasa y el rutilo se sintetizan comúnmente por hidrólisis de compuestos de titanio tales como tetracloruro de titanio, sulfato de titanio o alcóxidos de titanio en solución acuosa. Si bien se conocen muchas alternativas para desarrollar TiO_2 para aplicaciones en fotocatalisis como se mencionó previamente, existen importantes antecedentes que describen la síntesis y el comportamiento del TiO_2 como biomaterial para la regeneración de tejido óseo. En la mayoría de los desarrollos reportados el TiO_2 se utiliza como parte de un recubrimiento, ya sea de piezas metálicas o de superficies de otra naturaleza, como refuerzo de fases poliméricas, como fase bioinerte de andamios compuestos, etc [101,118–134].

Durante años se han realizado trabajos para investigar el efecto de la topografía de nanotubos (NT) de TiO_2 , especialmente su diámetro y tamaño de poro, en su biocompatibilidad. El contacto entre las células y los NT de TiO_2 está influenciado por la topografía y el potencial zeta de estos. Tanto las células como la superficie de los NT de TiO_2 están cargadas negativamente, la unión de las células en NT de TiO_2 está determinada por las proteínas cargadas positivamente, iones, fibronectina y vitronectina. Las células de osteoblastos primero hacen contacto con las superficies de los implantes a través de fuerzas electrostáticas, y luego el contacto focal se logra a través de un ensamblaje de integrina (*Las integrinas forman la principal familia de los receptores de adhesión celular. Se encuentran en la superficie celular y son el principal recurso que tienen las células para interactuar con la matriz extracelular o entre las mismas células*). Algunos trabajos revelaron que el diámetro de NT de TiO_2 tiene gran efecto sobre la proliferación y adhesión celular, reportando un rango óptimo de 15 a 20 nm. Diferentes investigaciones han demostrado que las nanoestructuras de TiO_2 tienen una buena biocompatibilidad, aunque la influencia de la topografía en la proliferación celular es aún ambigua [127].

Otro aspecto importante para la aplicación del TiO_2 como biomaterial recae sobre las propiedades antibacterianas del mismo [135–137]. La figura 4.5 muestra un esquema de los mecanismos antibacterianos generales. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se obtienen por reacción fotocatalítica de TiO_2 bajo irradiación de luz. Particularmente, las especies como los radicales aniónicos superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$), los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son consideradas las

especies que ocasionan la muerte bacteriana. Estas especies pueden penetrar la membrana celular bacteriana y oxidar proteínas, lo que conduce a la pérdida de la función de las enzimas asociadas. Por lo tanto, las células microbianas se degeneran y mueren [127]. Recientemente se ha demostrado que es posible incrementar la capacidad antimicrobiana del TiO_2 modificando las propiedades superficiales, como el potencial zeta, mediante la funcionalización con 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) [138]. El efecto antibacteriano de estos materiales se puede mejorar aún más, si se incluyen nanopartículas antibacterianas (como Ag o Cu NPs) en las nanoestructuras o se funcionalizan con agentes bioactivos [139,140].

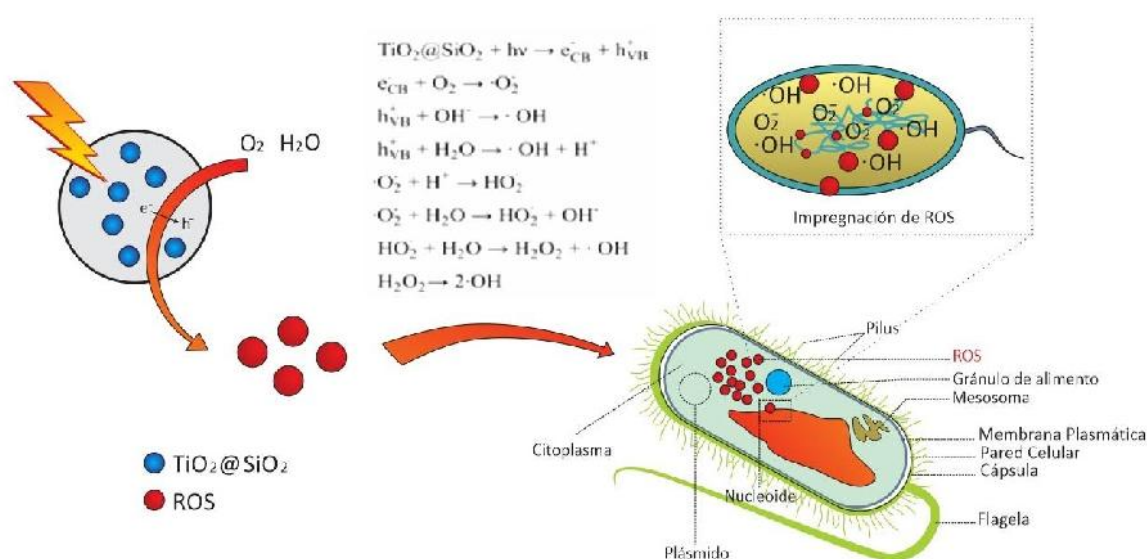


Figura 4.5: Esquema del mecanismo antibacteriano del material híbrido $\text{TiO}_2@\text{SiO}_2$ sobre *E. Coli*. [141]

Dentro de la literatura, se encuentran trabajos que describen la obtención de sistemas compuestos de TiO_2 e hidroxiapatita con distintas características y aplicaciones. [101,102,128,142–160]. Entre ellas se destaca la preparación de recubrimientos obtenidos por sol-gel para desarrollar nanoestructuras compuestas HA/ TiO_2 de nanopartículas que varían de 100 a 200 nm, con límites de grano bien definidos. Las características de estos recubrimientos dependen de la concentración del sol, los parámetros de inmersión y la composición de HA y TiO_2 . También se encuentran trabajos que obtienen sistemas particulados compuestos de TiO_2/HA mediante tratamiento hidrotérmico de polvos de HA y soluciones de $\text{Ti}(\text{OH})_4$ en

distintas concentraciones. Estos materiales mostraron que los pequeños gránulos de TiO_2 formados, identificados como cristales de anatasa de 3 a 5 nm, se depositaron sobre cristales de HA en forma de varilla. Los resultados revelaron que las propiedades fotocatalíticas del compuesto de hidroxiapatita/ TiO_2 son más efectivas que las de los materiales puros. Otro aspecto reportado es la fabricación de membranas por electrohilado utilizando TiO_2 /HA/poliuretano (PU) con diferentes proporciones de HA y TiO_2 . Las membranas desarrolladas con TiO_2 y HA presentaron las fibras más pequeñas respecto de aquellas que no contenían TiO_2 , ni HA, mostrando la formación de agregados en la superficie de las fibras. También, presentaron mayores ángulos de contacto con el agua, resistencia mecánica y mejor adhesión celular que aquellos sin TiO_2 y sin HA, lo que las convierte en membranas funcionalmente atractivas por su capacidad de osteointegración.

Los estudios referentes al desarrollo de materiales porosos como soportes para regeneración ósea (*scaffolds*) conteniendo TiO_2 y HA es relativamente escasa. Se encuentran pocos trabajos en la literatura que profundicen en este sistema potencialmente promisorio. Kahattab y col. [143] describieron la producción de cerámicos porosos de TiO_2 y TiO_2 /HA por medio de dos técnicas: *starch consolidation* y *freeze gelcasting*; y analizaron las propiedades estructurales, físicas y mecánicas de los sistemas obtenidos por ambos métodos. Básicamente, la obtención de un cerámico poroso por *starch consolidation* se basa en la obtención de una suspensión coloidal del material cerámico con agentes espumantes como el almidón, la cual se somete a calentamiento entre 55 y 80°C, lo que conduce a un rápido hinchamiento de los gránulos por la absorción de agua, y da a como resultado un aumento en el tamaño del gránulo. Durante el procesamiento para obtener el cerámico poroso final el almidón es eliminado por calcinación, lo que en consecuencia afecta a las propiedades del material fabricado. El otro método, *freeze gelcasting*, consiste en la generación de poros por evaporación de cristales solidificados a partir de un vehículo líquido dentro de una matriz. En este método la dirección del gradiente térmico es uno de los aspectos principales que determinan las características de la porosidad final. Este proceso puede comprenderse como una combinación entre las ventajas de las técnicas de fundición en gel y de congelación. Los resultados reportados por Kahattab y col. [143] mostraron que fue posible preparar por *starch consolidation* materiales de TiO_2 con 5% m/m de HA, y donde la caracterización reveló que el material final presentaba las fases de rutilo y β -TCP (beta fosfato tricálcico). Por otro lado, confirmaron la presencia de HA en los materiales obtenidos por *freeze gelcasting*. Las muestras obtenidas por ambas rutas resultaron porosas, con

importantes propiedades tanto físicas como mecánicas, siendo las obtenidas *por freeze gelcasting* las que presentaron mejor distribución de poro.

Otros autores como *S. Saber-Samandari* y colaboradores [161] estudiaron la incorporación de TiO_2 en andamios compuestos de poliacriliamida/hidroxiapatita/ TiO_2 , con el fin de mejorar las propiedades mecánicas (módulo elástico y resistencia a la compresión) y las propiedades biológicas (bioactividad) para aplicaciones en ingeniería de tejidos. Estos autores reportaron que los nano-andamios compuestos sintetizados tenían una estructura interconectada, y que la muestra que contenía mayor cantidad de TiO_2 mostró propiedades mecánicas apropiadas (modulo elástico: $1,20 \pm 0,01$ GPa, fuerza de compresión: $4,1 \pm 0,2$ MPa) para ser implantado como tejido óseo trabecular (modulo elástico: $0,2 \pm 0,1$ GPa, fuerza de compresión: 4 ± 2 MPa), además de presentar buena biocompatibilidad.

La descripción previa muestra que existen escasos antecedentes en la literatura que aborden el desarrollo de materiales porosos de TiO_2/HA a través de metodologías con buena reproducibilidad, donde exista posibilidad de tener alto control en las variables involucradas y que consecuentemente permitan obtener materiales nanoestructurados con porosidad establecida. Es por ello por lo que, en este trabajo de tesis, se propone obtener sistemas compuestos nanoestructurados de $\text{TiO}_2\text{-HA}$ mediante la combinación de la técnica de síntesis sol-gel con la tecnología de secado utilizando CO_2 supercrítico. Por un lado, la síntesis sol-gel permite la incorporación homogénea de nanopartículas de HA en el gel precursor de TiO_2 , como así también otros componentes capaces de promover la formación de poros en el material final.

En esta parte del trabajo de tesis se estudia la síntesis propiamente dicha del gel precursor compuesto conteniendo nanopartículas de HA sintetizadas por vía hidrotermal (Capítulo III) y un agente porógeno. En la parte experimental que se describe a continuación se detallan las variables estudiadas para la preparación de geles de TiO_2 y $\text{TiO}_2\text{-HA}$. También se presentan los resultados de diversos ensayos de caracterización de los geles obtenidos y finalmente se muestran las geometrías utilizadas para la preparación de estos materiales finales compuestos.

4.2. METODOLOGÍA

Para la síntesis sol-gel se utilizó butóxido de titanio ($\text{Ti}(\text{OBU})_4$) como fuente de Ti, ácido acético (HAc) como agente estabilizante, isopropanol como solvente y agua destilada como promotor de reacciones de hidrólisis y condensación. Se prepararon geles precursores de TiO_2 y se establecieron las mejores condiciones experimentales que se asocian a las cantidades relativas de reactivos utilizadas. Posteriormente, se realizaron experiencias para la obtención de los sistemas compuestos de TiO_2 -HA. Para la preparación de los geles compuestos se utilizó una HA nanométrica (tamaño medio 60 nm) obtenida previamente según se describió en el Capítulo 3. Se emplearon diferentes condiciones de reacción vinculadas a variaciones en las relaciones $\text{Ti}(\text{OBU})_4$:HAc, $\text{Ti}(\text{OBU})_4$: H_2O y $\text{Ti}(\text{OBU})_4$:isopropanol.

Con el objetivo de lograr microestructuras homogéneas de porosidad abierta y poros de tamaño controlado se estudió la influencia del contenido de HA (5, 20, 40 y 60 % m/m) y el tipo y cantidad de porógeno agregado. Los agentes generadores de poros utilizados fueron Triton X-100 (TTX) y polivinilpirrolidona (PVP) de peso molecular medio 1,3MDa, en concentraciones que fueron entre 10 % y 40% % m/m en referencia al contenido de dióxido de titanio final obtenido. Los soles preparados se dejaron envejecer en recipientes cerrados mantenidos en estufa a 35 °C hasta su consolidación. La Fig. 4.6 representa los principales estadios del sistema.

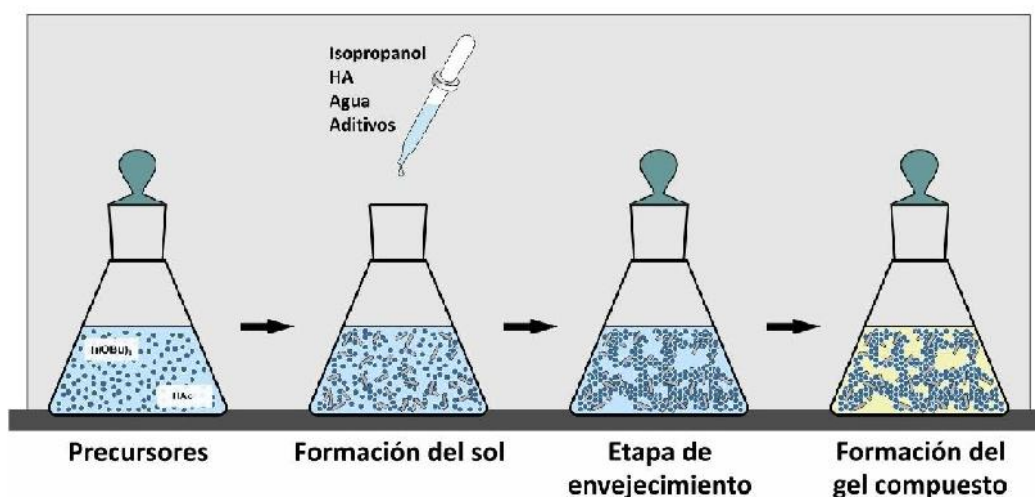


Figura 4.6: Proceso de obtención de los sistemas compuestos de TiO_2 - HA

4.3. Resultados y discusión

4.3.1- Ensayos preliminares

Para la obtención de geles de titanio, los primeros ensayos se llevaron a cabo utilizando como variable la relación molar entre tetrabutóxido de titanio (BuTi) y ácido acético (HAc) (1:1 y 1:2) y manteniendo constantes las proporciones molares de BuTi: H₂O (1:1) y BuTi: solvente (1:1). En ninguno de estos casos se formó un gel, aunque los sistemas fueron evaluados a largos tiempos de envejecimiento. Posteriormente, se realizaron nuevas preparaciones utilizando los parámetros reportados por *Doeuff et al.*, quienes proponen utilizar una concentración final del BuTi de 0,8 mol/L para obtener geles traslúcidos [162]. En la Tabla 4.1 se detallan las proporciones y condiciones utilizadas para cada preparación.

Tabla 4.1: Condiciones de síntesis utilizados en la serie de ensayos preliminares empleando una concentración [BuTi] de 0,8 mol/L y un tiempo de envejecimiento de 3 meses.

Muestra	Reflujo	BuTi:H ₂ O	BuTi:Hac	Formación de gel
1	--	1:4	1:1,5	No
2	--	1:1	1:1	No
3	--	1:0,5	1:2	No
4	--	1:1	1:2	No
5	horas	1:0,5	1:2	No

En esta serie preliminar de ensayos no se obtuvo ninguna condición favorable para la formación de un gel. La presencia de ácido acético como catalizador de la etapa de hidrólisis evidentemente modifica las condiciones de reacción lo que impide que el sistema alcance una condición favorable para la etapa de condensación.

4.3.2- Primera serie de ensayos: variación en las proporciones BuTi/H₂O/HAc.

En las preparaciones preliminares los sistemas estudiados no alcanzaron el punto de gel, por lo que se procedió a realizar nuevas preparaciones modificando los parámetros de reacción (Tabla 4.2). En la nueva serie de preparaciones se evaluó el efecto del agua y del ácido acético, principales promotores y moderadores de la

hidrólisis y condensación del sistema. La Tabla 4.2 detalla las condiciones de síntesis de cada una de las muestras de esta serie. Solamente dos muestras formaron un gel, aunque la consistencia de estos no resultó adecuada en ningún caso, ya que mostraron un alto grado de fluidez evidenciando una incompleta condensación del sol precursor.

Tabla 4.2: Condiciones de síntesis y características del producto para la primera serie de ensayos

Muestra	BuTi:H ₂ O	BuTi:HAc	tiempo gelado	Característica
M1	1:0,5	1:2	--	
M2	1:1		--	
M3	1:2		9 días	Inestable
M4	1:1	1:1	--	
M5		1:3	20 días	Inestable
M6		1:4	--	

Como se mencionó previamente, cuando se preparan geles de TiO₂ se enfrentan dos cuestiones principales: la hidrólisis rápida del precursor de titanio y la desestabilización del alcogel en el proceso de envejecimiento, por lo que es de gran importancia proporcionar un contenido adecuado de ácido acético, el cual modula la reactividad del alcóxido. Por su parte, la relación molar BuTi:H₂O debe estar ajustada para brindar una reacción de hidrólisis con velocidad adecuada, dado que es sabido que a mayor cantidad de agua más rápido es el proceso de hidrólisis, o con escaso contenido de agua se prolonga dicha etapa.[163,164]

En la literatura se describe que la apariencia de los geles, que pueden obtenerse por el método sol-gel, está fuertemente influenciada por las velocidades relativas de hidrólisis y condensación. La Tabla 4.3 describe las características de los productos obtenidos en relación a las velocidades de hidrólisis y condensación, permitiendo tener más claridad de lo que se espera dependiendo de los tiempos de las etapas involucradas.[30]

Tabla 4.3: Influencia de las velocidades relativas de hidrólisis y condensación en la estructura del gel

Velocidad de hidrólisis	Velocidad de condensación	Resultado
Lenta	Lenta	Coloide/sol
Rápida	Lenta	Gel polimérico
Rápida	Rápida	Gel coloidal/ Precipitado gelatinoso
Lenta	Rápida	Precipitación controlada

De acuerdo con lo reportado, se modificaron las condiciones de síntesis con el fin de generar una velocidad de hidrólisis rápida y una condensación lenta para lograr la obtención de cuerpos sólidos de TiO_2 . [27, 31] Se buscó optimizar la cantidad de agua, de ácido acético y la concentración del alcóxido de titanio agregado al sistema. Teniendo en cuenta que la preparación M3 alcanzó el estado de gel en nueve días, se procedió a diagramar una serie de preparaciones a partir de una relación molar BuTi/HAc de 1:2 modificando la proporción de agua.

4.3.3- Segunda serie de ensayos: efecto de la proporción de agua.

Con el fin de ajustar el tiempo de gelado se incrementó la proporción de agua en las preparaciones de la segunda serie de ensayos utilizando una concentración de BuTi de 0,8 mol/L y una relación BuTi/HAc de 1:2 según se indica en la Tabla 4.4. También se utilizó en una de las preparaciones una proporción BuTi/HAc de 1:3 dado que en los ensayos previos esta proporción permitió la formación de un gel (muestra M5). En la Tabla 4.4 se reportan únicamente las preparaciones que dieron lugar a un gel.

Tabla 4.4: Condiciones de síntesis y características del producto para la segunda serie de ensayos.

Muestra	BuTi:H ₂ O	BuTi:HAc	Tiempo de gelado	Características
M7	1:2	1:2	30 min	Inestable
M8	1:3	1:2	5 min	Estable
M9	1:3,5	1:2	2 min	Estable
M10	1:4	1:2	1 min	Estable
M11	1:3	1:3	4 días	Inestable

En esta serie de preparaciones se observó que el aumento en la proporción de agua, manteniendo la proporción de ácido acético constante, reduce drásticamente el tiempo de gelado y produce un gel estable. Las preparaciones M8, M9 y M10 mostraron la formación de un gel con consistencia adecuada para ser procesado posteriormente. Sin embargo, en estos tres casos el volumen de gel generado excedió la superficie del líquido lo que ocasionó la formación de grietas afectando la consolidación final del material. La causa de esto se debe a que las reacciones de condensación dan lugar a la formación de una matriz porosa interconectada en medio de la dispersión coloidal, reteniendo mecánicamente al solvente en su interior a través de fuerzas capilares e interacciones con la superficie. Por lo tanto, al ser un medio con poco solvente, el mismo queda atrapado en los poros, ya que si el gel es de un tamaño muy pequeño el líquido puede salir fácilmente, pero si este es de un tamaño más grande y la cantidad de poros mayor, se necesita un gradiente de presión superior para conducir el líquido a la superficie. [94,96] La figura 4.7 muestra el aspecto propio de uno de los geles (preparación M9) de esta serie de ensayos. Se observan importantes grietas en el gel, especialmente en las paredes. Además, puede apreciarse el brillo en la superficie del gel por falta de solvente.



Figura 4.7: Aspecto del gel de TiO_2 obtenido a partir de la preparación M9

Estos resultados dieron lugar a una serie nueva de preparaciones donde se incrementó la cantidad de solvente utilizado y donde se analizó la influencia de la proporción de agua manteniendo la relación BuTi:HAc de 1:2.

4.3.4- Tercera serie de ensayos: mayor proporción de solvente.

En esta serie de preparaciones se triplicó la cantidad de solvente usado respecto de las series anteriores. Se trabajó con una concentración de BuTi de 0,5 mol/L, una relación BuTi:HAc de 1:2 y se analizó la influencia del contenido de agua según las proporciones que se indican en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5: Condiciones de síntesis y características del producto para la tercera serie de ensayos.

Muestra	BuTi:H ₂ O	BuTi:HAc	Tiempo de gelado	Características
M12	1:3	1:2	10 min	Estable
M13	1:3,5	1:2	5 min	Estable
M14	1:4	1:2	2 min	Estable

En estas tres preparaciones se logró obtener geles en tiempos aceptables y con estructuras consistentes. Se mejoró el proceso de sinéresis observándose la formación de geles uniformes completamente inmersos en el solvente y de consistencia estable.



Figura 4.8: Aspecto de los geles de TiO_2 obtenidos en la tercera serie de ensayos (preparación M13).

La Figura 4.8 muestra el aspecto del gel obtenido a partir de la preparación M13, en la imagen puede observarse la conservación de la geometría del molde y la ausencia de grietas en la superficie del gel. Teniendo en cuenta las características de los geles obtenidos en estas primeras series de preparaciones pudieron establecerse como condiciones óptimas de síntesis para la formación de geles de TiO_2 los siguientes parámetros:

- Concentración de BuTi de 0,5 mol/L
- Relación BuTi:H₂O de 3-3,5
- Relación BuTi:HAc de 1:2

Utilizando estas condiciones para la preparación de los sistemas se obtuvieron geles consistentes en tiempos de gelado convenientes, entre 5 y 10 min.

4.3.5- Cuarta serie de ensayos: efecto de nanopartículas de HA sobre la formación del gel.

Las preparaciones previas permitieron establecer las mejores condiciones de síntesis (vinculadas a las proporciones de los precursores utilizados entre BuTi, H₂O y HAc) para obtener una matriz de gel de TiO_2 íntegra, de consistencia estable y apropiada para poder conformar geometrías definidas. Con estas condiciones optimizadas se procedió a estudiar la influencia que tiene la incorporación de nanopartículas de hidroxiapatita en el proceso de formación del gel de TiO_2 , para dar lugar a un gel compuesto.

La tabla 4.6 presenta los porcentajes de hidroxiapatita incorporados con respecto a la masa final de TiO_2 (1 g) presente en el sistema en la etapa de preparación. En todos los casos, los geles obtenidos presentaron buena consistencia e integridad, además de tiempos de gelación muy semejantes. Los geles mostraron una reducción en su diámetro entre 25–30% en las primeras 48 h de envejecimiento.

Tabla 4.6: Porcentaje de HA nanométrica incorporada a la preparación M13 y características del producto.

Muestra M13	% m/m HA	Características
T	-	Estable
TH2	20	Estable
TH4	40	Estable
TH6	60	Estable

Para adquirir una mejor comprensión del proceso de formación del material compuesto se intentó medir la viscosidad de la mezcla en función del tiempo. Para ello se utilizó un viscosímetro vibracional AND. Debido al tipo de agitación que utiliza este equipo y al volumen requerido de muestra (aproximadamente 40 mL), no fue posible obtener datos confiables de la viscosidad del sol en función del tiempo, debido a que el gel comenzó a gelificar en la parte superior del agitador y no de forma uniforme en todo el volumen, ocasionando que el equipo registrara incrementos y descensos en la viscosidad en diferentes instancias del ensayo. Se trató hacer el registro durante 15 minutos sin embargo las variaciones registradas carecen de significado debido a las inhomogeneidades en las cercanías del agitador. Dada la imposibilidad de realizar el registro del cambio de viscosidad en función del tiempo para los distintos sistemas se procedió a realizar otras mediciones en un reómetro.

Con la finalidad de determinar el tiempo de gelado de los sistemas con distinto contenido de HA, se realizaron ensayos para medir el t_{gel} donde se mide la respuesta viscoelástica del gel en función de la velocidad de corte, donde es posible observar el módulo elástico o módulo de almacenamiento, G' , asociado a los efectos elásticos (relacionado a la energía almacenada durante la deformación), y el módulo de pérdida, G'' , asociado al efecto viscoso (relacionado con la energía disipada durante la deformación), donde se define el t_{gel} como el tiempo para el cual, a una dada frecuencia, G' y G'' son iguales, es decir, a muy baja frecuencia G'' es mucho mayor que G' , por lo que predomina el comportamiento viscoso de un líquido. Al aumentar la frecuencia o tiempo, las curvas de G' y G'' se cruzan y empiezan a dominar el comportamiento elástico típico de un sólido [34,96]. A partir de la variación registrada en los módulos G' y G'' , según se detalló en el Capítulo II es posible determinar el tiempo de gelación de los distintos geles compuestos. Este método permitió realizar un registro cuantitativo respecto de la evolución de los geles compuestos y obtener valores para los tiempos de gelación ya que la muestra es

preparada en el momento y con un volumen menor. Las medidas se realizaron bajo la modalidad de platos paralelos, y si bien se obtuvieron curvas reproducibles, las mismas se obtuvieron bajo condiciones muy diferentes a las utilizadas en las preparaciones a mayor escala de los geles compuestos. Esta diferencia sustancial, genera un registro para el tiempo de gelación que sólo tiene carácter comparativo entre las muestras, donde puede evaluarse su evolución en condiciones similares, aunque no es representativo como valor absoluto.

La Figura 4.9 muestra la variación registrada de los módulos de pérdida y almacenamiento vs el tiempo para la preparación M13 (T) y con diferentes contenidos de HA (20,TH2; 40,TH4 y 60 %,TH6). Las muestras utilizadas para realizar las medidas fueron preparadas en el momento del ensayo por lo que no es posible realizar un control de la humedad y temperatura del ambiente tal como se realiza en las distintas series de preparaciones estudiadas. Esto conlleva a obtener valores para el tiempo de gelación relativamente cortos, entre uno y dos minutos. Es sabido que el tiempo de gelación para sistemas sol-gel no es una propiedad intrínseca del sol ya que depende del tamaño del recipiente donde se realice y de variables ambientales como la humedad y temperatura [9], estos aspectos son los que estarían predominando en las medidas efectuadas en estos sistemas compuestos.

Como se observa en la Figura 4.9 no hay una variación significativa en los tiempos de gelado que permitan determinar la influencia del contenido de nanopartículas de HA en los sistemas de TiO_2 . Esto se asocia a que las condiciones experimentales presentan mayor variabilidad que el efecto que produce una variación en el contenido de partículas de HA. De todos modos, puede apreciarse un leve aumento en el t_{gel} para las muestras conteniendo HA respecto de la que no posee HA. Este pequeño incremento se atribuye al efecto retardador de la condensación de la matriz de TiO_2 que genera la presencia de las partículas de HA.

El módulo elástico para los geles que contienen 20 y 40 % de HA se ve reducido respecto al gel de dióxido de titanio (T), excepto para la muestra TH4, lo que concuerda con un menor grado de consolidación de la matriz de TiO_2 . Por otro lado, la preparación con 40 % de HA (TH4) presenta un módulo elástico del mismo orden que la muestra sin HA lo que conduce a proponer que una alta carga de HA favorece la integración de la matriz sólida ya sea por una mayor homogeneidad en su distribución o por una mayor interacción superficial entre las partículas y la matriz de TiO_2 en formación.

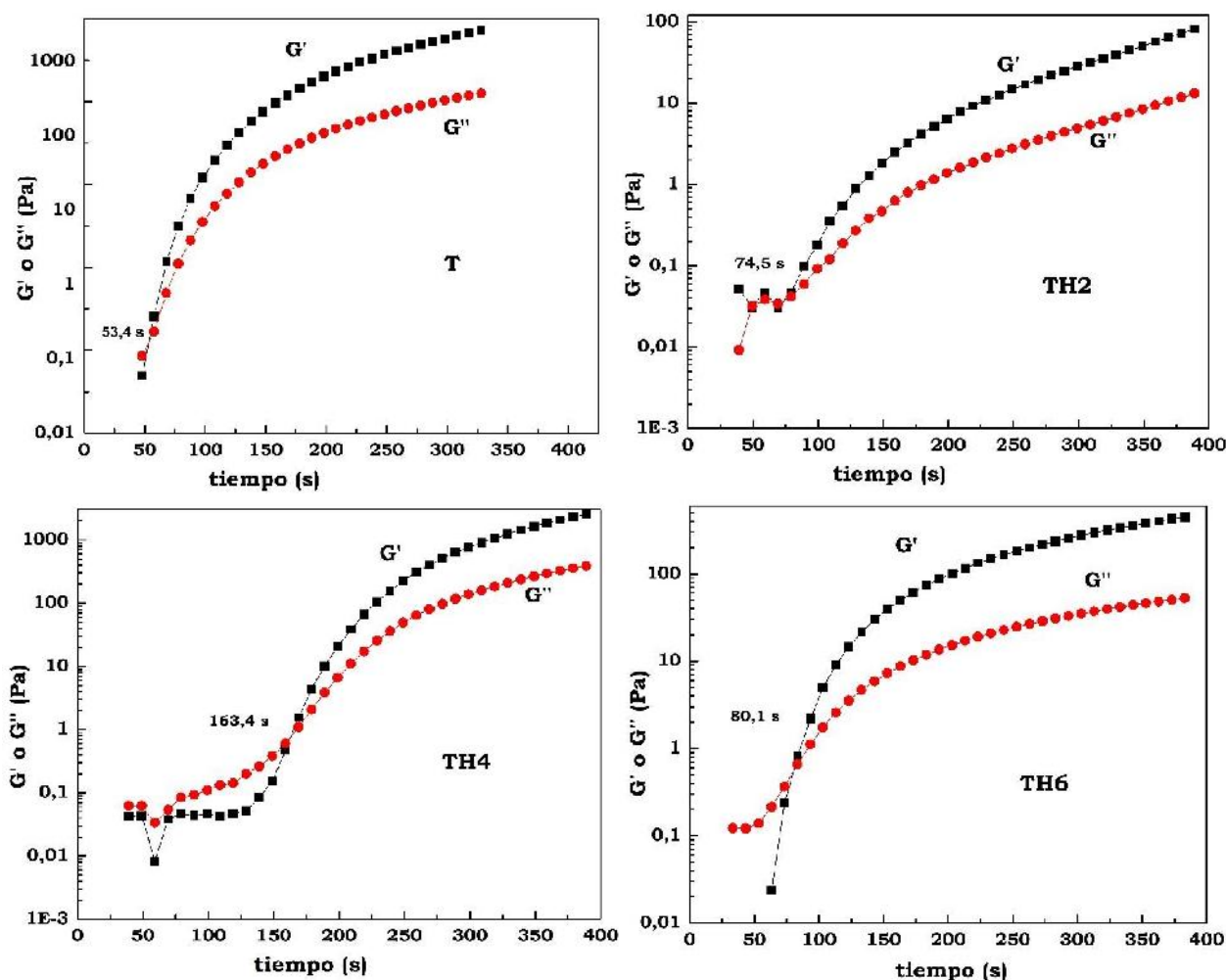


Figura 4.9: Curvas de G' (módulo elástico) y G'' (módulo de pérdida) para los geles compuestos con distinta proporción de nanopartículas de HA.

4.3.6- Quinta serie de ensayos: efecto de nanopartículas de HA y agentes generadores de poro.

En la síntesis por sol-gel la estructura de la matriz se forma manteniendo una porosidad intrínseca debido a la formación de cadenas sólidas que se van consolidando durante la etapa de condensación. La incorporación de moléculas dentro de la mezcla de reacción, que no intervienen en el proceso sol-gel, permite que éstas queden ocluidas dentro de la matriz modulando la porosidad intrínseca en el proceso de formación del gel. Este concepto se aplicó a una serie de preparaciones utilizando las condiciones de formación de la matriz previamente establecidas (condiciones de M13), y evaluando la presencia conjunta de las partículas de HA y un agente formador de poro.

En la Tabla 4.7 se presentan los porcentajes de porógeno y de nanopartículas de HA incorporados a las distintas preparaciones junto con la característica del gel

obtenido. Las sustancias ensayadas como agentes porógenos fueron Tritón X-100 (T) o polivinilpirrolidona (P).

Tabla 4.7: Condiciones de síntesis y características del producto para la quinta serie de ensayos.

Muestra	Porógeno	% m/m Porógeno	% m/m HA	Característica
T	Tritón	10	--	Estable
TH		10	5	Estable
P1	Polivinil-pirrolidona	10	--	Estable
P1H		10	5	Estable
TP3		30	--	Estable
TP3H2		30	20	Estable
TP3H4		30	40	Estable
TP3H6		30	60	Estable
TP4H4		40	40	Estable
TP4H6		40	60	Estable

En primera instancia se evaluó la incorporación de una pequeña proporción de agente porógeno con el fin de obtener datos comparativos entre el uso de Triton X-100 (TTX) y polivinilpirrolidona (PVP). Se observó que las preparaciones con TTX, presentaron geles quebradizos y poco consistentes.

Mientras que, las preparaciones que contienen PVP en mayor proporción dieron origen a geles bien conformados, translúcidos y de consistencia estable. Los tiempos de gelación resultaron relativamente cortos, entre 3 y 10 minutos. En todos los casos los geles presentaron contracción durante el período de envejecimiento. En las muestras conformadas en moldes cilíndricos se observó un 25 % de reducción del diámetro durante los tres primeros días de almacenamiento. No se registraron diferencias significativas en la contracción debido a las distintas proporciones de HA y/o agente porógeno. La determinación del diámetro de muestra (gel compuesto) conlleva un error de medición del orden de los mm, lo que no representa una medida rigurosa para evaluar su variación en función del contenido de porógeno.

Con el fin de evaluar la influencia del agente porógeno en el proceso de formación del gel compuesto se realizaron ensayos reológicos sobre las muestras con 30% de PVP sin agregado de HA y con 40% m/m de HA.

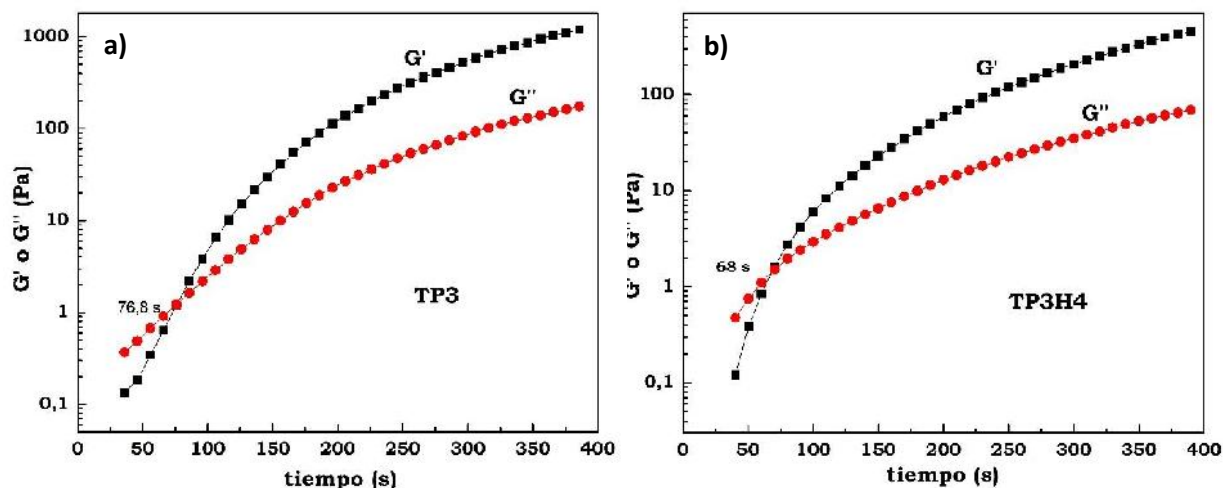


Figura 4.10: Curvas de G' (módulo elástico) y G'' (módulo de pérdida) para los geles compuestos con a) 30% de PVP (TP3) y b) con 30% de PVP y 40% de HA (TP3H4)

En la literatura se encuentran algunos estudios que se focalizan en la evolución del sol hasta llegar a su punto gel. En esta temática, son pocos los investigadores que trabajan en la evolución del gel, ya que las reacciones de hidrólisis y condensación son rápidas y en algunos casos ocurren de forma simultánea, dificultando el seguimiento de la evolución estructural del gel, ya que el punto de gel de cualquier sistema es extremadamente difícil de medir con precisión, aunque cualitativamente resulta sencillo de observar y de definir [94]. Se han implementado diversas técnicas experimentales para estudiar la evolución del sol a gel [94,96], entre ellas se destacan las medidas reológicas, la resonancia magnética nuclear, la espectroscopía Raman, UV-visible, análisis termogravimétricos, dispersión de rayos X y neutrones. Las mismas dan indicios de la evolución de sol a gel llevando un seguimiento de las transiciones y evolución estructural y química de los componentes. A su vez, sigue siendo difícil determinar el tiempo o punto gel exacto de los sistemas que son estudiados. [164–168]

Recientemente, Marchi [169] desarrolló una metodología experimental basada en el análisis de la desexcitación radiactiva y no radiactiva de sondas fotofísicas seleccionadas para registrar los cambios en la estructura molecular del sistema durante su evolución de sol a gel. En su trabajo utiliza la técnica de anisotropía de fluorescencia y espectroscopía optoacústica, complementarias con mediciones de parámetros macroscópicos y con espectroscopías convencionales (turbidimetría, FT-IR). Su trabajo demuestra que las técnicas fotofísicas, proveen herramientas para el seguimiento de la transición sol-gel y para comparar el grado de entrecruzamiento

de redes de TiO_2 , siendo clave la elección de sondas apropiadas. [169] Estos precedentes muestran la gran dificultad que presenta la evolución de sol a gel para ser estudiado, requiriendo un equipamiento altamente especializado.

Finalmente, podemos concluir este análisis señalando que es necesario recurrir a técnicas muy especializadas para realizar mediciones que representen la verdadera transición de sol a gel. En particular cuando los sistemas se formulan con más complejidad, como es el caso de agregados de nanopartículas de HA, y la incorporación de moléculas formadoras de poros, se requiere el desarrollo de sondas específicas para poder realizar medidas rigurosas de la transición sol-gel, que quedan fuera del alcance de este estudio.


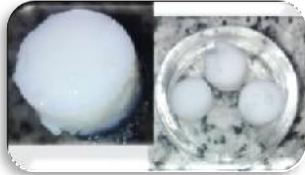




4.4. Morfologías para la conformación de las muestras

Los materiales de este estudio se obtuvieron a partir de las condiciones de síntesis establecidas previamente, conformados con tres tipos de morfologías diferentes con el fin de optimizar su manipulación para los tratamientos y medidas de caracterización posteriores (como las etapas de secado con CO_2 supercrítico y los ensayos *in vitro* con células).

Las geometrías utilizadas fueron:

- **Rodillos:** geometría cilíndrica con diámetro pequeño, $d_1 = 0,8$ y $1,5$ cm, y altura $h = 12$ mm (tabla 4.8)). Estas morfologías fueron obtenidas utilizando un sacabocado. A partir de una masa de gel obtenido en un recipiente de $5,4$ cm de diámetro se procedió a extraer muestras de gel con un sacabocado de vidrio. Las muestras con esta morfología se utilizaron para realizar ensayos de secado con CO_2 supercrítico, difracción de DRX, espectroscopía Raman, FT-IR y SEM.
- **Pastillas:** geometría cilíndrica con diámetro grande, $d_2 = 2,8$ cm, y altura $h = 4$ mm. Las muestras con morfología de pastillas fueron formadas en recipientes plásticos con el fin de obtener una forma plana adecuada fundamentalmente para realizar los ensayos *in vitro* de adhesión celular. (tabla 4.7)
- **Prismas:** geometría prismática rectangular, de base cuadrada de 1 cm de lado y de altura $h = 2$ cm. Para obtener esta geometría se diseñó un molde de acrílico con acople que se introdujo en la primera etapa durante la formación de la mezcla de reacción. Esto permitió la formación del gel con el molde dentro de la masa del sol (tabla 4.8). Las muestras con esta morfología fueron utilizadas para realizar los ensayos de secado con CO_2 en condiciones supercríticas.

Tabla 4.8: Diferentes tipos de conformado para las muestras rodillos, pastillas y prismas

Geometría	Molde	Muestra
Rodillos		
Pastillas		
Prismas		

La posibilidad de conformar diversas morfologías para la obtención del gel compuesto permite demostrar la versatilidad que presenta el sistema compuesto estudiado y que conduce a ampliar las posibilidades de fabricación de geometrías más complejas. Actualmente existe interés en otorgarle más potencialidad al sistema si se logra prolongar el tiempo de gelación manteniendo las propiedades viscosas adecuadas para ser procesado mediante una boquilla de impresión 3D.

4.5. Conclusiones parciales

La etapa de formación del gel compuesto de TiO_2 e HA constituye el aspecto principal de la síntesis del material final ya que de la distribución e interacción de y

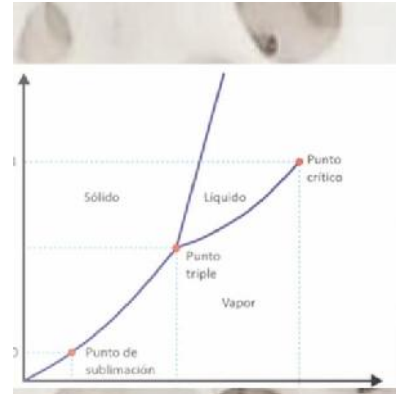
entre sus fases componentes surgen las propiedades finales. El mecanismo de formación de la red sólida a partir del sol, es un proceso complejo, difícil de monitorear, no sólo porque se requieren técnicas especializadas sino por la gran susceptibilidad del sistema frente a las condiciones ambientales y experimentales del ensayo de caracterización que normalmente son distintas a las que se controlan en la síntesis a mayor escala. Este aspecto es sin duda el limitante para el estudio de la evolución del sol a gel en el sistema estudiado.

Más allá de estas dificultades, estos sistemas se prepararon con reproducibilidad mediante un control estricto de las variables de síntesis. Las condiciones óptimas de trabajo son normalmente establecidas mediante la experimentación y tienen la particularidad de permitir pequeños cambios en algunos parámetros sin sufrir una desestabilización drástica. Estas características permitieron introducir nanopartículas de HA en la mezcla de síntesis hasta un 60% en masa respecto del contenido final de TiO_2 . Con el mismo criterio, y verificando las condiciones de síntesis por etapas, fue posible introducir en la preparación hasta un 40 % en masa de agentes moduladores de la porosidad.

La naturaleza del gel compuesto obtenido en cortos tiempos de gelación (entre 5 y 10 minutos) permitió modelar diversas morfologías para la pieza final del material. En este aspecto se logró obtener tres tipos de piezas diferentes para las muestras del material compuesto de TiO_2 -HA, a saber, cilindros, pastillas y prismas, que permitieron desarrollar con mayor facilidad los ensayos de secado y caracterización.

Capítulo V

***Secado de geles
precursores de TiO_2 y
sistemas compuestos
 TiO_2 -HA con CO_2 en
condiciones
supercríticas***



5.1. Introducción

En general, el método sol-gel trata de la formación de una red sólida nanoestructurada debido a las reacciones de hidrólisis y condensación de un precursor. Se compone principalmente de dos partes: formación de un gel húmedo por reacciones sol-gel y secado del gel húmedo por diversas técnicas.

La primera etapa en la formación de un gel es la obtención de un sol, que es una suspensión de partículas coloidales de tamaño nanométrico. Cuando el sol evoluciona y las partículas que lo forman se unen entre sí para crear una red tridimensional se forma el gel. Durante este período, en primer lugar, las partículas primarias forman una matriz y luego se agregan como partículas secundarias y, por último, se unen en una morfología de collar de perlas [170] (Figura 5.1). Esta etapa se caracteriza por el considerable incremento en la viscosidad del material. Ambas fases, sol y gel, se encuentran íntimamente ligadas y aunque se pueden controlar los procesos que actúan para dar lugar a la transformación de un sol en un gel, las características del sol tendrán un reflejo en las propiedades del gel. Además, los procesos posteriores a la formación del gel, como la etapa de envejecimiento, influirán sobre las características de los productos finales. La estructura final del material puede resultar con porosidad y morfologías muy diferentes.

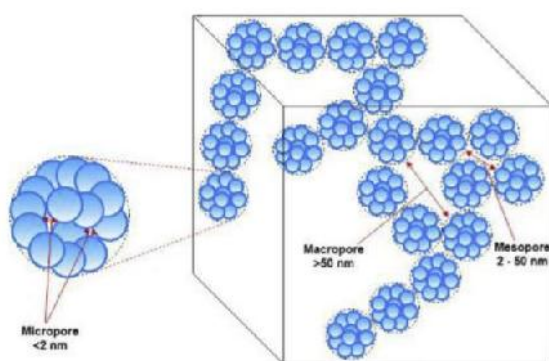


Figura 5.1: Estructura porosa generada a partir de una reacción sol-gel [171].

Durante el proceso de secado, los solventes residuales atrapados dentro de los poros del material se eliminan dejando solo la estructura unida tridimensionalmente. La forma en que se procede al secado del gel es clave para conservar la estructura de la red originada en la etapa de condensación [171]. El secado debe proceder sin dañar el esqueleto sólido y la estructura de los poros. Gran parte de la destrucción

de poros generalmente se genera durante el cruce de los límites de equilibrio de fase debido a la severa tensión superficial formada entre las fases. Existen tres tipos principales de secado utilizados en los procesos de sol gel: tales como secado a presión ambiente, liofilización, y secado supercrítico. Así, el proceso sol-gel da lugar a diferentes productos dependiendo de la forma de eliminación del solvente, y/o de otras sustancias presentes en el solvente, atrapado en la estructura del gel (Fig. 5.2).

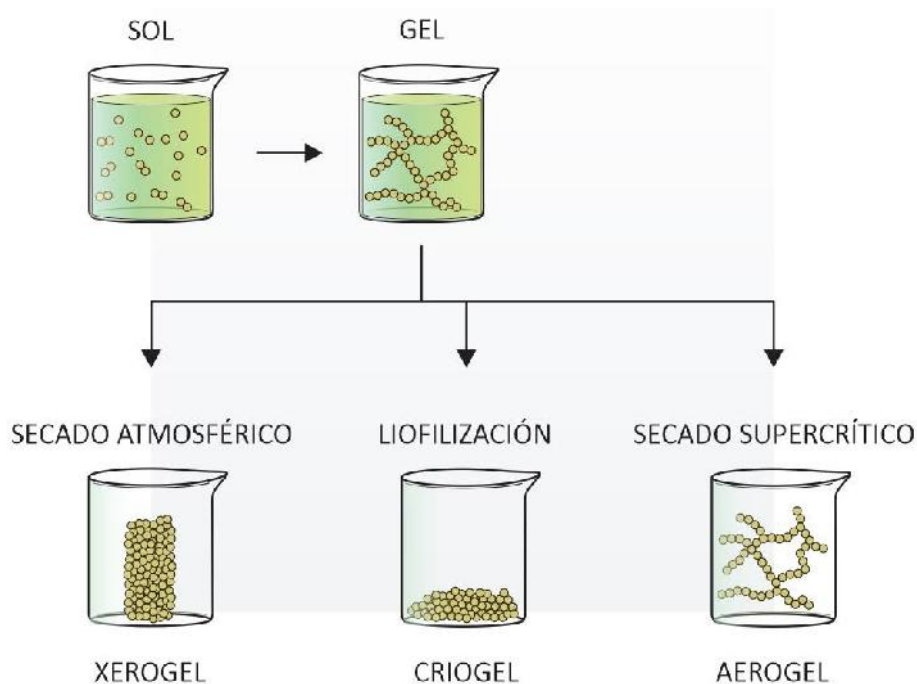


Figura 5.2: Métodos de secado de un gel húmedo para dar: un xerogel, un criogel o un aerogel

En este trabajo se propone el procesamiento del gel para la obtención de un sólido tipo aerogel. La particularidad de los aerogeles es que son materiales altamente porosos (del orden de 80-90 %) con una estructura de poros abiertos, gran superficie específica y consecuentemente muy livianos. Este tipo de estructuras son muy interesantes para diversas aplicaciones, aunque difíciles de obtener utilizando métodos convencionales de procesamiento de materiales [172–174].

5.1.1. Técnicas de secado de geles

El proceso de secado de un gel es una etapa crítica debido a que se requiere eliminar el solvente contenido en los poros sin que se deteriore la microestructura tridimensional generada en el proceso de formación del gel, y evitar así el agrietamiento del gel seco [31].

(1) **Secado convencional:** hace referencia al secado a temperatura ambiente, donde la estabilidad de la red tridimensional se ve afectada. En condiciones óptimas la red tridimensional se encuentra estabilizada cuando el solvente ocupa todo el volumen de esta, produciendo una presión uniforme en todas las direcciones. Al evaporarse el solvente, esta estructura se desestabiliza, dando lugar a un xerogel, el cual presenta una contracción considerable en su volumen en comparación al inicial y muestra la aparición de grietas o fracturas en la estructura que pueden provocar el colapso de esta [172,174].

El secado de un gel a presión atmosférica da lugar a la formación de un menisco en un sistema de dos fases (líquido-vapor) en los poros de la estructura, lo que origina fuerzas capilares en las paredes de los poros que pueden alcanzar hasta los 100-200 MPa. Estas fuerzas dependen de la tensión superficial del disolvente, de su ángulo de contacto o del tamaño de poro, las cuales se vuelven más intensas conforme los poros disminuyen de tamaño. Por lo tanto, a medida que la fase líquida se evapora, la estructura sólida que forma el gel se contrae, ocupando el volumen que ocupaba anteriormente el líquido, y al disminuir el radio de los poros la presión capilar aumentará significativamente provocando que, si se tienen poros vecinos con otros radios, se genere una diferencia de presión mayor y por ende el agrietamiento, ruptura o colapso de la estructura (Figura 5.3) [173,175,176].

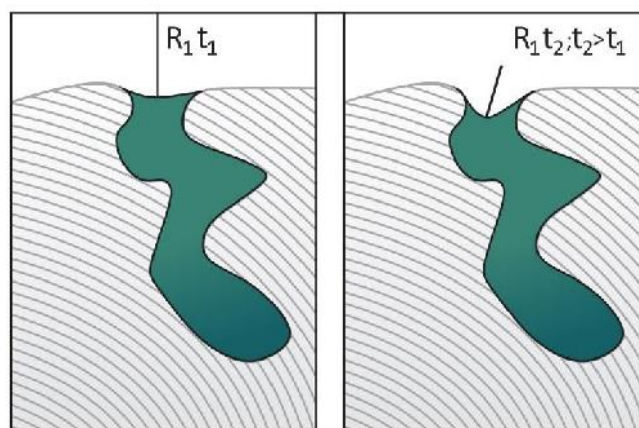


Figura 5.3. Contracción debida a las fuerzas capilares en poros de diferentes radios durante el proceso de secado convencional [174].

Específicamente durante la evaporación del disolvente contenido en el gel, la curvatura de la interfaz vapor-líquido cambia, disminuyendo con el tiempo. (Fig. 5.3). Esto da lugar a que las fuerzas capilares se manifiesten con mayor intensidad. La

diferencia de presión entre la fase líquida y la de vapor puede expresarse por la ecuación de Laplace:

$$\Delta P = \frac{-\sigma \cos\theta}{R} \quad \text{Ec. 5.1}$$

Donde σ es la tensión superficial interfacial líquido/vapor, R es el radio del menisco y θ es el ángulo de contacto en el que la interfaz líquido/vapor se encuentra con la superficie sólida. Por consiguiente, la estructura del gel está sometida a tensiones de compresión en distintos puntos. Debido a la alta presión capilar inducida por la evaporación del disolvente y la fragilidad de la estructura del gel, se producen contracciones y grietas. Consecuentemente, el gel seco presentará una reducción de las propiedades texturales.

No obstante, es posible reducir la presión capilar inducida durante el secado mediante la utilización de solventes con baja tensión superficial. (Ec. 5.1) En la Figura 5.4 se muestran las fuerzas capilares inducidas por diferentes solventes en función del radio de poro, donde se observa que efectivamente se pueden modificar las fuerzas capilares si se cambia de solvente.

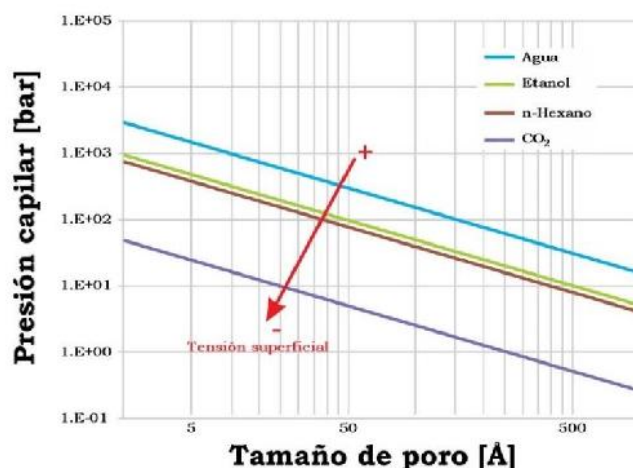


Figura 5.4. Presión capilar de diferentes solventes en función del tamaño de poro [174].

Sin embargo, se puede observar que, si el tamaño de poro es pequeño, las fuerzas capilares pueden alcanzar varios miles de bares, resultando en una distribución no homogénea de las fuerzas que actúan sobre el frágil gel poroso, lo que conduce definitivamente a la destrucción de la red del gel.

(2) Secado por liofilización: consiste en bajar la temperatura del gel por debajo de la temperatura de cristalización del disolvente y luego eliminar a éste como vapor reduciendo la temperatura (sublimación). El producto final de este proceso se llama criogel. Sin embargo, la liofilización presenta algunos inconvenientes tales

como lenta tasa de sublimación, el intercambio de solvente que puede ser requerido y el posible aumento de volumen después de la cristalización. Esta expansión del volumen induce tensiones en el gel dirigidas desde el exterior hacia el interior, dando lugar a contracciones y roturas de las capas del exterior como partículas pequeñas. Además de su alto costo por equipamiento, requerimiento energético y los largos tiempos de procesamiento [31].

(3) Secado con fluido supercrítico: el secado de geles mediante fluidos supercríticos (FSC) se ha convertido en una alternativa atractiva, ya que logra superar los problemas encontrados con los métodos de secado convencionales para preservar la alta porosidad abierta y las propiedades texturales del gel húmedo en forma seca. El proceso de secado con FSC conduce a la presencia de mezclas de fluidos supercríticos en los poros del gel sin restos de ninguna fase líquida. Por lo tanto, este procedimiento de secado evita la presencia de cualquier transición intermedia líquido-vapor y tensiones superficiales en los poros del gel, evitando que la estructura del gel colapse (es decir, cambios en el nivel macroscópico) durante la eliminación del solvente [32,177].

De acuerdo con lo descrito previamente, el secado con FSC resulta la metodología más adecuada si se pretende conservar la estructura de gel generada. Más aún, considerando que los sistemas compuestos desarrollados en este trabajo de tesis contienen interacciones entre la matriz de gel de TiO₂ formada y las nanopartículas de HA incorporadas, es necesario implementar una etapa de secado donde se conserve la estructuración original.

5.2. Secado de geles utilizando un fluido supercrítico.

Un fluido supercrítico es una sustancia que se encuentra a una presión superior a su presión crítica (P_c) y a una temperatura superior a su temperatura crítica (T_c). Algunas propiedades de las sustancias varían ampliamente en un rango extenso de temperaturas y presiones alrededor del punto crítico, como la densidad, viscosidad, difusividad, capacidad calorífica, conductividad térmica y constante dieléctrica. Los valores de ciertas propiedades de los fluidos supercríticos son intermedios entre las de los líquidos y las de los gases. En particular, la densidad es la propiedad responsable del poder disolvente de estos fluidos. La baja viscosidad dota a los fluidos supercríticos de una gran facilidad de transporte y de una velocidad de transferencia de masa más elevada. Por otra parte, la elevada difusividad y la tensión superficial prácticamente nula permiten una mejor penetración en las matrices sólidas.

El siguiente esquema (Figura 5.5) resume las características generales de los fluidos supercríticos [178].

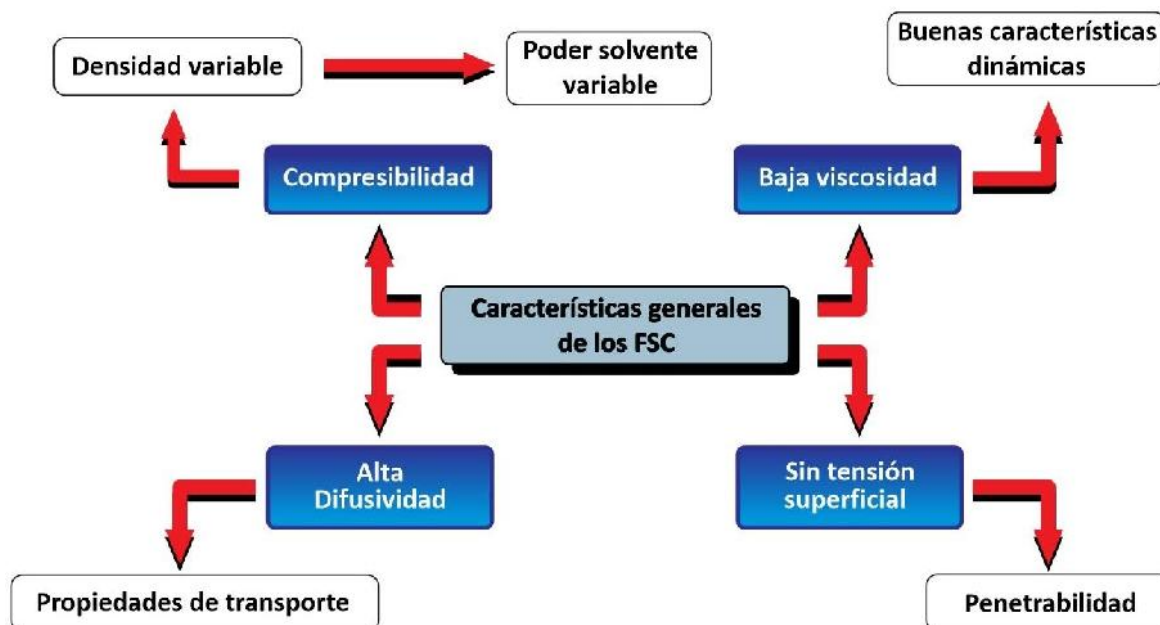


Figura 5.5: Características que presenta un fluido supercrítico.

5.2.1. Métodos de secado supercrítico

Es posible diferenciar dos métodos generales cuando se aplica un FSC a un proceso de secado: 1) secado supercrítico a alta temperatura (HTSCD) y 2) secado supercrítico a baja temperatura (LTSCD) [174]. La Tabla 5.1 muestra las condiciones de presión y temperatura críticas de algunos solventes. Puede observarse que algunos de ellos tienen valores más bajos que otros de temperatura crítica. En consecuencia, solventes como el metanol, etanol y acetona siguen un mecanismo de HTSCD. Mientras que el dióxido de carbono, metano, etano, propano, etileno y propileno se encuentran entre los fluidos que siguen al LTSCD.

Tabla 5.1: Condiciones críticas de algunos solventes

Solvente	Temperatura crítica [K]	Presión crítica [MPa]	Densidad crítica [g/cm ³]
Dióxido de carbono (CO ₂)	304.1	7.38	0.469
Agua (H ₂ O)	647.1	22.06	0.322
Metano (CH ₄)	190.4	4.6	0.162
Etano (C ₂ H ₆)	305.3	4.87	0,203
Propano (C ₃ H ₈)	369.8	4.25	0,217
Etileno (C ₂ H ₄)	282.4	5.04	0.215
Propileno (C ₃ H ₆)	364.9	4.6	0.232
Metanol (CH ₃ OH)	512.6	8.09	0.272
Etanol (C ₂ H ₅ OH)	513.9	6.14	0.276
Acetona (C ₃ H ₆ O)	508.1	4.7	0.278

5.2.1.1. Secado supercrítico a alta temperatura (HTSCD)

El HTSCD es un método que consta de tres etapas principales: en la primera se coloca el gel con una cantidad excesiva de solvente en un autoclave. La temperatura del sistema se eleva lentamente para evitar cruzar la interfaz gas/líquido. Luego, se aumenta la presión de la mezcla. El punto de secado se logra cuando se alcanza la condición supercrítica. A continuación, se mantienen las condiciones del proceso durante un tiempo. En esta situación, todos los líquidos del gel se transformarán a la condición supercrítica y tendrán libre movilidad. En la segunda etapa la presión del sistema se reduce lenta e isotérmicamente mediante la apertura de una válvula del autoclave. Y finalmente, la tercera etapa se inicia cuando a presión ambiente, el autoclave se enfría hasta temperatura ambiente. El proceso puede representarse en un diagrama P vs T como el de la Figura 5.6, donde el solvente utilizado es metanol.

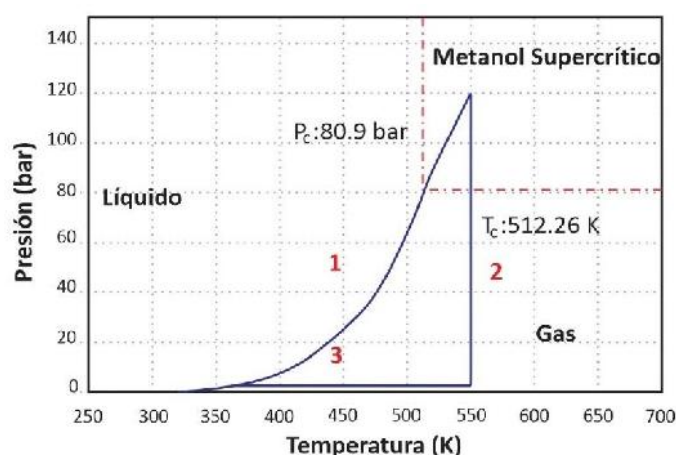


Figura 5.6: Esquema del secado supercrítico del método HTSCD utilizando metanol como ejemplo.

El secado del gel a altas temperaturas puede ser beneficioso para algunos sistemas, aunque la inflamabilidad del solvente orgánico y la degradación del gel pueden ser algunas de las limitaciones más importantes.

5.2.1.2. Secado supercrítico a baja temperatura (LTSCD)

Si bien muchos solventes pueden clasificarse dentro de la clase de solventes que permite un LTSCD, el que se usa principalmente es el dióxido de carbono, dado que posee una temperatura y una presión críticas relativamente fáciles de alcanzar. En el caso del CO₂, la región supercrítica se logra a presiones y temperaturas moderadas ($T_c=304.2\text{K}$, $P_c=7.38\text{MPa}$); así, al utilizar dióxido de carbono supercrítico (CO₂-SC), es posible realizar los procesos cerca de la temperatura ambiente, evitando la degradación de sustancias termolábiles, y ofreciendo un medio adecuado para sustancias fácilmente oxidables [179]. La inflamabilidad de algunos otros posibles solventes dificulta su uso para estas aplicaciones.

El secado de geles con CO₂-SC consiste básicamente en una extracción del solvente contenido en los poros del gel. Un procedimiento típico para el secado supercrítico con CO₂-SC se representa en la Figura 5.7.

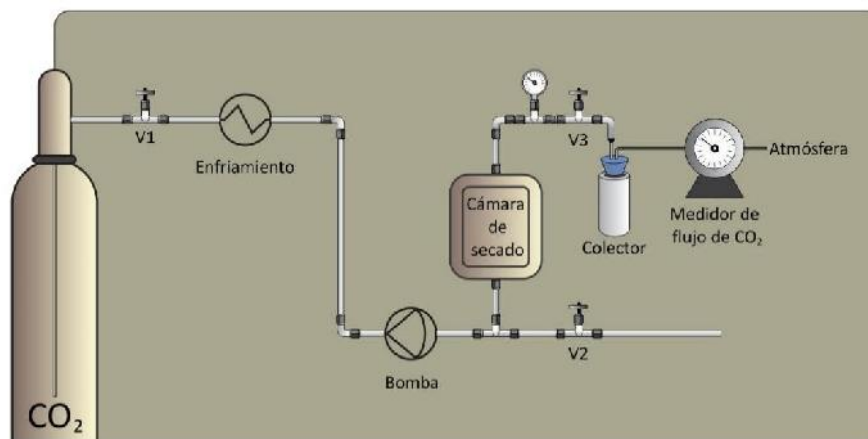


Figura 5.7: Equipamiento básico para procesos de extracción con FSC.

Brevemente, el gel húmedo se carga en la cámara de secado (extractor) y se pone en contacto con CO₂ a una presión y temperatura por encima de su punto crítico. El régimen de contacto entre el gel y el fluido supercrítico determina el tipo de secado supercrítico. Si la cámara de secado se carga con CO₂-SC en lotes se denomina *secado supercrítico estático*; si se hace circular un flujo continuo de CO₂-SC durante todo el proceso se nombra *secado supercrítico continuo*. Generalmente se

usa una temperatura de funcionamiento moderada (~ 313 K). El flujo de salida de CO₂ del extractor, ya enriquecido con el solvente del gel, se expande parcialmente a través de una válvula (V3). Debido a la expansión del fluido, la presión del fluido disminuye y el scCO₂ se convierte en CO₂ gaseoso. El menor poder de solvatación del CO₂ gaseoso induce la separación de fases en el colector: una corriente gaseosa rica en CO₂ y una fase líquida rica en el solvente extraído. Después de cierto tiempo, el proceso de extracción se detiene y la cámara de extracción se despresuriza. Se obtiene así un gel seco que se denomina aerogel.

5.3. Dióxido de carbono como fluido supercrítico

Los procesos que utilizan CO₂-SC son adecuados para el desarrollo de productos con alta pureza (sin solventes, y sin necesidad de pasos adicionales de purificación), cumpliendo con los estándares de calidad y seguridad que exigen en la actualidad las industrias, especialmente las alimenticias y del área farmacológica [180,181]. El CO₂-SC scCO₂ es categorizado como un “solvente verde”, es decir un solvente seguro para buenas prácticas de elaboración (GMP), no produce contaminación ni deja residuos tóxicos, y además evita la degradación de productos termolábiles.

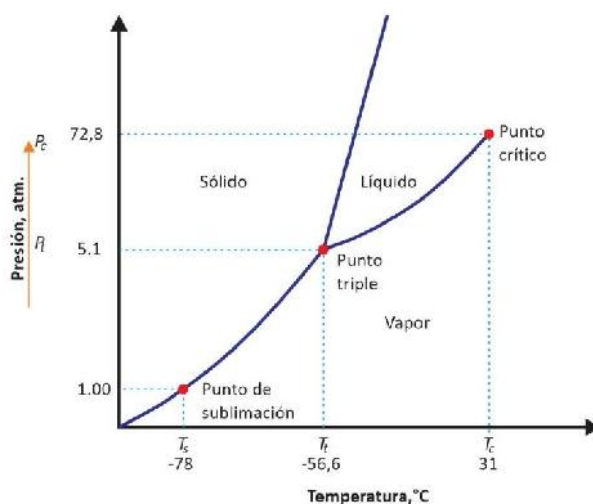


Figura 5.8: Diagrama de fases para el dióxido de carbono ($M= 44$ g/mol)

La Figura 5.8 muestra el diagrama de fases para el CO₂ donde además de visualizar el punto crítico puede observarse que la sustancia se encuentra como gas a presión atmosférica en un rango amplio de temperatura. Estas características permiten la eliminación del CO₂ fácilmente cuando se despresuriza el sistema en los

procesos de secado. La fase supercrítica de CO₂ presenta propiedades características y únicas, intermedias entre las de un líquido y las de un gas (Tabla 5.2). Dichas propiedades se ven reflejadas en una densidad cercana a la de un líquido, una baja viscosidad y un coeficiente de difusión muy superior al del líquido, lo que favorece su salida de los poros de un gel húmedo.

Tabla 5.2: Propiedades de las fases líquida, gaseosa y supercrítica del CO₂

Propiedad	Gas	SCF	Líquido
Densidad [kg m ⁻³]	0,6-2	200-500	600-1600
Viscosidad dinámica μ [mPa.s]	0.01-0,3	0,01-0,03	0,2-3
Viscosidad cinemática η [10 ⁶ m ² .s ⁻¹]	5-500	0,2-0,1	0,1-5
Conductividad térmica λ [W/mK]	0.01-0,025	máxima	0,1-0,2
Coefficiente de difusión D [10 ⁶ m ² .s ⁻¹]	10-40	0,07	0,0002-0,002
Tensión superficial σ [dyn/cm ²]	---	---	20-40

Los procesos de secado con CO₂ supercrítico se han convertido actualmente en una herramienta poderosa no sólo en el área farmacéutica o alimenticia sino también en otras áreas de aplicación donde puede implementarse como tecnología innovadora para la obtención de materiales con propiedades específicas. Por ello, en este trabajo se propone el estudio del secado con CO₂ supercrítico de los geles obtenidos previamente (geles de TiO₂ y geles compuestos de TiO₂-HA) según lo descrito en el Capítulo IV.

5.4. Metodología

5.4.1. Secado de geles compuestos

Todos los experimentos de secado se realizaron en un equipo de alta presión a escala de laboratorio (HPVC500, Eurotechnica Gmb). El equipo empleado consta básicamente de un sistema de impulsión de CO₂-SC (Bomba), un reservorio donde se coloca la muestra (Extractor de 100 mL) con ventanas de zafiro, una válvula de despresurización (V3), un colector de líquidos (Colector de 50 mL), y un medidor de flujo de CO₂. Además, se dispone de controladores de temperatura en las distintas secciones de circulación de CO₂. El diagrama de flujo del equipamiento se muestra en la Figura 5.7.

En un ensayo de secado la muestra de gel se coloca en el extractor, luego de cerrar el sistema se llena con CO₂ a 60 bar de presión. A continuación, se fija la temperatura de trabajo y se eleva la presión hasta el valor seleccionado para la extracción. Se deja estabilizar el sistema cerrado durante 15-20 minutos y posteriormente se realiza la extracción supercrítica del líquido contenido en el gel a un flujo de CO₂ de 2 L/min y tiempo de extracción de 60-80 minutos

La Tabla 5.3 presenta la composición de los geles seleccionados para ser sometidos al proceso de secado y la nomenclatura utilizada para cada muestra.

Tabla 5.3. Composición de los geles compuestos sometidos al proceso de secado con CO₂-SC

Composición del gel			Nombre de la muestra
TiO ₂ (g)	HA (g)	PVP (g)	
1	--	--	T
1	0,2	--	TH2
1	0,4	--	TH4
1	0,6	--	TH6
1	--	0,3	TP3
1	0,2	0,3	TP3H2
1	0,4	0,3	TP3H4
1	0,6	0,3	TP3H6
1	0,4	0,3	TP3H4-C
1	0,4	0,4	TP4H4
1	0,6	0,4	TP4H6

En primer lugar, se estudió la influencia de la temperatura y de la presión en el proceso de secado, con el fin de evaluar las mejores condiciones de eliminación del solvente y del agente porógeno (PVP) contenido en el interior de los geles compuestos. Se utilizaron muestras conformadas en forma de prismas y de pastillas según lo descrito en el Capítulo IV. Se obtuvieron curvas de extracción para las muestras TP3 (Figura 5.9) y TP3H4 (Figura 5.10) a temperaturas de 60 y 90 °C y a dos presiones, P=250 bar y P= 400 bar. Dichas curvas registran el porcentaje en masa promedio del líquido extraído a intervalos de aproximadamente 5 minutos en función de la masa de dióxido de carbono que fluyó a través de la muestra con geometría de pastilla.

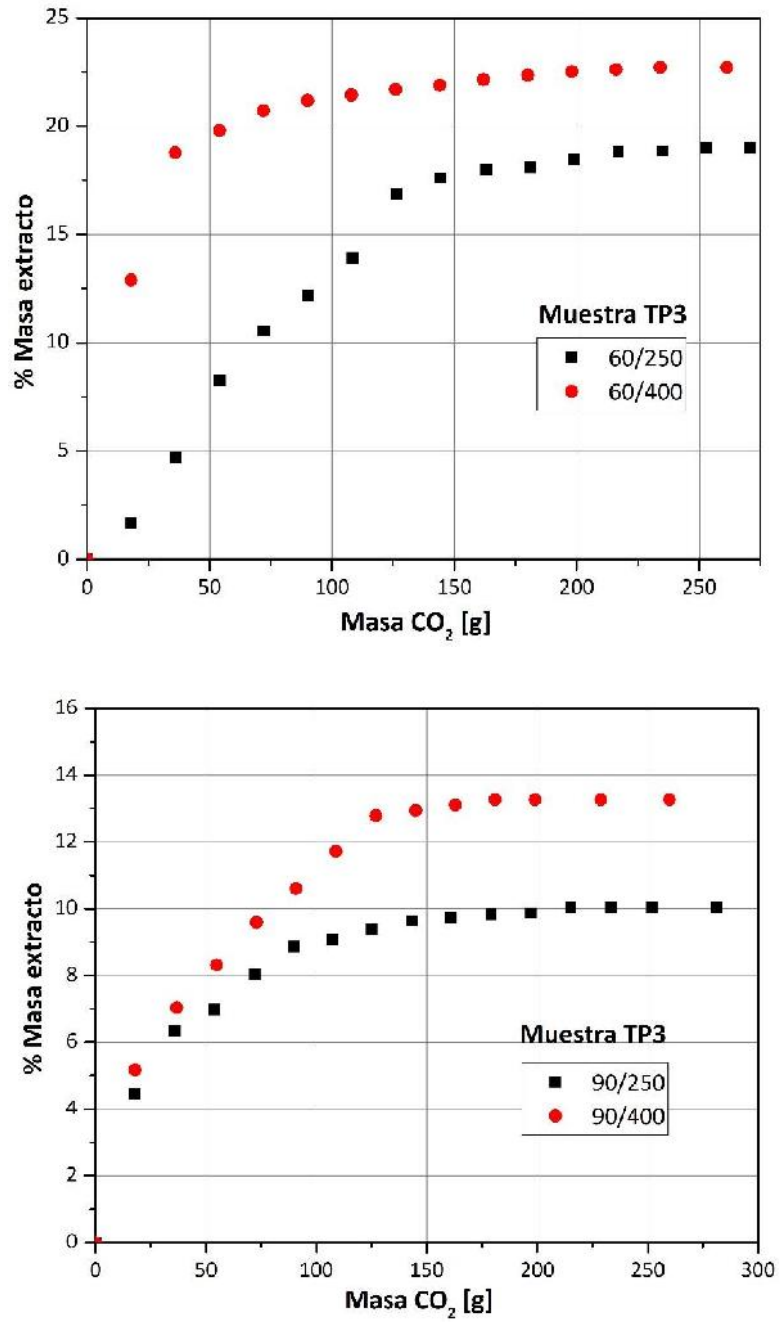


Figura 5.9: Curvas de secado con CO₂-SC para los geles de TiO₂ con 30% m/m de PVP
Muestra TP3: **a)** T=60°C; **b)** T= 90°C.

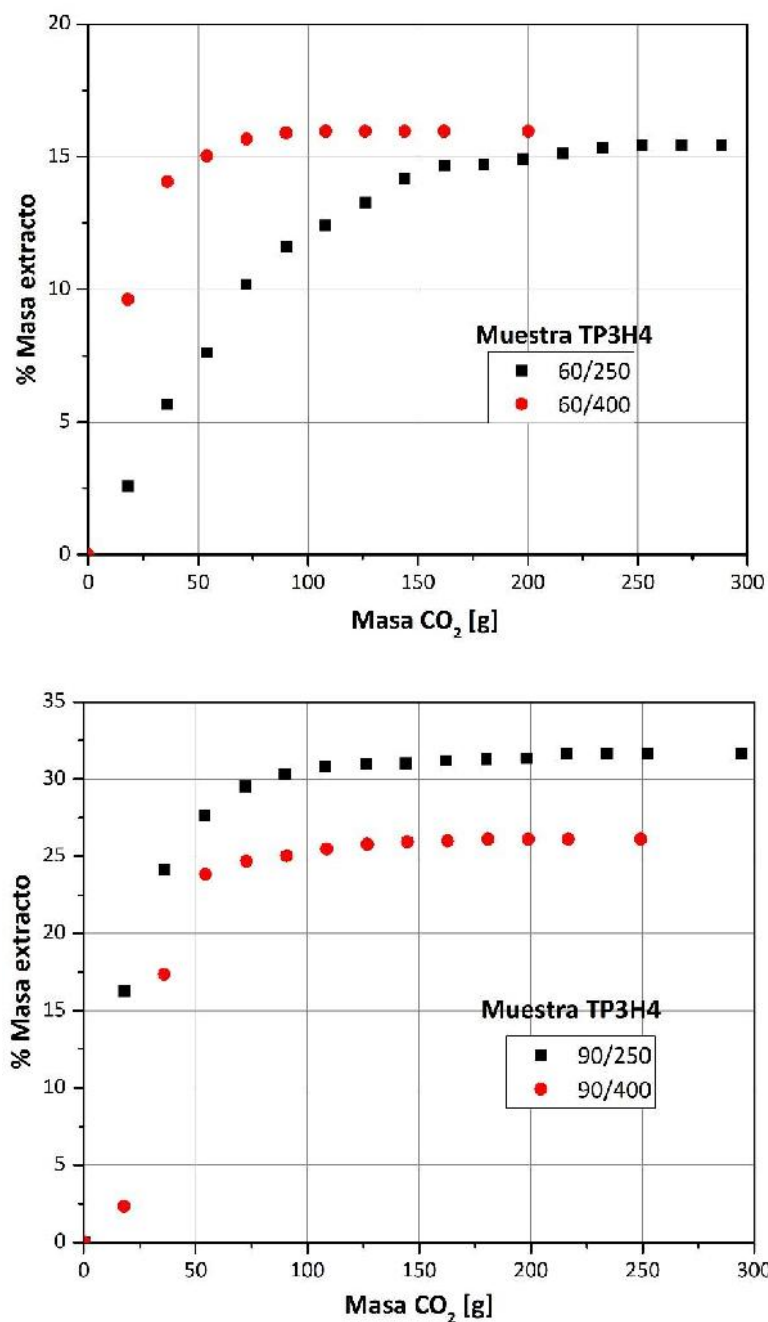


Figura 5.10: Curvas de secado con CO₂-SC para los geles compuestos de TiO₂ con 30% m/m de PVP y 40% m/m HA, Muestra TP3H4: **a)** T=60°C; **b)** T= 90°C.

Las curvas obtenidas del secado de geles asistido por CO₂-SC mostraron perfiles dependientes del tiempo, es decir, un proceso en estado no estacionario [178]. La cantidad de líquido extraído que se acumula durante el curso de la extracción sigue en principio la curva esquemática de la Figura 5.11.

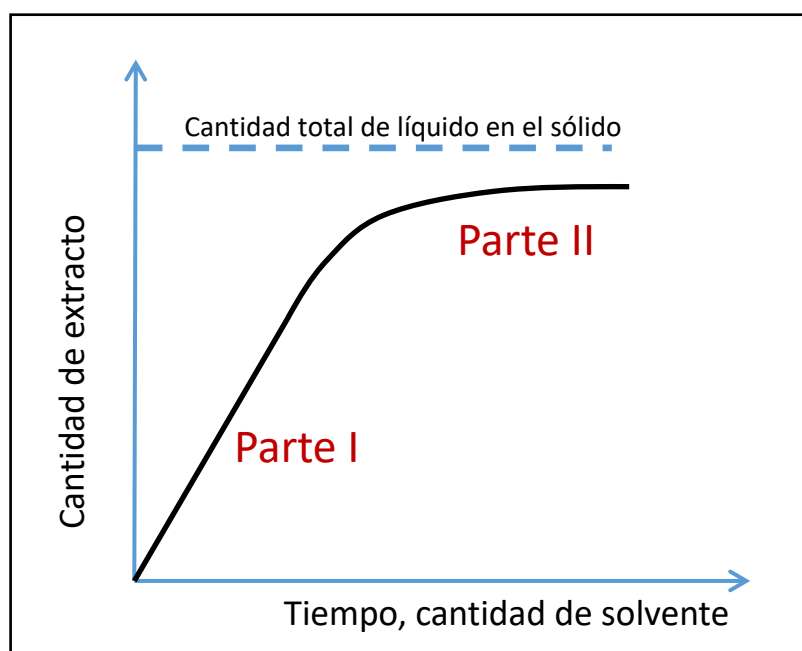


Figura 5.11: Curva de extracción integral. Cantidad total de extracto vs tiempo de extracción. Parte I es lineal; Parte II es no-lineal y puede aproximarse a un valor límite, dado por la cantidad de sustancia extraíble.

El gradiente de la primera parte del gráfico puede estar dado por la solubilidad de equilibrio. Entonces, a partir de este gradiente se puede determinar la solubilidad del líquido en equilibrio con CO₂. Por otro lado, la línea recta puede ser causada por la resistencia constante de transferencia de masa y no es prueba de que se obtenga la solubilidad de equilibrio durante la extracción. La curva para la cantidad total de extracto es una curva de respuesta al flujo de solvente supercrítico que ingresa al extractor. La curva de respuesta depende de los parámetros del proceso y de todos los fenómenos que ocurren durante la extracción en el lecho fijo. Algunos de estos fenómenos son: distribución radial del solvente en la entrada, mezcla inversa del solvente supercrítico durante el flujo a través del lecho fijo causado por el tamaño desigual, la superficie y la distribución de los sólidos, la autodifusión del solvente y la distribución radial del disolvente.

El significado de la curva de extracción para comparar extracciones en diferentes materiales y en diferentes extractores, es muy limitado debido a los diversos factores que influyen a la curva determinada. Aunque la información de esta curva y la que puede derivarse de ella es útil para comparar los resultados de extracciones de una serie de experimentos realizados en el mismo sustrato y en el mismo equipo de extracción.

Las curvas obtenidas para los geles compuestos TP3 y TP3H4 muestran perfiles similares al descrito en la Fig. 5.11. La primera parte de la curva corresponde a una tasa de extracción constante. La segunda parte forma un gráfico que se acerca a un valor límite que viene dado por la cantidad total de sustancias extraíbles.

Después de un período inicial de tiempo (primeros minutos) en el que se eliminó más del 60% del líquido determinado experimentalmente presente en el gel, la velocidad de secado se ralentiza especialmente para la eliminación del último 5% de líquido restante en el gel.

Los geles son una clase especial de materiales caracterizados por una alta porosidad y superficie específica. El secado de geles asistido por CO₂-SC puede verse influenciado por las propiedades estructurales del material y dominado por diferentes resistencias de transferencia de masa con el tiempo como se mencionó previamente [178]. El secado supercrítico implica una transferencia de masa bidireccional de CO₂-SC y el solvente del gel, hacia y desde los poros del gel húmedo [178,182,183].

El mecanismo de transferencia de masa involucrado en el secado supercrítico de geles está influenciado por varios fenómenos que se representan en la Figura 5.12 (hinchamiento, pérdida de líquido, flujo convectivo, difusión). En la primera etapa del proceso, los poros del gel están completamente llenos con el solvente, por lo que puede considerarse una concentración de solvente dentro del gel muy alta. Inicialmente, el CO₂-SC se disuelve en el líquido del poro, lo que conduce a un líquido expandido (Fig.5.12b) y a una pérdida del exceso de volumen de líquido fuera de la red del gel. Por lo tanto, solo se espera que las resistencias de transferencia de masa convectiva influyan en el proceso de secado en este punto.

Luego, el contenido de CO₂ en el líquido que llena los poros del gel aumenta con el tiempo hasta que se alcanzan las condiciones supercríticas para la mezcla fluida que está en los poros (Fig. 5.12c). El solvente será más fácil de extraer cuanto mayor sea su solubilidad en CO₂-SC y más bajo el punto crítico de la mezcla solvente-CO₂ [184]. Finalmente, a medida que avanza el proceso de secado, la cantidad de solvente en el gel disminuye y el papel de la resistencia al transporte de masa en el sustrato sólido (es decir, la difusión) (Fig. 12d) se vuelve predominante hasta que el gel esté completamente seco.

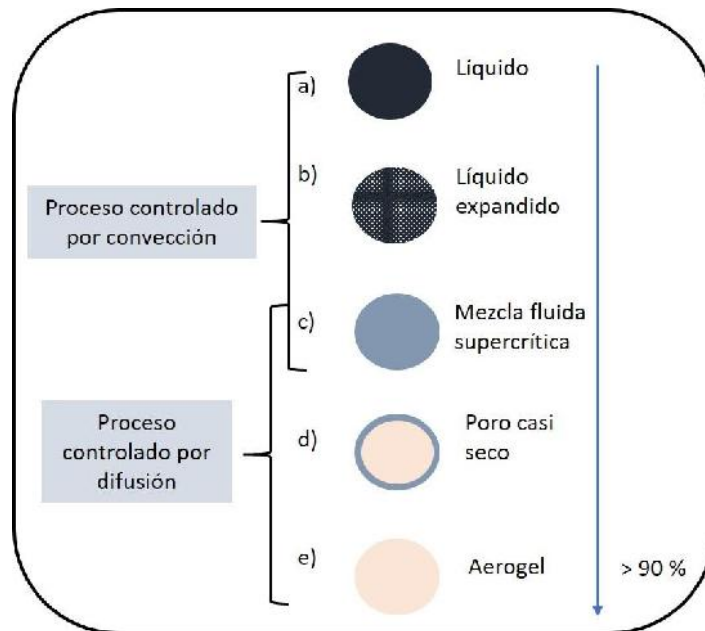


Figura 5.12: Evolución del secado supercrítico de geles húmedos:

(a) poro lleno del solvente líquido del gel, **(b)** poros llenos de líquido expandido, **(c)** poro lleno de mezcla de fluido supercrítico, **(d)** poro con solvente restante principalmente en las paredes, y **(e)** poro seco.

La Tabla 5.4 lista los porcentajes de pérdida de masa que sufren los geles luego del secado supercrítico y también luego del proceso de calcinación a 800°C. Asimismo, se muestran las variaciones en el diámetro de las muestras.

Tabla 5.4: Pérdida de masa y disminución del tamaño de las muestras TP3 y TP3H4 luego del secado con CO₂-SC y del calcinado.

			(1)	(2)	(3)	(4)	(4)-(1)	(5)	(6)
	T (°C)	P (bar)	% Pérdida de masa por secado supercrítico.	% Masa de muestra seca	% Masa de extracto experimental	% Pérdida de masa total por secado y calcificación	% Variación de masa entre muestra calcificada y seca CO ₂ - SC	% Disminución de diámetro por secado CO ₂ -SC	% Disminución de diámetro total por secado y calcificación
TP3	60	250	86,7	13,3	19,0	92,6	5,9	13,7	59,3
		400	86,9	12,9	22,7	92,5	5	10,2	57,8
	90	250	87,1	13,1	10,1	92,2	5,6	8,7	57,0
		400	87,7	12,3	13,3	93	5,3	10,1	57,9
TP3H4	60	250	80,9	19,1	15,4	88,1	7,2	6,2	43,6
		400	91,1	8,9	16,0	94,5	3,4	4,1	46,4
	90	250	87,0	13,0	31,6	91,3	4,3	15,5	46,2
		400	84,6	15,4	26,1	91,1	6,5	21,4	48,9

La composición de los geles sometidos al tratamiento de secado con CO₂-SC contienen 30 % m/m de PVP. Este polímero, ampliamente utilizado como excipiente farmacéutico [185–188], es soluble en agua y en el solvente de reacción [189]. Por ello, al estar solubilizado en el medio de reacción sol-gel, gran parte de él puede ser extraído en el proceso de secado. El % de extracto obtenido para cada muestra es mucho menor que el valor teórico (calculado teniendo en cuenta la masa inicial y final de la muestra luego del secado). Esto puede deberse a que no todo el solvente líquido queda en el vaso recolector, producto del arrastre provocado por el flujo de CO₂ a presión atmosférica. Además, parte del PVP disuelto en el solvente se pierde por adhesión a las paredes del extractor, lo que pudo observarse luego de cada proceso de secado.

El análisis de las curvas de secado para la muestra TP3 (Figura 5.9) nos permite establecer que a P=250 bar, la solubilidad del líquido en CO₂-SC es mayor cuando la temperatura de secado aumenta de 60 a 90 °C. Las muestras TP3 secadas a 60°C y 250 bar presentaron una extracción progresiva y un poco más lenta, lo que beneficia la integridad de la estructura del aerogel. A una presión mayor, P=400 bar, no es tan clara la dependencia de la solubilidad del líquido con la temperatura, aunque se podría indicar que un aumento de temperatura de 60 a 90 disminuye la velocidad de extracción.

Las curvas de extracción para la muestra TP3H4 muestran que a mayor temperatura para el proceso de secado se logra una extracción del líquido más rápida. Esto mismo se ve reflejado al aumentar la presión de 250 a 400 bar.

Estas observaciones dan cuenta de que las mejores condiciones de secado son aquellas que permiten eliminar el líquido del gel de forma más controlada en el tiempo, dando la posibilidad de mantener la estructura porosa del sólido generado por la reacción sol-gel. Esto conduce a establecer que las condiciones óptimas para el secado con CO₂-SC se dan a una presión de 250 bar y a 60 °C. De todos modos, los geles secados en estas condiciones presentaron grietas, las cuales se producen debido a una extracción incompleta del líquido contenido en los poros, lo que concuerda con los registros de masa obtenidos luego del secado con CO₂-SC y del posterior calcinado de las muestras (Tabla 5.3).

Las grietas formadas en las muestras se deben a que la extracción del líquido contenido en los poros del gel no fue completa, quedando residuos de solvente dentro de los poros, lo que provoca fuerzas capilares [190] y que al secarse durante tiempos cortos dan origen a grietas. Como fue mencionado anteriormente, las grietas se originan por la formación de dos fases durante el proceso de despresurización, debido

a que no se dio el tiempo suficiente para el proceso de difusión. Así, el residuo de solvente formó una fase líquida durante la despresurización, que a su posterior evaporación dio lugar a fuertes fuerzas capilares que dañaron la integridad del material final.

El agrietamiento o daño de la estructura de los primeros geles ensayados pudo no deberse sólo al corto tiempo de secado, sino también a los inconvenientes para la preparación de las muestras a secar. Los primeros ensayos se realizaron sobre geles con geometrías obtenidas con sacabocados de dos diámetros ($d_1= 0.8\text{ mm}$, $d_2= 1.5\text{ mm}$). El hecho de realizar una fuerza mecánica sobre el gel para moldearlo originaría un daño o inicio de grietas que, sumado a la incompleta extracción del líquido, produce el colapso de la estructura durante el secado posterior de las muestras. Para solucionar estos inconvenientes, se fabricaron geometrías diversas como fue detallado en el Capítulo IV (conformado de muestras) y también se agregó un exceso de solvente durante el proceso de secado. La Figura 5.13 muestra el aspecto de las muestras luego del proceso de secado con CO₂-SC a 60 °C y 250 bar.



Figura 5.13: Aspecto de los geles compuestos secados a 60°C y 250 bar con CO₂-SC de dos geometrías diferentes a) prismas; b) pastillas.

El resto de los geles compuestos conteniendo el agente porógeno (PVP) y distintas proporciones de HA (Tabla 5.3) se sometieron al proceso de secado con CO₂-SC a 60°C, 250 bar, con exceso de solvente, condiciones experimentales más convenientes para obtener piezas sin fracturas. Los materiales porosos obtenidos fueron analizados mediante TGA y ADT. Además, se analizó la microestructura que presentaron por microscopía electrónica de barrido (SEM).

La Figura 5.14a muestra los análisis térmicos TGA de las muestras T, TH2, TH4 y TH6. Se observa una pérdida de masa de 37% para la muestra T, y pérdidas de 34, 33 y 32,8 % para la serie conteniendo HA, TH2, TH4 y TH6, respectivamente. Estas pérdidas se atribuyen a la eliminación de agua (propia del gel seco y absorbida por humedad ambiente), compuestos orgánicos de síntesis (como ácido acético) y solvente residual. Las curvas de DTA (Fig.5.14b) muestran una señal exotérmica asociada a la combustión de sustancias orgánicas. Además, las muestras que contienen HA presentan una banda centrada en 900 °C asociada a la transformación de fase anatasa-rutilo [191].

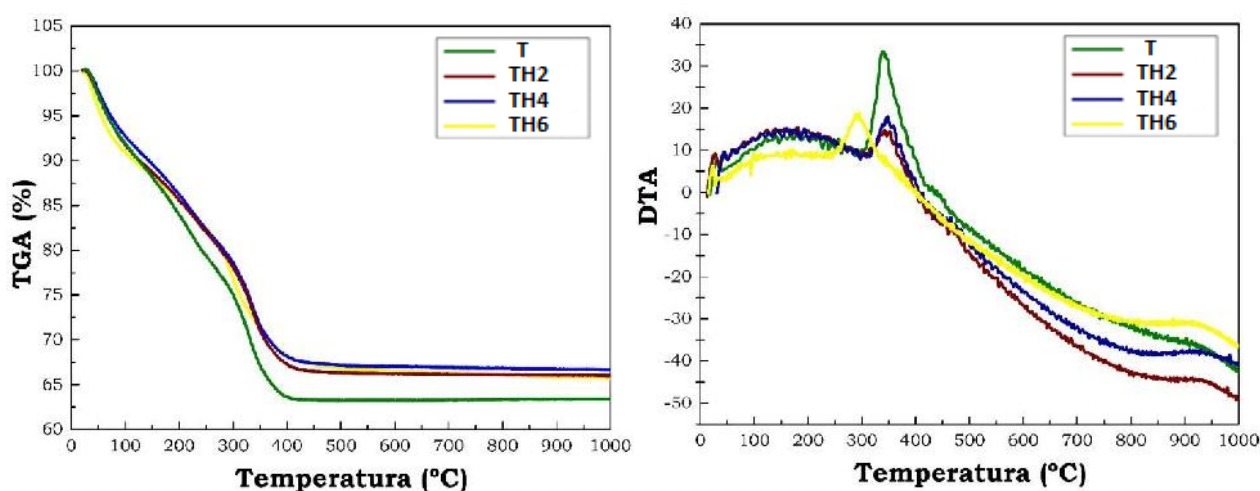


Figura 5.14: TGA y DTA de muestras de TiO₂ (T) y de TiO₂ con diferentes contenidos de HA (TH2, TH4, TH6) luego del secado con CO₂-SC.

Los análisis térmicos de las muestras conteniendo porógeno TP3, TP3H2, TP3H4, TP3H6 se muestran en la Figura 5.15a. En estas muestras se observa una pérdida de masa similar a la encontrada en la serie de muestras sin porógeno. Los porcentajes de pérdida observados son de 37%, 32,5%, 32% y 30% para las muestras TP3, TP3H2, TP3H4 y TP3H6 respectivamente. Similarmente, estas pérdidas son atribuidas a la eliminación de agua, residuos orgánicos y solvente residual de los sistemas. En la Fig. 5. 15b se observan los DTA de las muestras TP3, TP3H4 y TP3H6. Se detecta una banda exotérmica entre los 300 – 341 °C asignada a la combustión de solvente y productos de la hidrolisis, como así también a la combustión del agente generador de poro.

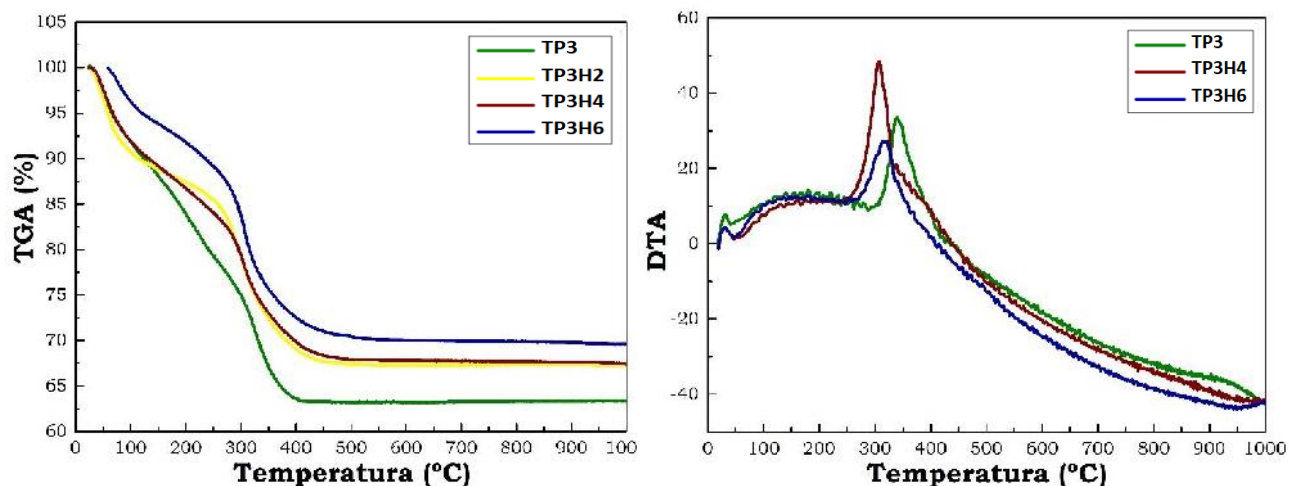


Figura 5.15: TGA y DTA de muestras conteniendo PVP (TP3) y diferente proporción de HA (TP3H2, TP3H4 y TP3H6) luego del secado con CO₂-SC.

La Figura 5.16 muestra las microestructuras de los geles secos conteniendo HA. En las muestras T y TH2 se observa una estructuración laminar y una ausencia de porosidad isotrópica (Fig. 5.16a y b). En ambos casos se visualizan partículas desprendidas debido a falta de cohesión y gran rugosidad. Las muestras TH4 y TH6 (Fig. 5.16c y d) muestran una textura más porosa, aunque se aprecia también la aglomeración de partículas. El mayor contenido de HA agregado a las muestras facilita la formación de una estructura más porosa. En la muestra TH6 se evidencian poros de 1-2 μm , interconectados y con distribución homogénea.

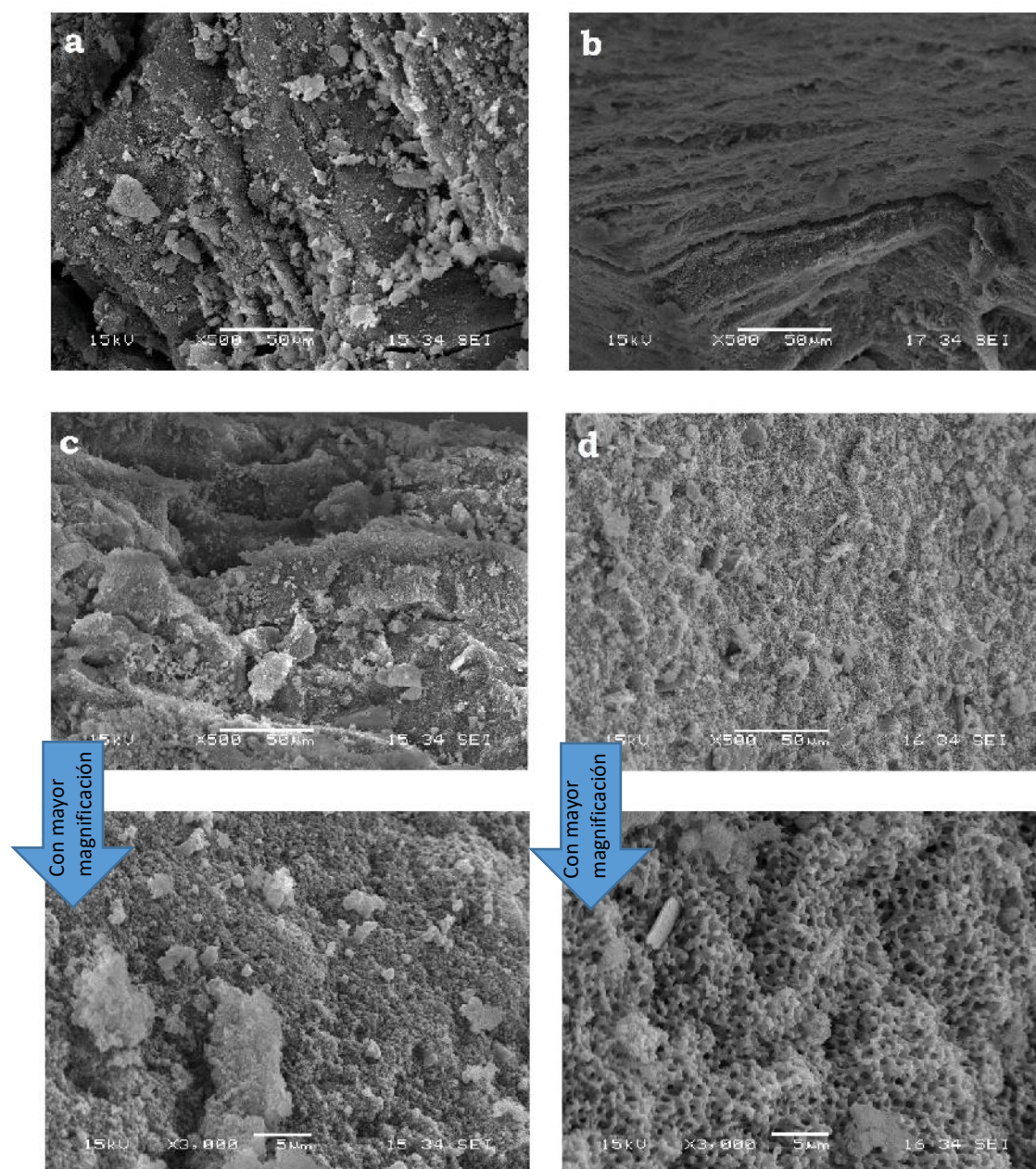


Figura 5.16: Imágenes SEM para los geles secados con CO₂-SC a 250 bar y 60 °C. Muestras a) T, b) TH2, c) TH4, y d) TH6.

La Figura 5.17 muestra las microestructuras de los geles secos conteniendo HA preparados con PVP. Se observa que las muestras tienen una microestructura más homogénea y porosa en todos los casos (muestra TP3H2, TP3H4 y TP3H6). El contenido de HA afecta al tamaño de las partículas observadas por SEM. En las tres muestras se observa gran porosidad en comparación con las muestras secadas sin PVP agregado en la preparación. En la muestra TP3H6 se evidencian poros pequeños (2-5 µm) combinados con una estructura de poros de mayor tamaño (10-20 µm), interconectados y con distribución homogénea.

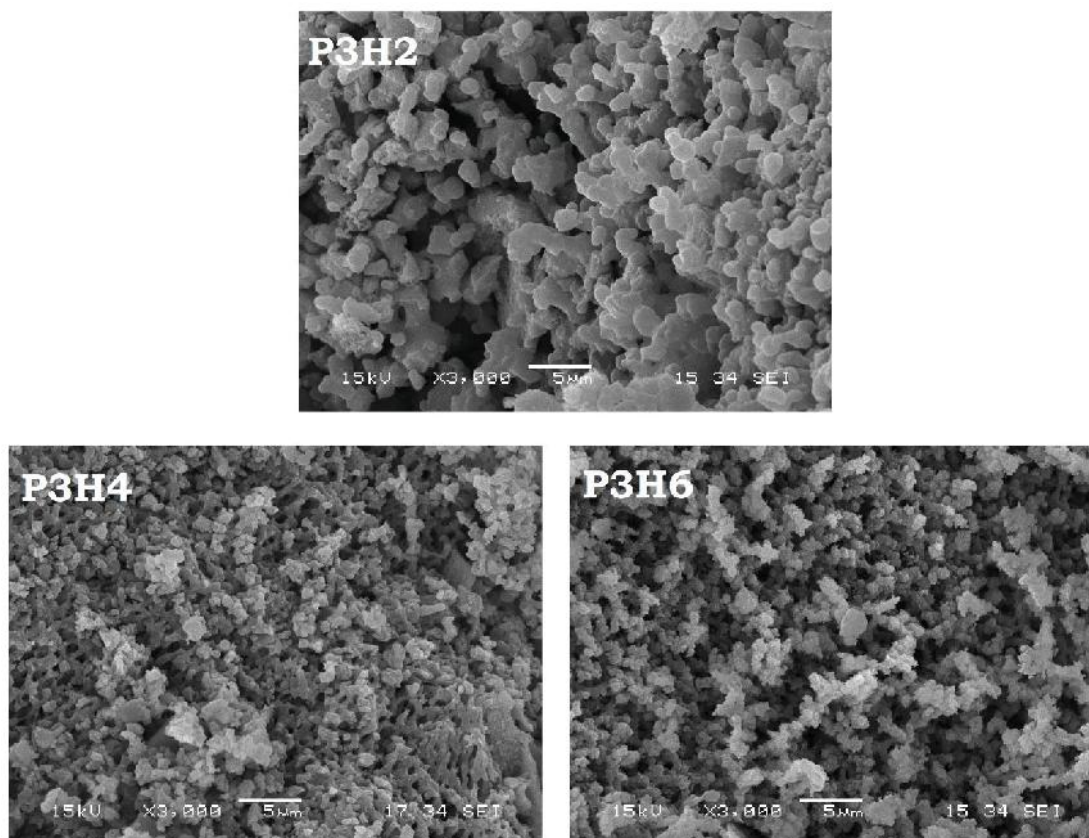


Figura 5.17: Imágenes SEM para los geles secados con CO₂-SC a 250 bar y 60 °C. Muestras a) TP3H2, b) TP3H4, y c) TP3H6.

Las microestructuras observadas para los geles secos muestran que la proporción de nanopartículas de HA afecta a la nanoestructuración de la matriz de TiO₂. Los mayores contenidos de HA generan esqueletos compuestos con poros de mayor tamaño y con partículas de TiO₂ de menor tamaño interconectadas. Estas observaciones se pueden atribuir al comportamiento de las nanopartículas de HA como agentes nucleantes de la red de TiO₂, lo que predominaría frente al proceso de aglomeración de partículas de TiO₂.

5.5. Geles compuestos como portadores de agentes activos.

Las propiedades que resultan en los materiales desarrollados (estructura de poros, gran área superficial, baja densidad) hacen que éstos sean potenciales candidatos para una variedad de aplicaciones tecnológicas. En especial los geles compuestos TiO₂-HA constituyen excelentes soportes para la liberación controlada de principios activos (fármacos u otras sustancias de interés tecnológico).

En principio, los compuestos activos pueden incorporarse a la matriz del gel compuesto de TiO₂-HA siguiendo dos rutas principales:

- (1) mezclar el principio activo con los reactivos en la primera etapa del proceso sol gel, antes de que tenga lugar la gelificación, seguido de la etapa de secado.
- (2) post tratamiento del gel de una manera que permita la deposición de las partículas del compuesto activo en la superficie del aerogel [174].

En este trabajo se implementó la metodología (1) para incluir en un caso, ácido úsnico como agente antibacteriano [192], y en otro, nanopartículas de óxidos de hierro (IONPs) como agentes teranósticos [193]. Esta vía de funcionalización se caracteriza por su simplicidad. El compuesto activo puede agregarse al sol como un líquido o un sólido y mezclarse con el sol a nivel molecular. Esto requiere un único paso, aunque es necesario conocer el comportamiento químico de las sustancias incorporadas (solubilidad, acidez, etc.) para tener muchas precauciones. Entre ellas, se debe evaluar la reactividad de los compuestos activos con los componentes del sol, que pueden ocasionar transformaciones no deseadas. También, la estabilidad de los principios activos incluidos es un factor importante que debe investigarse cuidadosamente. El hecho de adicionar otros componentes al proceso sol-gel puede influir en el proceso de gelificación y las propiedades finales del gel compuesto producido. Además, es posible registrar pérdidas del compuesto activo durante el proceso de secado con CO₂-SC simplemente por efecto de lavado [174].

En este trabajo se logró incluir 5 % m/m de ácido úsnico (CAS 7562-61-0) y 5% m/m de IONPs [194] en la síntesis de los geles compuestos TP3H6 según el procedimiento esquematizado en la Figura 5.18. Las cantidades incorporadas de los principios activos no modificaron sustancialmente el proceso de gelificación lo que favoreció el conformado de las muestras con la misma metodología detallada previamente (Capítulo IV). Para obtener los geles compuestos funcionalizados se utilizaron las mismas condiciones de secado establecidas para el gel sin funcionalizar. De esta manera, se consiguió obtener piezas secas de geometrías tipo pastillas que se nombran muestras TP3H6-Us y TP3H6-Fe. Asimismo, los geles secos obtenidos mostraron contener los principios activos dispersos homogéneamente en la matriz.

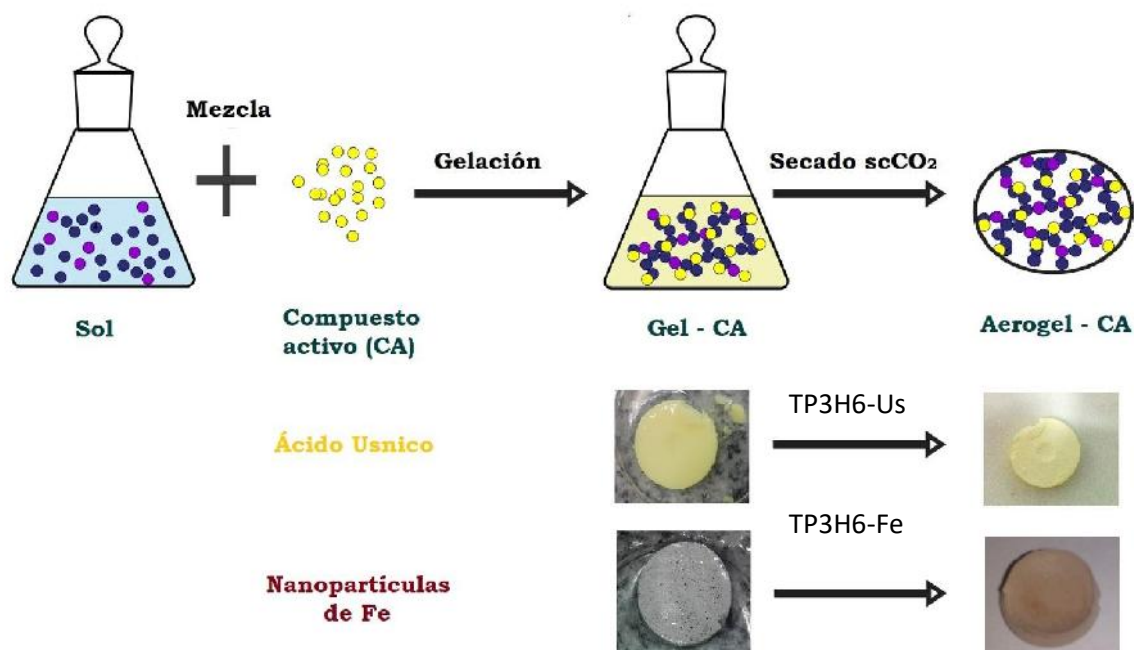


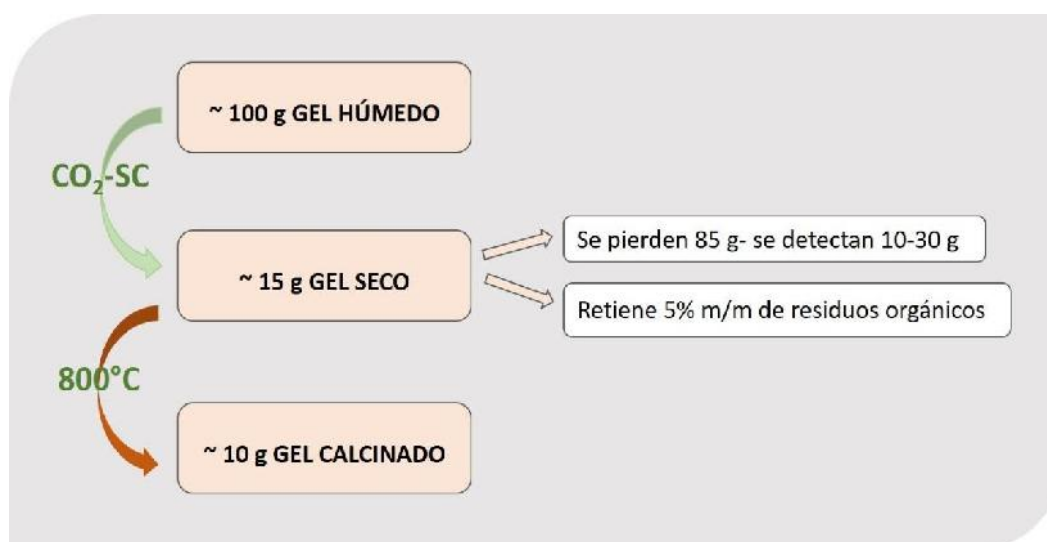
Figura 5.18: Esquema de preparación de geles compuestos funcionalizados con ácido úsnico y nanopartículas de Fe, secados con CO₂-SC a 250 bar y 60 °C.

Los sistemas compuestos funcionalizados que lograron obtenerse por la metodología desarrollada (sistemas TP3H6-Us y TP3H6-Fe) son parte de un trabajo a indagar en mayor profundidad en el futuro. Las investigaciones actuales a nivel internacional se orientan al estudio de materiales compuestos de TiO₂-HA con propiedades biológicas de muy alta especificidad [195], lo que garantiza que la metodología desarrollada en este trabajo sea de potencial implementación para el desarrollo de sistemas compuestos TiO₂-HA funcionalizados.

5.6. Conclusiones parciales

En este capítulo se ha estudiado la influencia de las condiciones de secado con CO₂-SC de geles compuestos de TiO₂-HA conteniendo PVP como agente generador de poros. El procedimiento implementado abarcó la exploración de condiciones de temperatura y presión del proceso, como así también la evaluación de las condiciones superficiales del gel. Esto hizo posible establecer como mejores condiciones para el proceso de secado con CO₂-SC una temperatura de 60 °C, una presión de dióxido de carbono de 250 bar y un exceso de solvente en la superficie del gel húmedo. Esto último, la adición de solvente adicional resultó un factor determinante para la obtención de aerogeles sin grietas o fracturas en su microestructura.

De acuerdo con las características de los geles desarrollados, se describió el secado supercrítico como un procedimiento que muestra un mecanismo de transferencia de masa basado en una combinación de convección y difusión dentro del gel. En la primera etapa de secado, se demostró que la transferencia de masa convectiva desempeña un papel importante, mientras que, en la última etapa, el secado se controla por difusión.

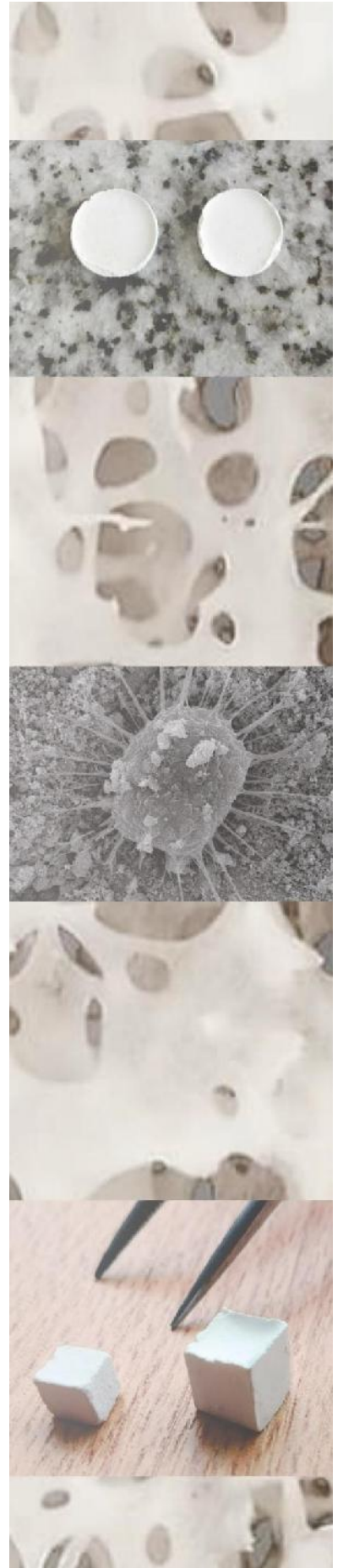


Los geles secos presentaron una alta porosidad, con tamaños de poro entre 5-20 μm , con distribución uniforme.

La metodología desarrollada permitió la obtención de geles compuestos de TiO₂-HA y geles funcionalizados con principios activos de interés biotecnológico combinando técnicas de síntesis hidrotérmal/sol-gel y secado supercrítico. La metodología desarrollada resulta de gran potencial para implementar en el desarrollo de otros sistemas como biomateriales con alta especificidad.

Capítulo VI

Tratamientos térmicos y caracterización



6.1. Tratamiento térmico de geles secos de TiO₂-HA

La aplicación de un tratamiento térmico en los geles secos de TiO₂-HA promueve la consolidación de la estructura jerárquica porosa mientras ocurre la eliminación de los productos orgánicos residuales presentes. En general, el tratamiento térmico se utiliza para investigar la estabilidad térmica y la evolución microestructural de los materiales a altas temperaturas con el fin de tener un control de las variables térmicas y evitar que se produzcan daños inesperados e incontrolables. La consolidación de la red nanoestructurada es altamente dependiente de la temperatura, del tiempo y de la atmósfera en la que se produce [196,197]. Asimismo, la velocidad de calentamiento es un factor determinante para lograr una sinterización de las partículas evitando que se produzca el agrietamiento de la muestra. Es sabido, por ejemplo, que un tratamiento térmico en aerogeles de sílice reduce el contenido de macroporos generando una mejora en el rendimiento del aislamiento térmico [196].

En general, se cree que se producen diferentes grados de variación estructural en función de la temperatura debido a que el sistema es propenso a la minimización de la energía cuando los aerogeles están expuestos a un entorno de temperatura variable. Las investigaciones sugieren que, al aumentar la temperatura, los poros más pequeños se encojen y finalmente desaparecen a una velocidad más alta que los poros más grandes [198]. Otras investigaciones sostienen un punto de vista opuesto, en donde los poros más grandes pueden encogerse y desaparecer preferentemente en las primeras etapas del proceso de tratamiento térmico [199,200]. Esto se atribuye a una nanoestructura jerárquica compleja y única. En general, las nanoestructuras de los aerogeles se modela como una estructura fractal multinivel, que se construye con agregados. Éstos están compuestos de partículas secundarias porosas interconectadas, y estas partículas porosas secundarias están ensambladas por densas partículas primarias y microporos en su interior [201]. Wu *et al.*, ha reportado el efecto del tratamiento térmico sobre la evolución estructural y de textura de aerogeles ternarios Al₂O₃-SiO₂-TiO₂ (AST) obtenidos a partir de geles utilizando secado supercrítico con etanol [197]. En el aerogel seco de este sistema ternario se detecta sólo la fase anatasa. El tratamiento térmico produce cambios estructurales y la detección de otras fases como γ -Al₂O₃ (a 600°C), mullita (1200°C) etc. El aerogel ternario calcinado a 600 ° C es típicamente mesoporoso, y muestra un área superficial específica alta (255.37 m² /g), un diámetro de poro promedio de 22.83 nm y un gran volumen de poro (1.34 cm³/g). Sin embargo, cuando la temperatura

alcanza los 1000°C, el área BET disminuye drásticamente de 232.57 m²/g a 98.00 m²/g, lo cual es causado por la contracción del volumen y el colapso de los poros.

En este trabajo, los geles secos obtenidos TP3, TP3H2, TP3H4 y TP3H6 se trataron térmicamente con el siguiente ciclo: V₁= 2°C/min hasta 400°C, V₂= 5°C/min hasta 800°C con una meseta de 60 min a esta temperatura, en atmósfera de aire. Posteriormente, fueron caracterizados con medidas de densidad, determinación de porosidad abierta para evaluar la estabilidad textural (tamaño y distribución de poros), el grado de contracción del volumen y el posible colapso de los poros. También, se realizaron ensayos de nanoindentación para describir el efecto del contenido de HA sobre la resistencia mecánica de los materiales porosos obtenidos.

6.2. Medidas de densidad aparente y porosidad abierta

En la Tabla 6.1 se muestran los valores de densidad aparente y porosidad abierta determinados a partir de la metodología descrita en el Capítulo III para las muestras calcinadas a 800°C. También se reporta la densidad del gel húmedo y contracción diametral de las muestras TP3 y TP3H4.

Tabla 6.1. Densidad y porosidad abierta para las muestras TP3, TP3H2, TP3H4 y TP3H6 calcinadas a 800 °C.

Muestra	$\delta_{\text{húmeda}}$ (g/cm ³)	δ_{seca} (g/cm ³)	$\delta_{\text{calcinada}}$ (g/cm ³)	Porosidad abierta (%)	% Contracción diametral
TP3	1.05	0,33	1,23 ± 0.03	69,4	39,8
TP3H2	n/m	0,33	0,74 ± 0.001	77,8	n/m
TP3H4	1.24	0.28	0,80 ± 0.0009	76,5	52,9
TP3H6	n/m	0.24	0,73 ± 0.08	77,5	n/m

La densidad de los geles compuestos secos no pudo determinarse mediante la técnica de inmersión en agua debido a la baja resistencia mecánica que presentaron a la manipulación. Por ello, los valores de densidad aparente para estas muestras se determinaron mediante medidas de volumen y masa. La Figura 6.1 muestra la

variación de densidad de la muestra TP3H4 en su condición de gel húmedo, gel seco y gel calcinado a 800°C.

En general, se observa un aumento de la densidad entre las muestras secas y calcinadas, entre un 280% y 150 % para la muestra TP3 y TP3H4 respectivamente. Esto se debe a la contracción y pérdida de masa que se producen por la cohesión de las partículas agregadas (sinterizado) y la eliminación de compuestos orgánicos residuales, respectivamente.

Dentro de la serie de muestras calcinadas, TP3 es la que presentó mayor densidad. La presencia de HA genera mayor porosidad abierta en los materiales calcinados, aunque no se observa un efecto definido de la porosidad en función de la proporción de HA incorporada.

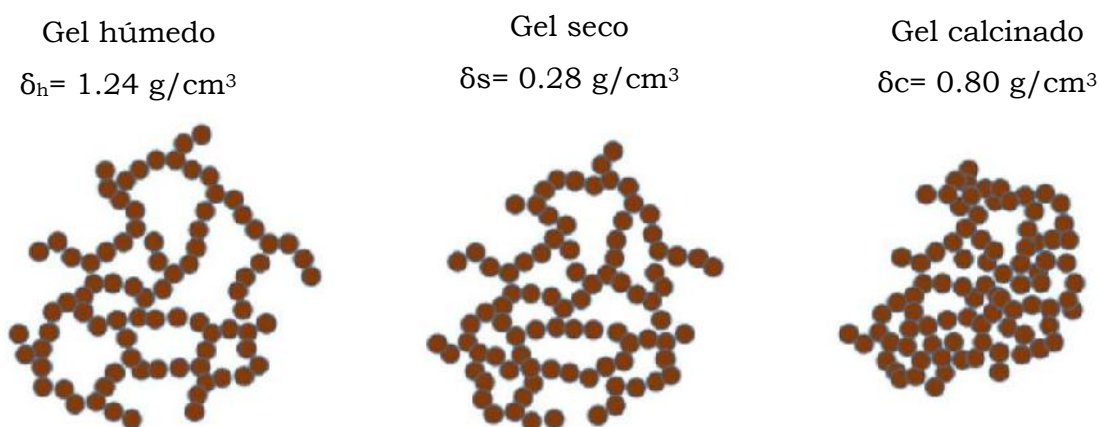


Figura 6.1: Esquema de la variación de densidad del gel compuesto TP3H4 durante su proceso de obtención.

6.3. Nanoindentación

Se realizaron ensayos de *scratch* y se determinaron los coeficientes de fricción para las muestras TP3 y TP3H6 calcinadas, utilizando una carga normal de *scratch* de 0,5 mN y un indentador esférico de 500 μm . Se realizaron 3 ensayos por muestra de 6 μm de longitud. En la Tabla 6.2 se muestran los resultados obtenidos del ensayo de *scratch* para ambas muestras.

Tabla 6.2. Registros de scratch para las muestras TP3 y TP3H6

Muestra/Ensayo Medida	TP3			TP3H6		
	1	2	3	1	2	3
Lateral force (μN)	1,27	82,26	78,86	172,96	149,54	272,14
Normal force (μN)	0,00	0,02	0,22	501,44	0,01	0,00
Tiempo (sec)	14,95	14,77	14,80	14,89	14,86	14,88
Lateral displ. (μm)	5,85	5,83	5,81	3,65	5,87	5,81
Normal displ. nm	790,90	1065,59	428,74	2876,85	1035,26	820,98

Los registros revelan que las características de las muestras no permiten la obtención de un *scratch* con una evolución estable, a pesar de que se realizaron distintos ensayos exploratorios, y de haber definido una carga normal baja, combinada con un indentador de gran diámetro. La fragilidad de las estructuras porosas obtenidas permite argumentar que las muestras compuestas de TiO_2 -HA son potencialmente útiles como sistemas portadores de fase bioactiva no estructural.

6.4. Caracterización y estudio de la inclusión de nanopartículas de HA en matrices de TiO_2 obtenidas por sol-gel.

La síntesis de los geles compuestos de TiO_2 y HA (sin agregado de PVP) permitió evaluar el comportamiento de las fases cristalinas de los precursores en función del contenido de HA y de la temperatura. Todos los geles que se estudian en este apartado se procesaron de acuerdo con los parámetros descritos en los capítulos previos.

La Figura 6.2a muestra los patrones de difracción de rayos X de geles envejecidos durante 30 días y tratados térmicamente a 800 °C durante 1 h. El patrón correspondiente a la muestra en polvo sin presencia de HA, es decir, solo dióxido de titanio (muestra T), reveló exclusivamente los picos característicos de la fase rutilo de acuerdo con el archivo JCPDS 21-1276. Esto está de acuerdo con lo esperado ya que el rutilo es la fase termodinámicamente estable de TiO_2 , y la transformación de fase de anatasa a rutilo se observa generalmente durante tratamientos térmicos por encima de 600 °C [202,203]. Por otro lado, los patrones de los sistemas compuestos de TiO_2 -HA revelan diferencias significativas.

Los patrones de DRX de las muestras TH20, TH40 y TH60 calcinadas a 800°C muestran las señales características de la fase de anatasa (JCPDS 21-1272) así como también de la fase de hidroxiapatita (JCPDS 09-0432) (Fig.6.2a). Esta observación indica que las nanopartículas de HA actúan dificultando la transformación de fase anatasa-rutilo. Efectivamente, la presencia de rutilo es despreciable en la muestra

TH6. Por otro lado, no se evidencia una reactividad específica entre las fases conjugadas en la estructura del gel calcinado a 800°C.

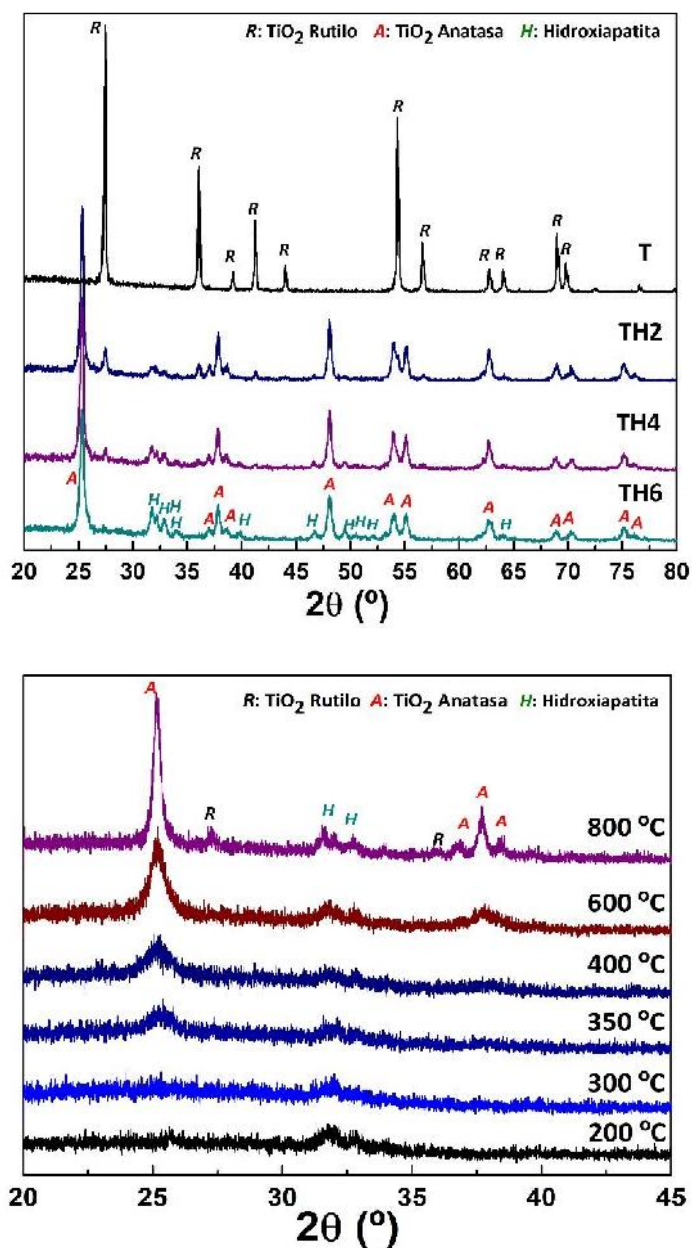


Figura 6.2: (a) Patrones de DRX de polvos con diferente contenido de HA tratados a 800 °C y (b) Evolución de fases en la muestra TH4 a diferentes temperaturas.

La Figura 6.2b muestra la evolución cristalográfica de la muestra TH4 tratada a diferentes temperaturas. Los patrones registrados para las muestras tratadas a 200 y 300 °C muestran los picos correspondientes a la fase HA, mientras que el dióxido de titanio permanece como una fase amorfa. Los picos correspondientes a anatasa aparecen recién a 350 °C, y las muestras tratadas a 400 y 600 °C muestran

claramente el pico intenso característico de anatasa a $25.2^\circ 2\theta$. El patrón de la muestra tratada a 800°C muestra los picos de anatasa mejor resueltos y más intensos, con respecto a los patrones de temperaturas más bajas, debido al aumento de la cristalinidad. Sin embargo, aunque anatasa es la fase principal, el patrón también revela el comienzo de la transición de fase hacia rutilo.

Es importante notar que cuando los geles de dióxido de titanio (T) se tratan térmicamente en las condiciones mencionadas, la anatasa es la fase dominante hasta 600°C , temperatura a partir de la cual se observa un pico de muy baja intensidad a $27.3^\circ 2\theta$, lo que denota la aparición de rutilo, tal como se observa en la Fig. 6.3. Aparentemente, las nanopartículas de HA interfieren en la transición de fase anatasa-rutilo, permitiendo que la anatasa resista temperaturas entre $600\text{-}800^\circ\text{C}$ en lugar de convertirse en rutilo, como lo haría normalmente en ausencia de aditivos o especies dopantes, y cuando se obtiene en condiciones similares a las que se informan aquí.

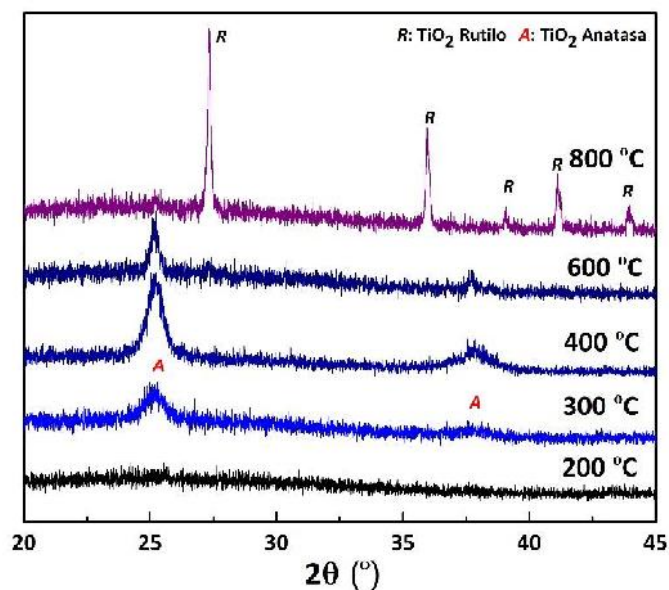


Figura 6.3: Evolución de fases en la muestra T a diferentes temperaturas.

La estabilización de dióxido de titanio en la fase anatasa se logra cambiando su composición de masa o superficie [204,205]. En este sentido, la retención de anatasa debido a la presencia de HA puede tener diferentes orígenes. Por un lado, las nanopartículas de hidroxiapatita distribuidas dentro de la red de TiO₂ en formación disminuyen la probabilidad de contacto entre los *clusters* del óxido, retrasando o impidiendo la transición de fase a altos contenidos de HA. Esto está de acuerdo con

las observaciones de Anderson *et al.* para las mezclas de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{TiO}_2$, quienes sugirieron que los enlaces de la superficie de Ti-O están bloqueados por las especies circundantes (es decir, SiO_2 que forma Ti-O-Si en la interfaz) evitando la nucleación necesaria para la transformación [203]. En segundo lugar, las nanopartículas de TiO_2 , que aumentan de tamaño durante la transición de fase, permanecen pequeñas y son necesarias temperaturas más altas para promover la transición a rutilo. En el presente caso, la estabilidad de la anatasa aumenta por la interacción química entre grupos fosfato de HA con grupos hidroxilo presentes en geles de TiO_2 , por medio de los cuales se forman enlaces Ti-O-P. Esta suposición está respaldada por el pico a 796 cm^{-1} observado en los espectros Raman de los compuestos TiO_2 -HA, que se muestra más adelante. En cualquier caso, los patrones de DRX en la Fig. 6.2a demuestran que cuanto más alto es el contenido de HA, mayor es la resistencia de la anatasa a la transición.

Por otro lado, para realizar el refinamiento de la estructura por el método Rietveld, los patrones de DRX (Figura 6.4) para la HA y los materiales compuestos obtenidos (muestras TH4 y TH6) confirman la presencia de HA en los sistemas de acuerdo con la ficha PDF 00-009-0432. La presencia de las fases rutilo y anatasa, de acuerdo con las fichas PDF 00-021-1276 y 00-021-1272, sugieren que los cristales de la HA se mantienen incluso en presencia de las fases rutilo o anatasa de dióxido de titanio. Los picos de HA pueden ser indexados en la geometría con grupo espacial P63/m. Para estas mismas muestras, se realizó el refinamiento Rietveld (Fig. 6.4) con el fin de obtener los parámetros de celda y estimar así la cantidad de fase presente en cada muestra. Los cálculos se realizaron con el software FullProf. En primera instancia, el estándar de silicio fue refinado para definir la resolución de los parámetros experimentales (U, V y W). La función de pseudo-Voigt de Thompson-Cox Hastings (TCHV) se aplicó para el cálculo de las fases. Para la fase de hidroxiapatita, se refinaron los parámetros de celda a, b y c y la microestructura. El Biso y factor de ocupación de átomos se fijaron con base a los datos cristalográficos COD D 9002214. Para el rutilo y anatasa los parámetros de celda y la microestructura se refinaron y se fijaron de acuerdo con los datos cristalográficos del ejemplo FullprofRutilo.pcr. Los parámetros de celda unidad (a, b, c y V), la cantidad de fase (%) y Chi^2 se presentan en las Tablas 6.3 y 6.4. Los resultados fueron conformes a lo esperado ya que el Chi^2 se encuentra incluso más bajo que los valores reportados en la literatura.

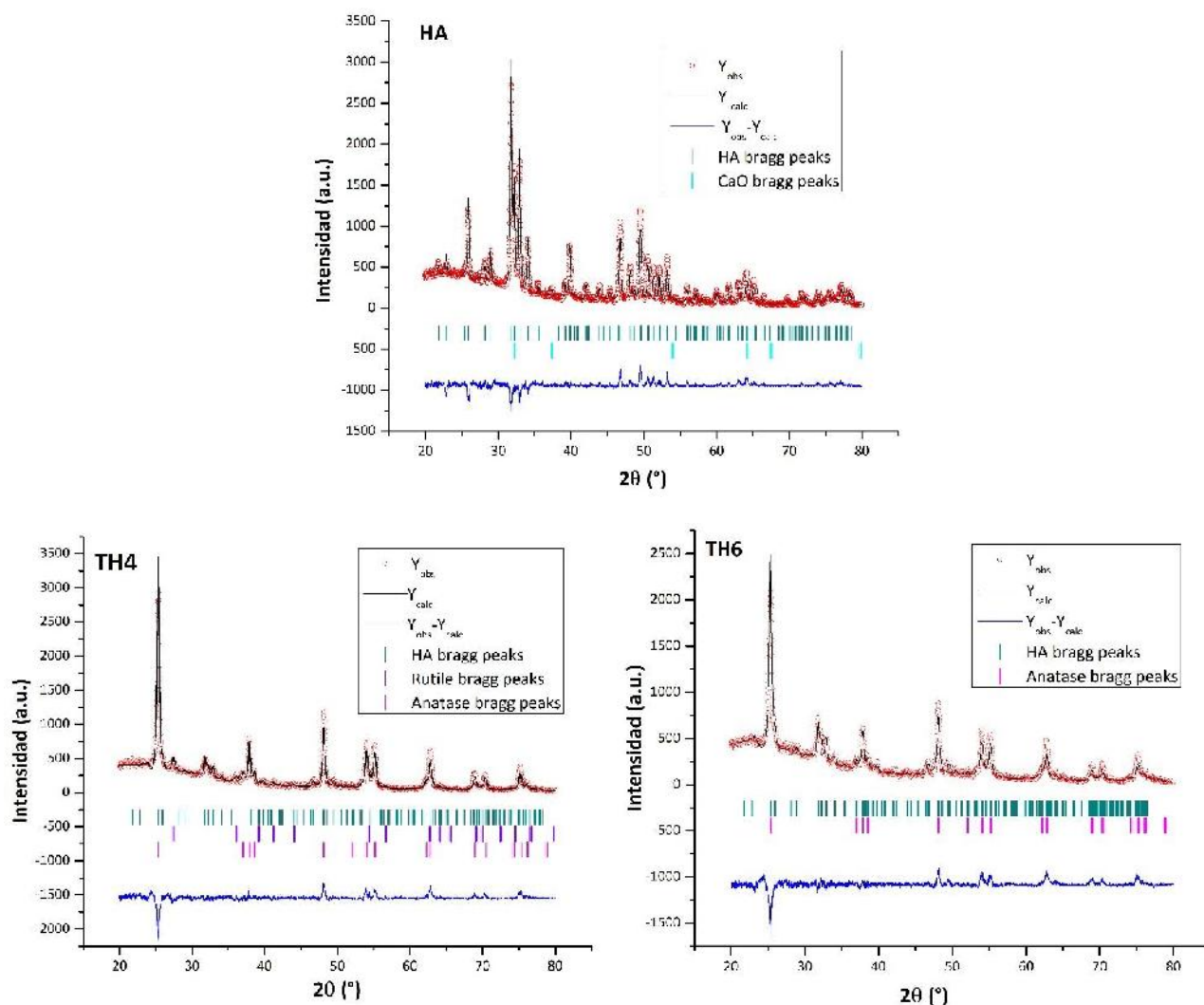


Figura 6.4: Refinamiento Rietveld para muestras HA, TH4 y TH6

Tabla 6.3. Tamaño de cristalito (β) y parámetros estructurales obtenidos a temperatura ambiente mediante refinamiento Rietveld.

Muestra	Fases HA						Valores R	Chi ²
	a (Å)	b (Å)	c (Å)	V (Å ³)	β (nm)	Fase %		
HA	9.4176 (14)	9.4176 (14)	6.8848 (2)	528.8 (1)	~ 36	99.1 (*)	Rwp= 19.6 Rexp =11.6	2.74
TH4	9.436 (6)	9.436 (6)	6.879 (1)	530.4 (5)	~ 21	18.6	Rwp= 21.5 Rexp =12.5	2.93
TH6	9.4343 (60)	9.4343 (60)	6.8793 (9)	530.3 (5)	~ 24	29.4	Rwp= 27 Rexp =14.8	3.31

* 0.90% CaO (PDF 00-037-1497)

La Tabla 6.3 presenta los porcentajes de fases presentes en cada una de las muestras. Se observa claramente que la muestra HA solo presenta esta fase, la cual se encuentra presente también en las muestras TH4 y TH6. El % de HA teórica incluida en los materiales TH4 y TH6 serían de 28.6% y 37.51%, respectivamente (lo que equivalente al 40 y 60% de nanopartículas de HA agregadas en la preparación para obtener de 1 g de dióxido de titanio). Se observó que la muestra TH6 posee el mayor contenido de HA, casi un 30 % m/m en el material calcinado. Los porcentajes de anatasa y rutilo presentes en las muestras analizadas corroboran lo discutido a partir de los difractogramas anteriores donde es evidente que la cantidad de fase rutilo es inversamente proporcional al contenido de HA (Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Datos cuantitativos de la fase rutilo y anatasa

Muestra	HA	Rutilo					Anatasa				
	Fase %	Fase %	a (Å)	b (Å)	c (Å)	V (Å ³)	fase %	a (Å)	b (Å)	c (Å)	V (Å ³)
HA	99,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TH4	18.6	13.2	4.5960 (41)	4.5960 (41)	2.9595 (8)	62,51 (8)	68.2	3.7834 (27)	3.7834 (27)	9,5030 (7)	136.03 (6)
TH6	29.4	-	-	-	-	-	70.6	3.784 (2)	3.784 (2)	9.500 (1)	136.02 (9)

Los espectros de FT-IR de las muestras HA y TiO₂-HA tratadas térmicamente a 800 °C durante 1 h se muestran en la Fig. 6.5. El espectro de HA muestra señales características en 1034 y 1092 cm⁻¹. El pico en 3570 cm⁻¹ asignada al grupo OH, apoya la formación de la estructura de apatita. La muestra de óxido de titanio (T) muestra bandas entre 500 y 800 cm⁻¹ debido a los modos de estiramiento de los enlaces Ti-O y Ti-O-Ti. Por otro lado, los compuestos TiO₂-HA muestran las bandas (570 y 603 cm⁻¹) correspondientes a la flexión asimétrica de los grupos O-P-O superpuestas a los modos de estiramiento Ti-O y Ti-O-Ti, observándose que la intensidad de éstas aumenta con el aumento del contenido de HA. La señal a 965 cm⁻¹ se asigna al modo de estiramiento simétrico del enlace P-O. Las bandas más intensas en 1035 y 1088 cm⁻¹ se deben a los modos de estiramiento asimétricos del grupo PO₄³⁻. Finalmente, la banda ancha centrada en 3450 cm⁻¹ corresponde al agua adsorbida.

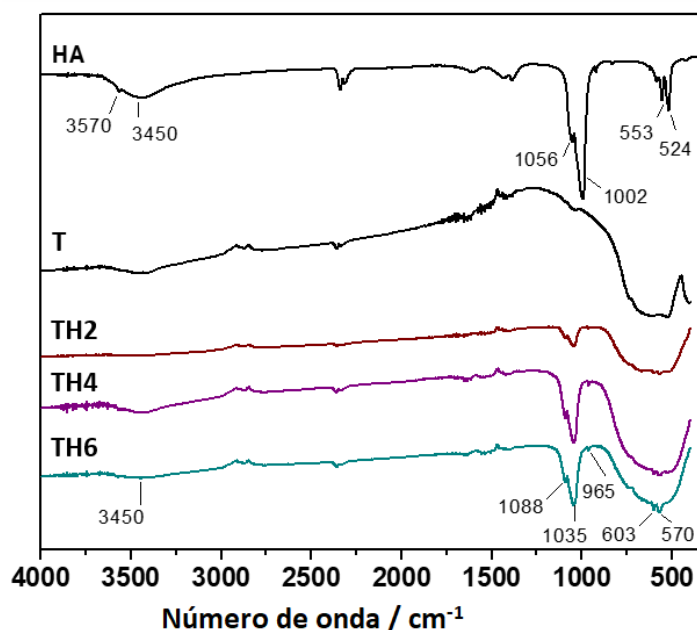


Figura 6.5: Espectros FT-IR para TiO_2 (T) y sistemas compuestos TiO_2 -HA (TH2, TH4 y TH6) calcinados a 800°C .

La Figura 6.6a muestra los espectros Raman de muestras tratadas térmicamente a 800°C . La muestra de TiO_2 (T) muestra bandas características a 446 y 610 cm^{-1} de la fase de rutilo [191]. Es interesante observar que las muestras compuestas de 20 a 60% m/m de HA revelaron la coexistencia de las fases anatasa (147 , 398 , 515 y 637 cm^{-1}) y rutilo, siendo la primera la fase dominante [191]. La banda a 963 cm^{-1} , que corresponde a la banda más intensa y representativa en el espectro Raman de HA, se debe al modo simétrico de estiramiento ν_1 , la cual es evidente también en los espectros de los sistemas compuestos. La Figura 6.6b se enfoca en la región de 750 - 1000 cm^{-1} para mostrar una banda adicional centrada en 796 cm^{-1} , que se ha atribuido al modo de estiramiento asimétrico de PO_4^{3-} y puede deberse a la interacción de grupos hidroxilo o fosfato de HA con TiO_2 [206].

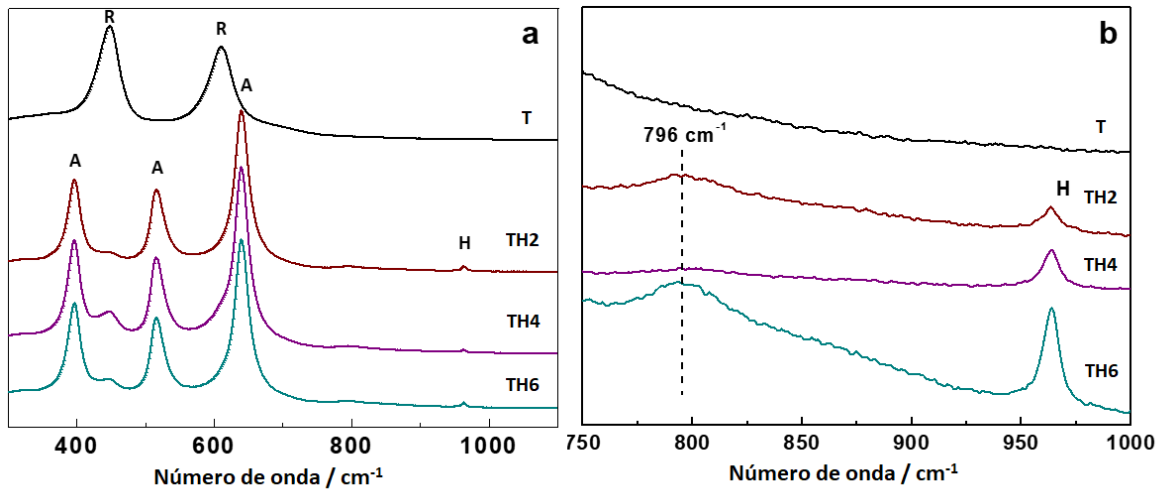


Figura 6.6: (a) Espectros Raman para TiO_2 (sin HA) y sistemas compuestos TiO_2 -HA (TH2, TH4 y TH6) calcinados a 800°C y (b) Detalle de la región 750 - 1000 cm^{-1} .

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido para estos sistemas se muestran en la Figura 6.7. En las imágenes de las muestras se aprecian superficies rugosas, con poca porosidad y relativamente compactas. Sin embargo, la muestra TH6 evidencia poros de mayor tamaño en su microestructura mientras que en las demás se observan microestructuras más compactas. Estas observaciones indican que el incremento en la proporción de HA no solo influye en la fase a obtener sino también en la microestructura final de los materiales compuestos. Además, se observa que luego del sinterizado las partículas de hidroxiapatita aumentan su tamaño y quedan como incrustadas dentro de la matriz de TiO_2 .

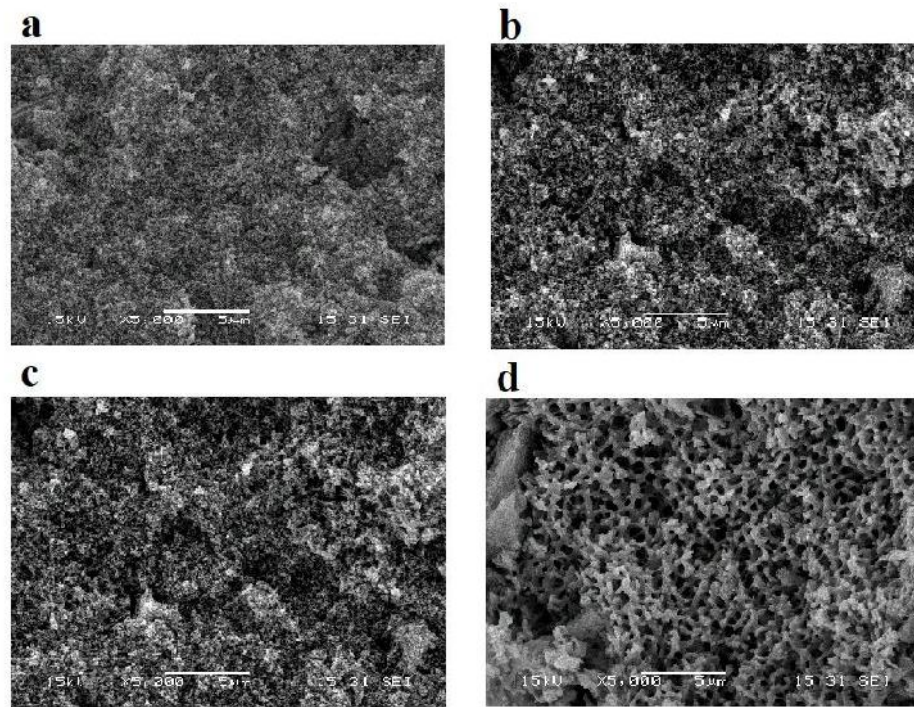


Figura 6.7: Imágenes SEM de los materiales con diferentes % de HA (a. T, b. TH2, c. TH4 y d. TH6) tratados térmicamente a 800 °C durante 1 h.

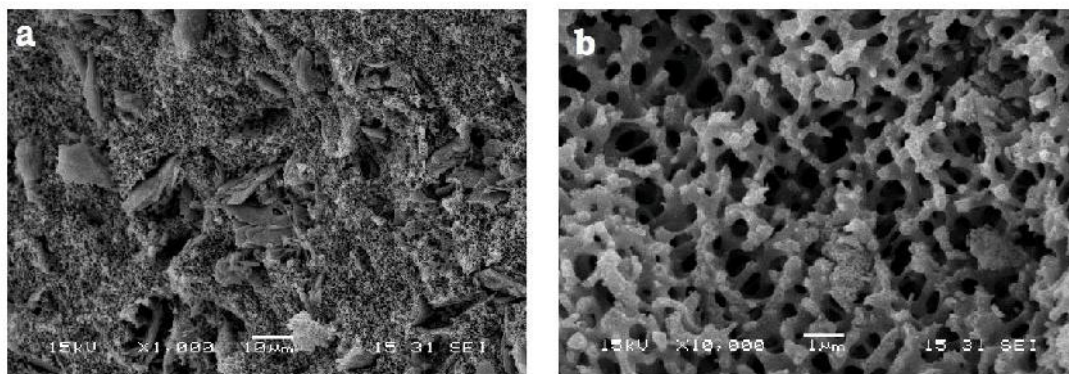


Figura 6.8: Imágenes SEM de la muestra TH6 con diferentes magnificaciones.

La muestra TH6 está conformada por una red porosa homogénea, donde el tamaño medio de los poros es de 1 μm (Figura 6.8). Se observa claramente una estructura con porosidad abierta e interconectada. El contenido de HA no se ve integrado a escala nanométrica. Se evidencian cristales tipo placas (típicas de HA) inmersas en la matriz porosa.

6.5. Caracterización y evaluación del efecto del agente porógeno en los sistemas compuestos de TiO₂-HA

En ensayos preliminares se exploró el efecto del agregado de Triton X-100 y polivinilpirrolidona (PVP, 1.3MDa) como agentes generadores de poro en la matriz de TiO₂ agregándolos en la etapa de formación del sol del método sol-gel. El análisis microestructural por microscopía SEM reveló que sólo el PVP daba lugar a una estructura porosa. Por tal motivo, se desestimó estudiar el efecto de la concentración de Tritón y se indagó la influencia del agregado de 30 y 40% de PVP en geles preparados según las condiciones óptimas detalladas en el Capítulo IV. La nomenclatura de estas muestras se lista en la Tabla 6.5. Los geles con diversas proporciones de HA y de PVP, se dejaron envejecer por un periodo de 30 días, tiempo en el que se alcanzan geles consistentes, que no se dañan durante el secado. Además, dos muestras se evaluaron con un tiempo de envejecimiento de 7 meses. Todas las muestras fueron secadas a 250 bar y 60 °C, con exceso de solvente, y posteriormente calcinadas a 800 °C durante 1 hora.

Tabla 6.5: Condiciones de preparación de geles compuestos de TiO₂-HA

Muestra	% m/m HA	% PVP	Tiempo de envejecimiento
TP3	--	30	1 mes
TP3H2	20	30	1 mes
TP3H2-7	20	30	7 mes
TP3H4	40	30	1 mes
TP3H4-7	40	30	7 mes
TP3H6	60	30	1 mes
TP4H4	40	40	1 mes
TP4H6	40	40	1 mes

6.5.1. Serie con 30% m/m de PVP

La Figura 6.9 muestra los patrones de difracción de rayos X para las muestras TP3, TP3H2, TP3H4 y TP3H6. Se observó que los materiales presentan un comportamiento similar que cuando se preparan sin aditivo. Esto indica que, a medida que aumenta la cantidad de HA en el sistema, se favorece la fase de anatasa, indicándonos que el PVP solo actúa como un agente generador de poros y no interfiere en la formación de las fases cristalinas de estos materiales.

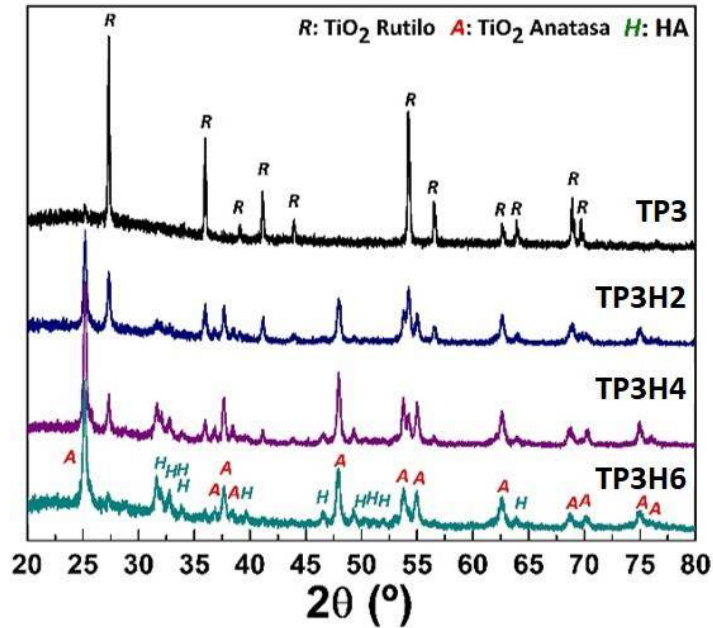


Figura 6.9: Patrones de DRX para muestras con 30 % de PVP (P3) y diferentes cantidades de HA calcinadas a 800 por 1 h

Por otro lado, el análisis por DRX reveló que las muestras TP3H2-7 y TP3H6-7 (envejecidas durante 7 meses) no presentan señales de la fase rutilo, que si se observan en las muestras envejecidas a 30 días y preparadas en las mismas condiciones (Figura 6.10). Esta es otra evidencia a favor del argumento de que la presencia de nanopartículas de HA en los sistemas retiene la fase de anatasa, evitando la transición a rutilo. En la Figura 6.10 se pueden observar las microestructuras desarrolladas por las muestras TP3H2-7 y TP3H4-7. El mayor contenido de HA genera una microestructura porosa con partículas de menor tamaño de grano.

La muestra con mayor contenido de HA (TP3H6) desarrolla una microestructura con 77 % de porosidad abierta e interconectada y una baja densidad (0.73 g/cm^3) cuando es calcinada a 800°C , que la hacen potencialmente adecuada para la regeneración ósea como soporte funcional de una fase bioactiva. Por ello, se realizaron tratamientos térmicos para determinar la temperatura a la cual se eliminan por completo los restos de PVP y la temperatura a partir de la cual empieza a descomponer la HA en el sistema.

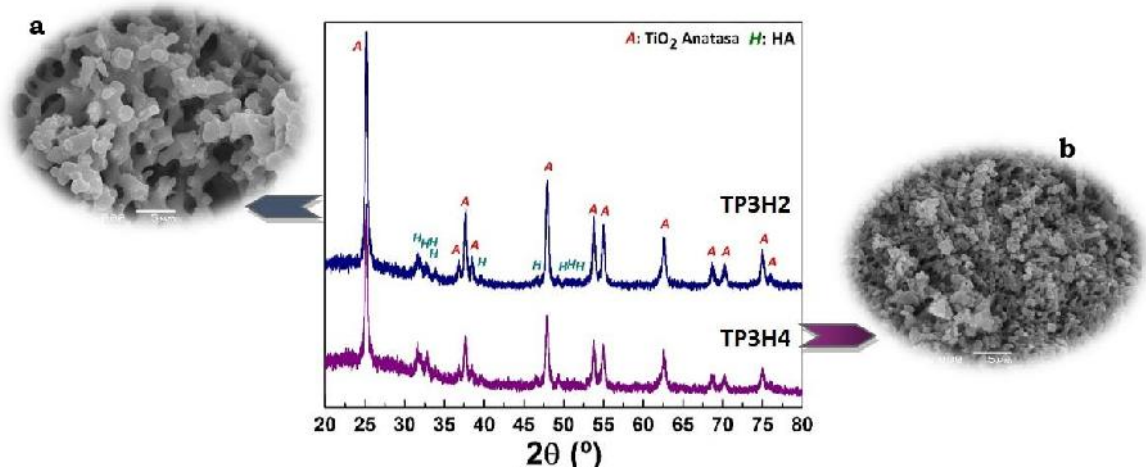


Figura 6.10: Patrones de DRX para muestras TP3H2-7 y PT3H4-7 calcinadas a 800°C.

La Figura 6.11 muestra la evolución de las fases cristalinas en esta muestra en función de la temperatura de tratamiento térmico. Es posible apreciar que, a bajas temperaturas de calcinación (hasta 400 °C) la muestra tiene una baja cristalinidad. Zheng *et al.* reportaron que la presencia de PVP en los sistemas de TiO₂ promueve la transformación de anatasa a rutilo a bajas temperaturas (a partir de los 500°C), de hecho, se menciona que mejora dicha transformación respecto de otros aditivos de Fe que se usan para este fin [207].

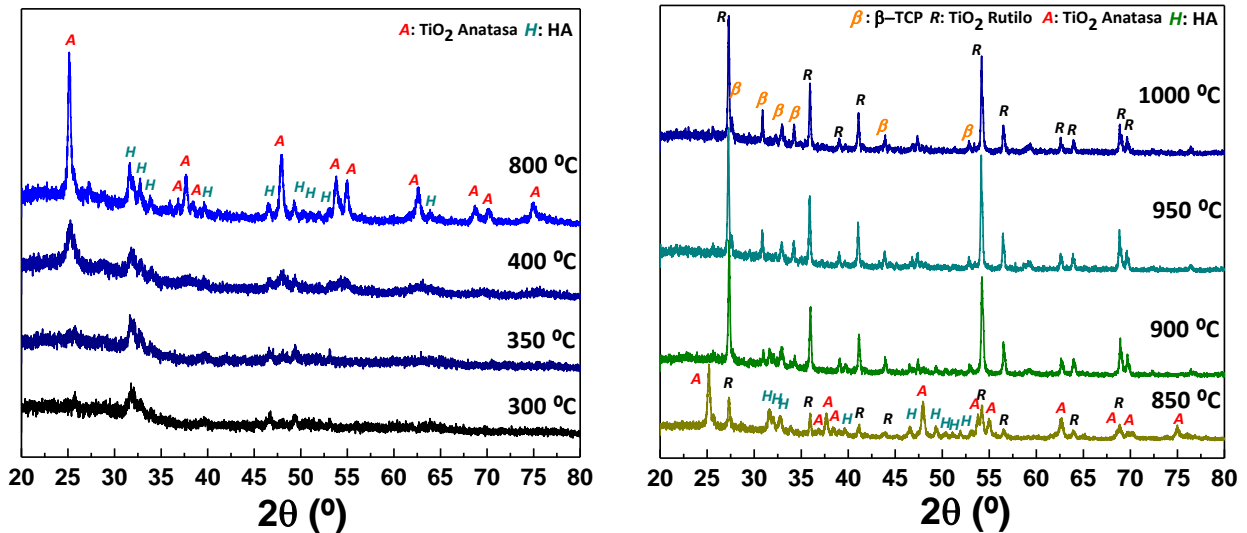


Figura 6.11: Patrones de DRX para la muestra TP3H6 calcinada a distintas temperaturas.

Sin embargo, como vemos en los difractogramas de la muestra TP3H6 a temperaturas altas (Fig. 6.11), la fase anatasa se mantiene hasta 800°C, confirmando así que la estabilidad de la anatasa aumenta por la interacción química entre grupos fosfato en HA con grupos hidroxilo en geles de TiO₂, por medio de los cuales se forman enlaces Ti-O-P. A partir de 900°C hay una transformación completa de anatasa a rutilo y se empieza a evidenciar la descomposición de la HA a β-TCP, la cual es completa a temperaturas cercanas a 950°C.

Teniendo en cuenta que la calcinación a 800°C de los geles compuestos (originados a partir del agregado de 30% de PVP) da lugar a un proceso de consolidación de la estructura porosa, se procedió a analizar la influencia del contenido de HA sobre la textura de las muestras. La Figura 6.12 muestra las microestructuras de las muestras TP3, TP3H2, TP3H4, TP3H6, donde es posible observar un grado de porosidad alto (≈ 70-80 %), con poros interconectados cuyo diámetro varía según la composición de la muestra y de las condiciones de preparación. Las muestra TP3 (sin HA) presenta poros de mayor tamaño que las muestras que contienen HA.

Si bien el efecto de la proporción de HA sobre el tamaño de poros que se generan no es concluyente, puede indicarse que el tiempo de envejecimiento si tiene efectos sobre la microestructura desarrollada.

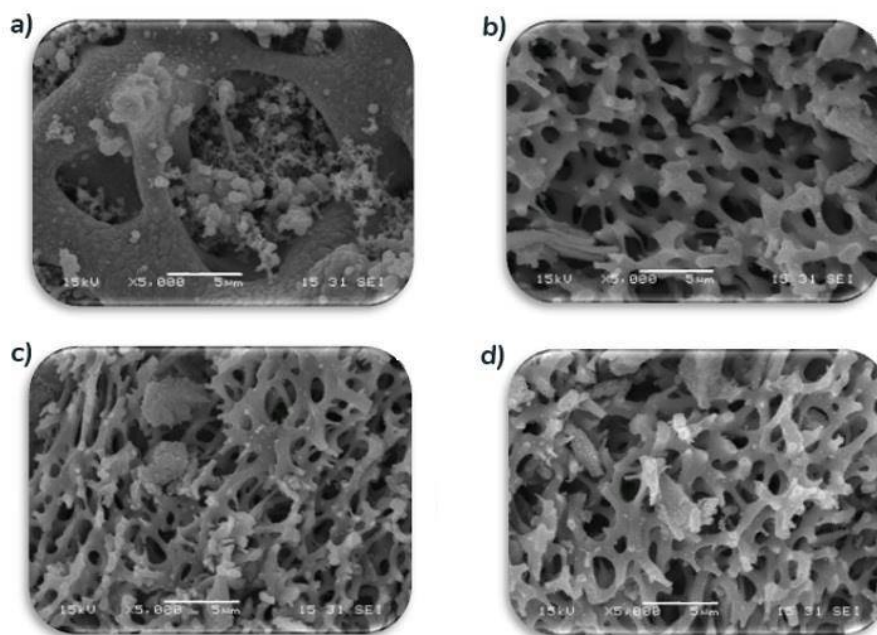


Figura 6.12: Microestructuras de las muestras **a)** TP3, **b)** TP3H2, **c)** TP3H4 y **d)** TP3H6, calcinadas a 800°C.

Las muestras envejecidas por un período de 7 meses desarrollan una microestructura con poros de menor tamaño respecto de las muestras envejecidas durante un mes. Este hecho se asocia a un proceso más prolongado de sinéresis de las muestras, en donde se produce una contracción en mayor proporción, evidenciándose en una reducción importante en el tamaño de poro.

Por otro lado, si observamos con más detalle las microestructuras de las muestras TP3 y TP3H6 (Figura 6.13) se identifica una estructuración de las fases diferentes en cada muestra. En la muestra TP3 se observa una fase consolidada a partir de partículas nanométricas con poros de gran tamaño ($\approx 10\text{-}14\ \mu\text{m}$), los cuales contienen en su cavidad otras partículas de menor tamaño con menor grado de consolidación. La muestra TP3H6 presenta una estructura porosa con mayor homogeneidad en la cual se observan cristales tipo placas incrustadas y distribuidas uniformemente por toda la red.

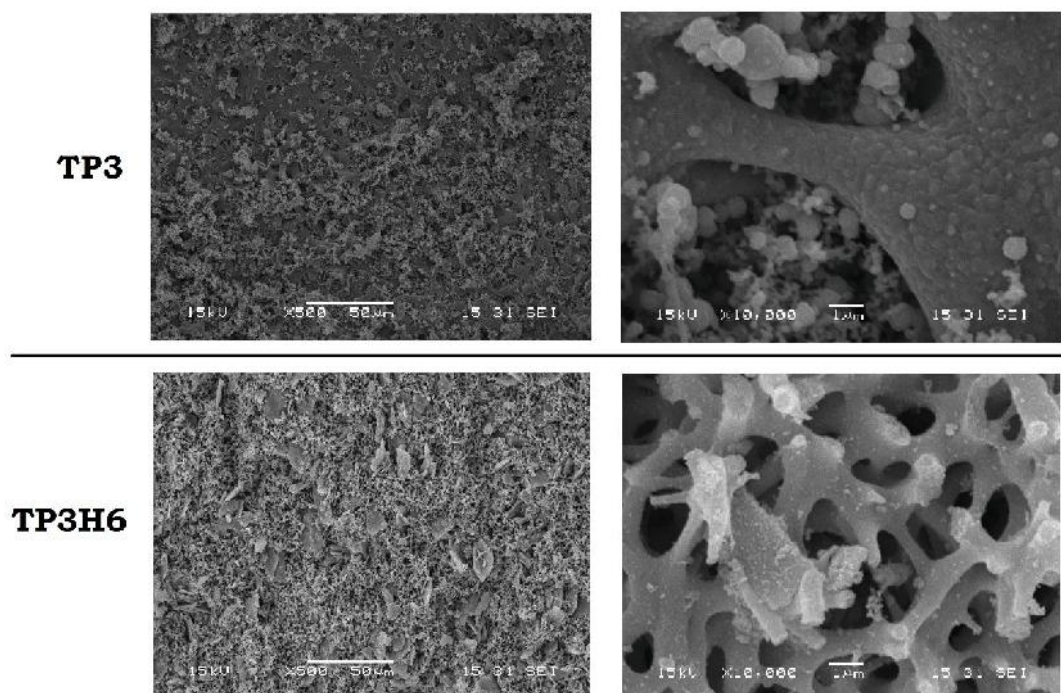


Figura 6.13: Microestructuras de las muestras TP3 y TP3H6 con diferentes magnificaciones.

La Figura 6.14 muestra las imágenes SEM para la muestra TP3H6 calcinada a diferentes temperaturas (800, 850 y 950°C). De acuerdo con los DRX, la muestra calcinada a 800°C presenta anatasa y HA como únicas fases cristalinas. Cuando la temperatura de calcinación aumenta a 850°C empieza a aparecer la fase rutilo junto con la de anatasa y HA. A una temperatura de calcinación de 900°C las fases

cristalinas detectadas son rutilo y HA. Estos cambios estructurales se evidencian sutilmente en las microestructuras observadas.

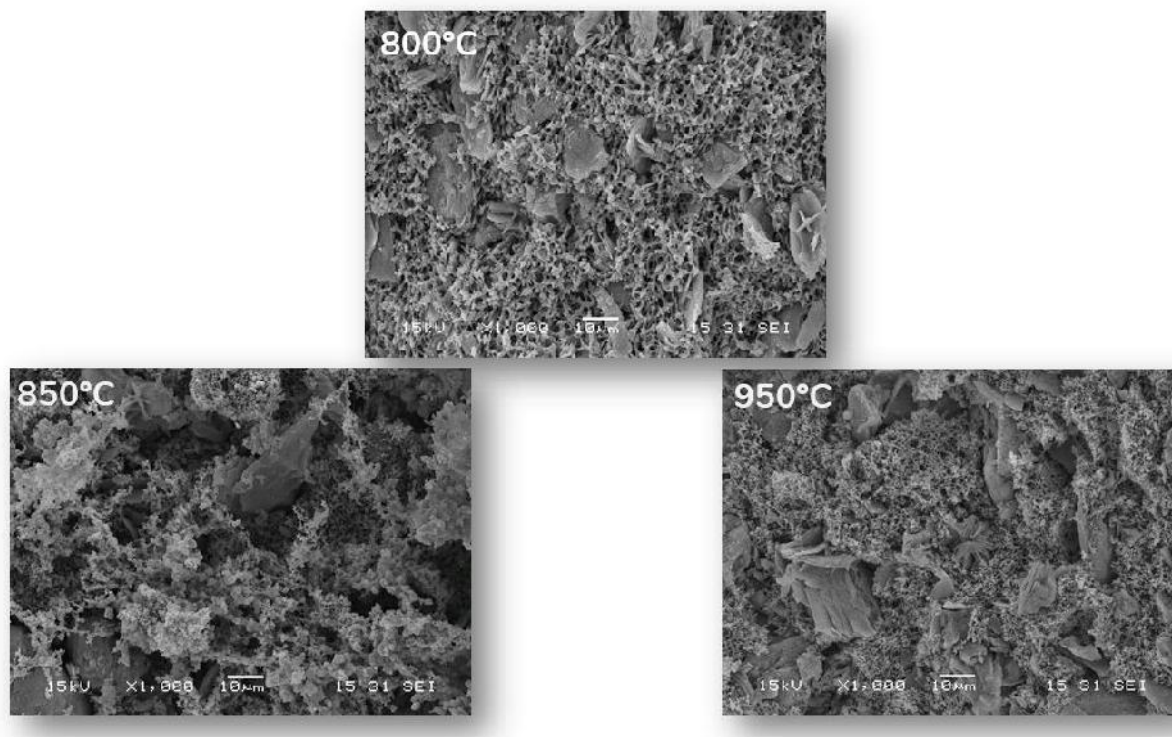


Figura 6.14: Microestructuras de la muestra TP3H6 calcinada a diferentes temperaturas.

6.5.2. Serie con 40% m/m de PVP

Se analizó el efecto de un 40% m/m de agregado de PVP en la preparación de los geles compuestos de TiO_2 con 40 y 60 %m/m de HA. Dichas muestras se nombran como TP4H4 y TP4H6, respectivamente. La metodología de preparación de estas muestras fue similar a la serie anterior. En la Figura 6.15 se muestran los DRX de estas muestras y la microestructura que desarrollan luego de la etapa de calcinación a 800°C. El difractograma de la muestra TP4H4 presenta picos de intensidades similares tanto para la fase de anatasa como para la de rutilo, lo que indica que el mayor contenido de PVP utilizado en la preparación favorece la transformación a rutilo, tal como lo propuso Zheng *et al.* [207], quienes encontraron que la presencia de PVP promueve la transformación de anatasa a rutilo a bajas temperaturas. Sin embargo, este efecto no tiene lugar en presencia de 60% m/m de HA, la cual inhibe la formación de rutilo incluso a altas temperaturas como se mostró en las muestras anteriores. La microestructura desarrollada por la muestra TP4H6 presenta una red

porosa formada por partículas pequeñas (aprox. 0.5 μm) con bajo grado de consolidación (se visualizan como una cadena de perlas). La muestra TP4H4, sin embargo, desarrolla una microestructura similar a la muestra TP3H6 analizada anteriormente. En ésta es posible ver porosidad abierta e interconectada, con mesoporos en la estructura.

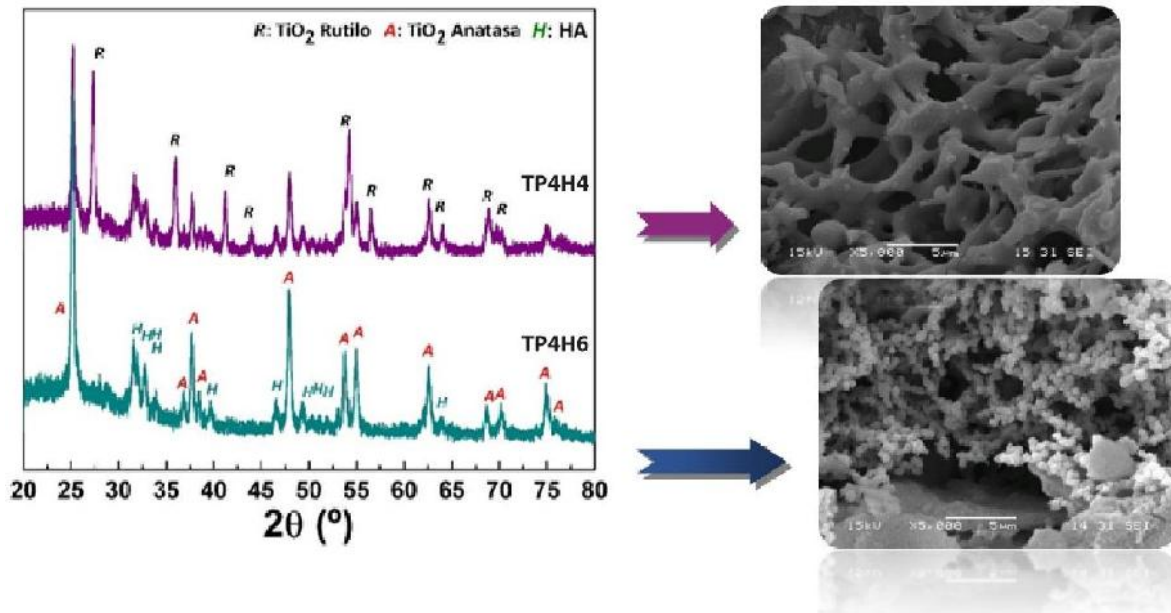


Figura 6.15: Patrones de DRX y microestructuras de las muestras TP4H4 y TP4H6 calcinadas a 800°C.

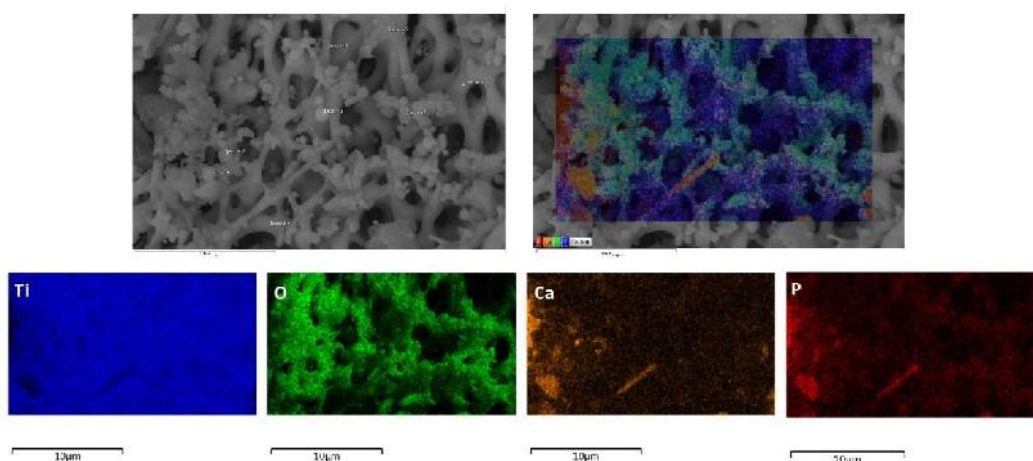


Figura 6.16: Mapeo EDS de la muestra TP4H4 secada con $\text{CO}_2\text{-SC}$ y calcinadas a 800°C.

En la figura 6.16 encontramos el mapeo elemental realizado mediante EDS para la muestra TP4H4, en la misma es posible observar como el TiO_2 está en toda la muestra como era de esperarse. Además, se observa que hay una distribución de calcio y fósforo por toda la muestra, aunque se evidencia claramente la formación de aglomerados.

6.6. Interacciones entre fases de HA y TiO_2 .

Con el fin de detectar la interacción entre las fases de TiO_2 y de HA se registraron espectros Raman de las muestras TP3H4 y TP3H6 (muestras obtenidas con agregado en la síntesis de 30% m/m de porógeno, tratadas a 800°C) y también de TP3 utilizada con fines comparativos. Los mismos evidenciaron bandas características de cada una de las fases del dióxido de titanio (anatasa para las muestras con HA y rutilo para la muestra sin HA). La Fig. 6.17 muestra el intervalo $750\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ donde se ve la aparición de la banda centrada en 796 cm^{-1} atribuida al modo de estiramiento asimétrico de PO_4^{3-} , la cual podría adjudicarse a la interacción de grupos hidroxilo o fosfato de HA con TiO_2 , tal como lo evidenciaron las muestras sin PVP agregado. Esta observación indica que la presencia de polivinilpirrolidona no afecta la interacción entre el dióxido de titanio y la hidroxiapatita. Con el fin de contrastar el comportamiento de la HA sintetizada en esta tesis, se analizó el espectro Raman de una muestra equivalente a la TP3H4 preparada con HA comercial provista por Sigma-Aldrich (muestra TP3H4-C). El espectro correspondiente mostrado en la Fig. 6.17, no muestra diferencias con respecto a los demás espectros, y se observa también la señal centrada en 796 cm^{-1} .

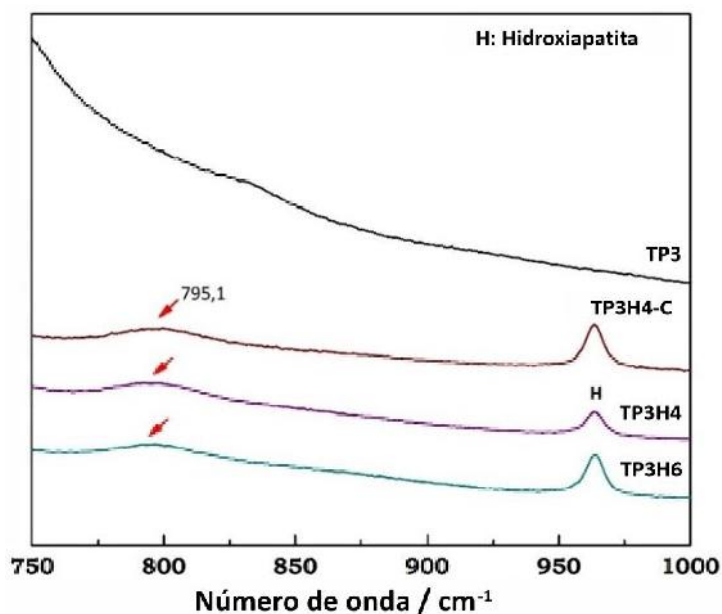


Figura 6.17: Aumento en la región de 750-1000 cm^{-1} para las muestras obtenidas en presencia de PVP tratadas térmicamente a 800°C.

6.7. Ensayos *in vitro* de adhesión celular

Se realizaron ensayos de adhesión celular sobre las muestras que presentaron las características estructurales y textural más adecuadas. Éstas fueron las preparadas con 30% de PVP y diferentes contenidos de nanopartículas de HA (muestras TP3, TP3H4, TP3H6), y sintetizadas a 800°C. Adicionalmente, se preparó un gel compuesto con 30% de PVP, y 40% de un polvo de HA comercial (Sigma-Aldrich) que se denominó TP3H4C, y se utilizó con fines comparativos. La Figura 6.18 muestra los monolitos preparados para esta serie de ensayos.



Figura 6.18: Materiales porosos preparados a partir de la dispersión de HA nanométrica obtenida por síntesis hidrotérmica en geles de TiO_2 , con la adición de PVP, secados con CO_2 supercrítico y sinterizados a 800°C.

Para los ensayos de adhesión celular en los materiales obtenidos, se utilizó la línea celular MG63. Se trata de una línea tumoral con una alta tasa de proliferación, incluso más alta que los osteoblastos, pero que presenta rasgos típicos de osteoblastos asociados a las células formadoras de hueso, mostrando un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina. Asimismo, este tipo de células exhibe varios marcadores fenotípicos similares a los osteoblastos. Por lo tanto, las células MG63 son consideradas osteoblastos relativamente inmaduros, por lo que son ampliamente utilizadas en distintos estudios *in vitro* con el fin de evaluar la biocompatibilidad de varios materiales, entre los que encontramos materiales de titanio, injertos óseos y materiales para recubrimientos, entre otros. [208–211]

Para comprender el valor de los resultados que se obtuvieron de los ensayos *in vitro* es necesario conocer en qué consiste la adhesión celular. La adhesión implica una serie de interacciones bioquímicas y mecánicas:

- Bioquímicas, ya que las células del cuerpo humano están rodeadas y generalmente crecen en una matriz extracelular conocida como material in vivo. Para el caso de las células derivadas del hueso, la adherencia y el crecimiento se producen en una matriz extracelular compuesta por proteoglicanos conteniendo fosfato de calcio y proteínas.

- Mecánicas, puesto que las células óseas pertenecen al grupo de células dependientes de anclaje, es decir, solo pueden sobrevivir *in vitro* al unirse a una superficie.

Por lo tanto, la proliferación y diferenciación celular puede tener lugar si se logra la adhesión celular. En consecuencia, las interacciones iniciales entre la célula y el sustrato juegan un papel crítico durante la osteointegración del implante, ya que las prestaciones de los materiales implantados están intrínsecamente vinculados a las interacciones entre el fluido biológico y la superficie de los implantes. Esta interacción es a menudo mediada por proteínas adsorbidas de la biología del fluido. Las características de la superficie en términos de rugosidad, topografía y química de la superficie son entonces transcritas por la capa de proteína en información “comprensible” para las células [208,212].

La adhesión celular se inicia básicamente, por la humectación de la superficie del sustrato, en este caso con el medio de cultivo *in vitro*, dando lugar a la adsorción inmediata de agua y proteínas sobre la superficie. La Fig. 6.19

muestra el esquema de adhesión celular y las proteínas involucradas, donde se aprecia que las células se unen inicialmente a la película de acondicionamiento a través de interacciones como las fuerzas de van der Waals e iónicas, y posteriormente a través de las proteínas de mediación celulares adsorbidas. Las proteínas adsorbidas interactúan con las moléculas de la superficie celular conocidas como integrinas. Las integrinas son los receptores de la superficie celular y son moléculas transmembrana que actúan como una interfaz entre los compartimentos intracelular y extracelular. Del lado intracelular, las integrinas interactúan con las moléculas del citoesqueleto y con las moléculas de señalización denominadas adherencias focales.

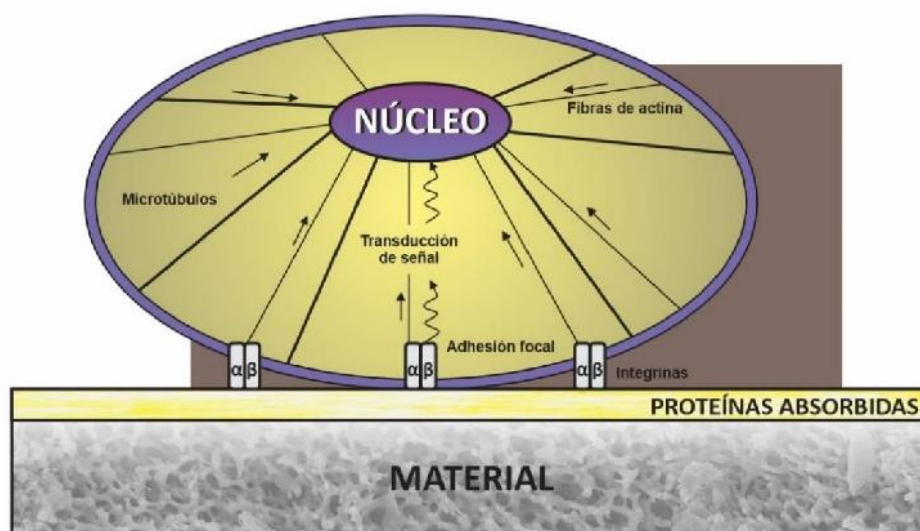


Figura 6.19: Esquema de las proteínas involucradas en la unión de células eucariotas derivadas del hueso sobre materiales.[213]

Finalmente, luego de la adhesión y la difusión, las células deben asegurar su estabilidad a través de las fibras de actina en todo el cuerpo celular y equilibrado por los microtúbulos. Las células también pueden migrar y orientarse sobre la topografía de la superficie. La migración celular es impulsada por los filopodios celulares. Los mismos son usados por las células para explorar su alrededor inmediatamente antes de migrar. Las interacciones bioquímicas y mecánicas permiten la transducción de señales al núcleo celular que puede inducir la muerte celular a través de la apoptosis o el crecimiento y la

diferenciación celular. La adhesión y migración celular exitosa son seguidas por la división y proliferación celular.[208]

Como se mencionó anteriormente, las células MG63 son células dependientes de anclaje, es decir, que si el material no es apto para que vivan y proliferen, mueren (apoptosis), y esto es lo que se ve en las imágenes de la Fig. 6.20. Se observa que la muestra TP3 (sin HA) no presenta indicios de células en su superficie, mientras que las demás muestras presentan áreas más oscuras, atribuidas a las células.

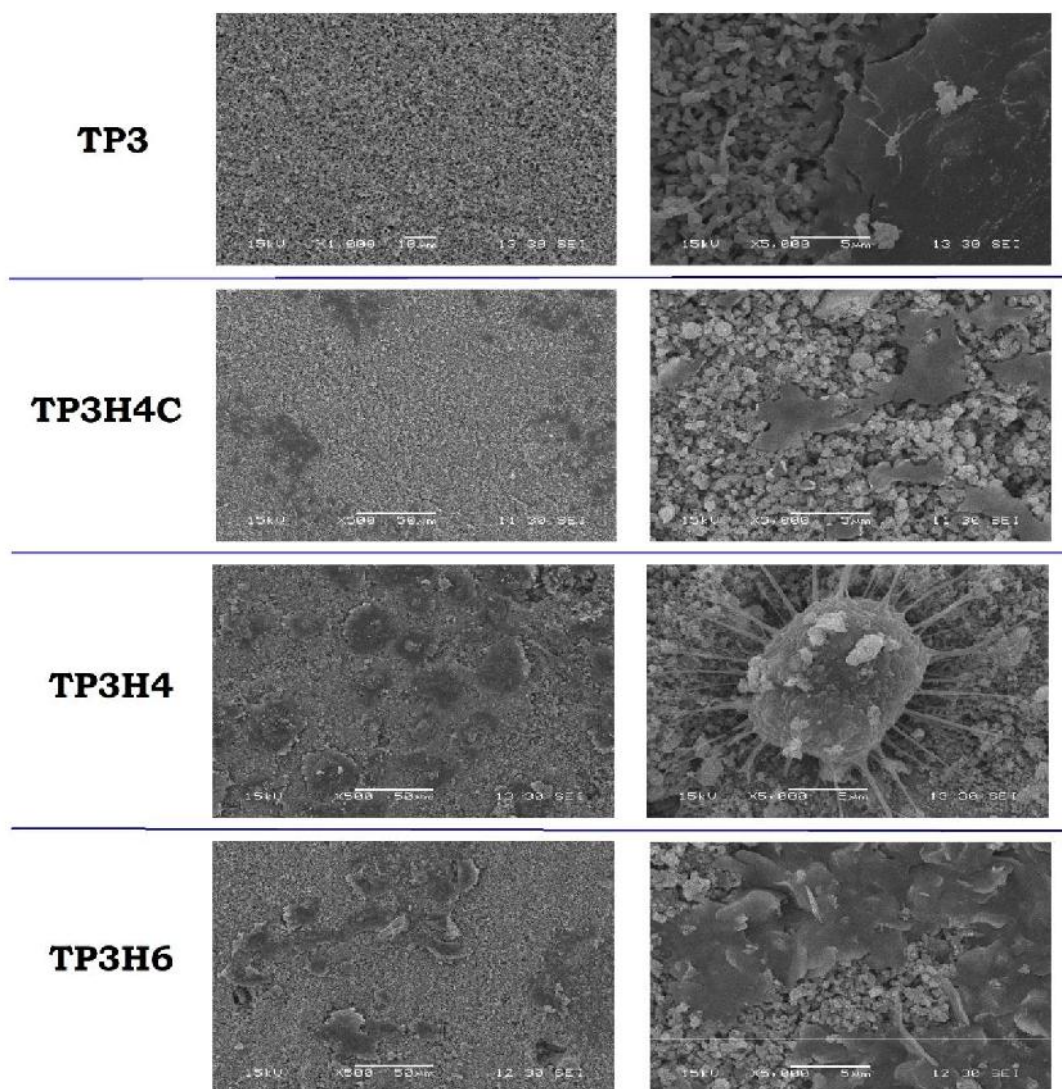


Figura 6.20: Micrografías SEM de la superficie de los materiales ensayados *in vitro* con la línea celular MG63.

Sin embargo, en la muestra TP3 se encontró una zona a mayor magnificación (5kX) donde es posible observar la presencia de una célula desprendida del material. Esto ocurre ya que las células extienden sus filopodios por la superficie en busca de anclaje, al no encontrarlo, la misma sufre apoptosis y se desprende, indicando que esta muestra pese a que es de un material bioinerte como el dióxido de titanio no permite la adhesión de células de tipo osteoblastos. Este hecho está vinculado a la microestructura desarrollada por esta muestra. La misma, posee poros del orden de las micras ($\approx 14 \mu\text{m}$), con partículas poco consolidadas, lo que muestra una textura poco homogénea.

Para las muestras que contienen HA (TP3H4, TP3H6 y TP3H4C) las imágenes a baja magnificación reflejan mayor contenido de células en la superficie de las muestras TP3H4 y TP3H6. En la muestra TP3H4C las células están sólo sobre la superficie del material, y no muestran filopodios extendidos, posiblemente las células se lograron anclar de cierta forma al material, pero solo sobre la superficie del mismo. Sobre la muestra TP3H4 se observa una célula que probablemente este por morir y que se alimenta de las partículas sueltas que contiene el material, sin embargo, cabe resaltar la presencia de filopodios extendidos en búsqueda de células vecinas. Por otro lado, la muestra TP3H6 presenta células más adheridas a la superficie del material, siguiendo incluso la topografía de este.

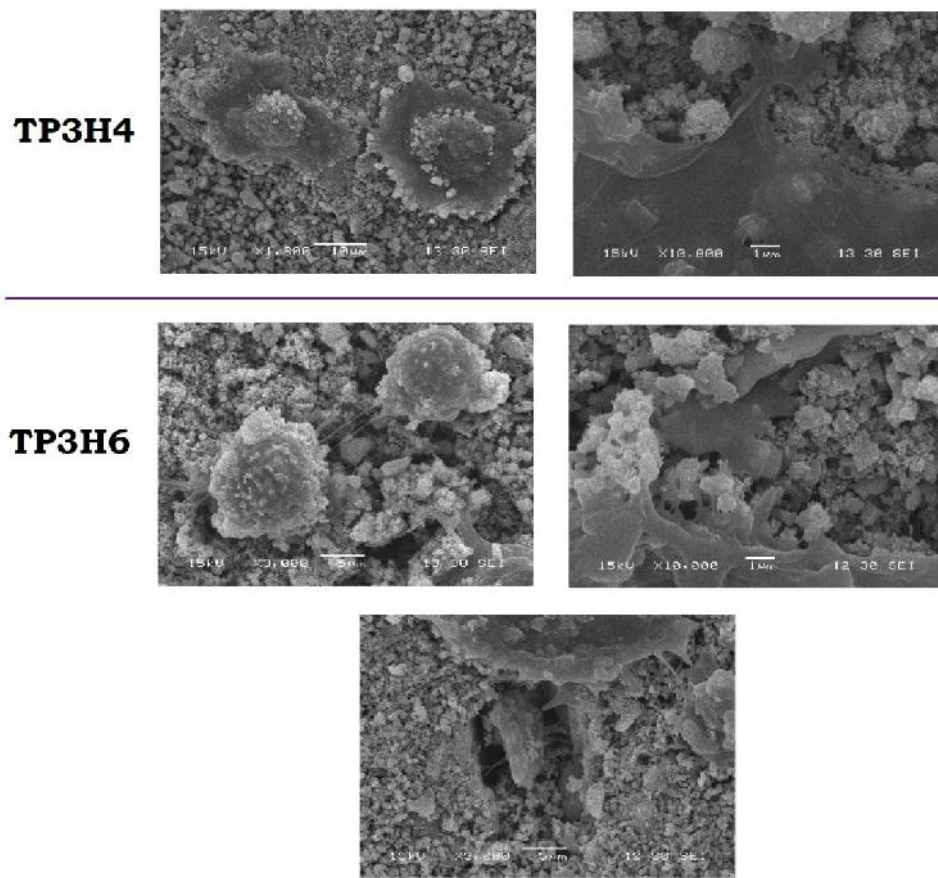
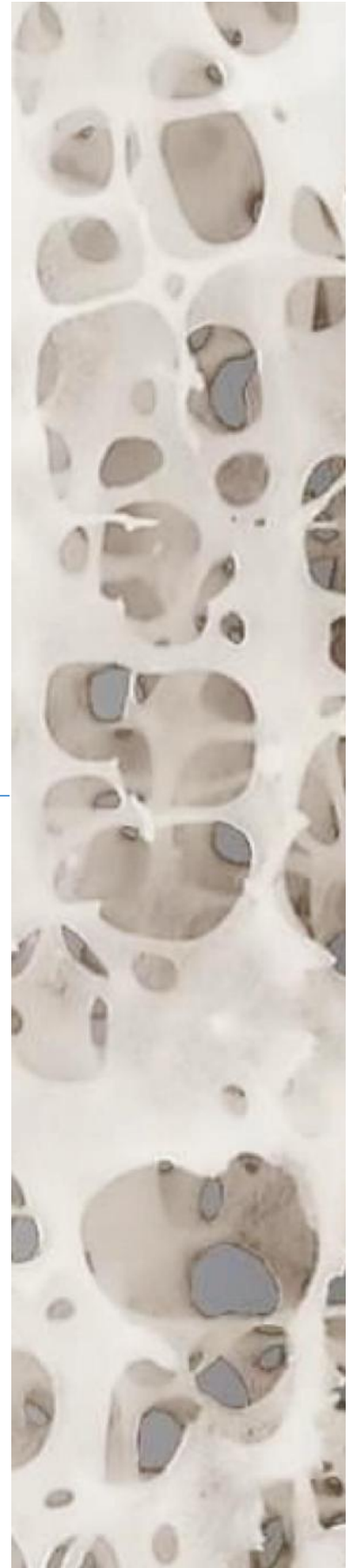


Figura 6.21: Micrografías SEM de los materiales TP3H4 y TP3H6 luego del ensayo de adhesión celular

Las imágenes de la Figura 6.21 nos permiten ver cómo los filopodios se extienden incluso dentro de los poros del material y cómo las células están conectadas entre sí. De igual forma para la muestra TP3H4 se observan los filopodios de las células anclados al material y a otras células. Esto nos permite concluir que los materiales obtenidos de forma sintética en este trabajo favorecen la adhesión de las células tipo osteoblastos MG63 y su proliferación, siendo la muestra con 60% de HA la que mejor respuesta presentó frente a las células.

Capítulo VII

Conclusiones generales



7.1. Conclusiones generales

A través de la historia, diversas investigaciones se han enfocado en el estudio y la obtención de materiales porosos que logren imitar la morfología y función de la estructura ósea, optimizando la integración con el tejido circundante, y obtener así soportes para osteogénesis. Sin embargo, en la actualidad sigue siendo un desafío la obtención de ese tipo de materiales, ya que abarca una serie de requerimientos tanto fisicoquímicos como biológicos que son difíciles de lograr. En este aspecto, el objetivo principal del presente trabajo fue aportar conocimiento en el desarrollo de materiales compuestos nanoestructurados porosos de dióxido de titanio e hidroxiapatita (TiO_2 -HA) que puedan ser utilizados como materiales de relleno óseo.

Este trabajo dio lugar a la obtención de materiales porosos de TiO_2 y sistemas compuestos de TiO_2 -HA, integrando etapas que incluyen procesos hidrotermales, sol-gel y secado supercrítico. La metodología implementada permitió la inclusión de 30 % m/m de HA al sistema de TiO_2 , lo que resultó favorable para el desarrollo de una porosidad abierta y una microestructura homogénea. Se logró obtener materiales consolidados (calcinados a 800 °C) con una respuesta satisfactoria frente a los ensayos *in vitro* de adhesión con células de tipo osteoblastos, aunque aún queda el desafío de lograr una certera caracterización mecánica. Además, los materiales desarrollados presentaron fases cristalinas estables a 800°C de anatasa e hidroxiapatita, que aportan propiedades específicas al biomaterial desarrollado. Así mismo, se consiguió detectar la interacción de dichas fases presentes, sin evidencia de reactividad entre ellas, lo que determina una buena integración de las fases en la estructuración final del material compuesto, siendo este uno de los mayores desafíos del trabajo.

7.1.1. Síntesis hidrotermal de HA

La síntesis hidrotermal a partir de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y H_3PO_4 dio lugar a la obtención de nanopartículas de HA con tamaños y morfología controlada. El agregado de hexametilentetramina (HMTA) resultó eficiente para controlar el tamaño de las partículas, permitiendo obtener partículas con una distribución bimodal de tamaños medios 61 (~74%) y 225 (~26%) nm. Además, implementando un procedimiento de enfriamiento rápido en la síntesis, se logró la formación de defectos estructurales en las nanopartículas sintetizadas lo que conlleva a incrementar su bioactividad. Las características de tamaño y morfología de las partículas de HA obtenidas en estas condiciones resultaron las más adecuadas (en comparación con las otras preparaciones) para su inclusión en la síntesis de los geles compuestos.

7.1.2. Síntesis sol-gel para la obtención de geles compuestos de TiO₂-HA

La versatilidad del método sol-gel permitió desarrollar la formación de una matriz de TiO₂ con partículas nanométricas de HA dispersas, y con buena interacción de fases. Las etapas de formación del sol y de obtención de los geles compuestos procedieron a velocidades adecuadas y reproducibles en las condiciones de síntesis seleccionadas. El procedimiento implementado permitió conformar muestras con diversas morfologías tales como: cilindros, pastillas y prismas. Se pudieron fijar parámetros de síntesis que den lugar a geles compuestos bien consolidados, los mismos permitieron la introducción tanto de nanopartículas de HA (hasta un 60% en masa respecto del contenido final de TiO₂) como de agente generador de poro (PVP, hasta un 40% en masa respecto del contenido final de TiO₂), sin generar desestabilización del sistema.

7.1.3. Secado de aerogeles compuestos de TiO₂-HA y calcinación

De acuerdo con el estudio de secado de los aerogeles con CO₂-SC se pudieron establecer las mejores condiciones de temperatura y presión para el proceso. Todas las composiciones de geles compuestos de TiO₂-HA fueron secadas a 60°C y 250 bar con un adicional de solvente, con el fin de evitar grietas en la estructura del material seco. Los geles secos fueron calcinados a 800°C para generar materiales compuestos con porosidad abierta del orden del 70-80 %, con una distribución uniforme de poros, de tamaño entre 5-20 µm. No se evidenció reactividad de las fases componentes a la temperatura de calcinación. Las características microestructurales desarrolladas y el contenido del 30 % m/m de HA (cuantificado en las muestras calcinadas) favorecieron una buena respuesta superficial del material frente a la adhesión de células tipo osteoblastos.

Referencias

- [1] A. Sáenz, E. Rivera-muñoz, W. Brostow, V.M. Castaño, Ceramic biomaterials : An introductory overview, *J. Mater. Educ.* 21 (1999) 297–306.
- [2] T. Biswal, S.K. BadJena, D. Pradhan, Sustainable biomaterials and their applications: A short review, *Mater. Today Proc.* (2020) 1–9. doi:10.1016/j.matpr.2020.01.437.
- [3] R. Sastre, S. de Aza, J. San Román, Biomateriales, Faenza Editrice Iberica s.l., Italia, 2004.
- [4] D.F. Williams, *Book Reviews, Public Opin. Q.* 36 (1972) 286. doi:10.1086/268003.
- [5] M.A. Lizarbe, *Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a la Ingeniería tisular, Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat. (Esp).* 101 (2007) 227–249.
- [6] F.J. O'Brien, Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Mater. Today.* 14 (2011) 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [7] P.A. González, P. Gaitán, UNIVERSIDAD DE MONTERREY DIVISION DE CIENCIAS DE LA SALUD “ Aplicación del biomaterial Sí lica - Quitosano en la fabricación de cápsulas para liberación de fármacos ” Proyecto de Evaluación Final, Universidad de Monterrey, 2013.
- [8] M. Vallet-Regí, Biocerámicas: evolución y aplicaciones, *An. La Real Soc. Española Química.* 107 (2011) 28–35.
- [9] C.E.P. Bonilla, J.E. Perilla, The past, present and near future of materials for use in biodegradable orthopaedic implants, *Ing. e Investig.* 31 (2011) 124–133.
- [10] E. M, P. RA, M. EB, G. MP, Bioimimetic, Bioresponsive, and Bioactive Materials, A John Wiley & Sons, Inc. Hoboken New Jersey, Hoboken New Jersey, Canada, 2012.
- [11] C. Ning, L. Zhou, G. Tan, Fourth-generation biomedical materials, *Mater. Today.* 19 (2015) 2–3. doi:10.1016/j.mattod.2015.11.005.
- [12] L.L. Fiench, J. Wilson, Surface-Active Biomaterials, *Sci.* 208. 226 (1980) 630–636.
- [13] F. Mahyudin, H. Hermawan, Biomaterials and Medical Devices, *Adv. Struct. Mater.* (2016) 161–181. doi:10.1007/978-3-319-14845-8.
- [14] G. Duffo, Materiales y materias primas, in: Colección Encuentro Inet, Instituto Nacional de Educación (INET), Buenos Aires, 2011: p. 43.
- [15] M.P. Nikolova, M.S. Chavali, Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review, *Bioact. Mater.* 4 (2019) 271–292. doi:10.1016/j.bioactmat.2019.10.005.
- [16] M. Sadat-Shojai, M.T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, A. Jamshidi, Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomater.* 9 (2013) 7591–7621. doi:10.1016/j.actbio.2013.04.012.
- [17] M.M. Stevens, Biomaterials for bone Materials that enhance bone regeneration have a wealth of potential, *Bone.* 11 (2008) 18–25. doi:10.1016/S1369-7021(08)70086-5.
- [18] Francisco Lopez, Estudio de la oosteointegración y posibles alteraciones provocadas por el empleo de implantes dentales en hueso inmaduro. Estudio experimental en mini pigs, Universidad Complutense de Madrid, 2015.
- [19] J.C. Vanegas A., N.S. Landinez P., D.A. Garzón-Alvarado, Generalidades de la interfase hueso-implante dental, *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* 28 (2009) 130–146.
- [20] P. Deb, A.B. Deoghare, A. Borah, E. Barua, S. Das Lala, Scaffold Development Using Biomaterials: A Review, *Mater. Today Proc.* 5 (2018) 12909–12919. doi:10.1016/j.matpr.2018.02.276.
- [21] F. ORGAZ, J. RINCON, F. CAPEL, Materiales bioceramicos y biovidrios, *Boletín La Soc. Española Cerámica y Vidr.* 26 (1987) 13–19.
- [22] E. Velasco Ortega, J. Pato Mourelo, J.J. Segura Egea, O. Pérez Pérez, R. Medel Soterias, La utilización del beta-fosfato tricálcico como biomaterial en implantología oral, *Av. En Periodoncia e Implantol. Oral.* 19 (2007) 141–149. doi:10.4321/s1699-65852007000400003.
- [23] K. Ioku, Hydrothermal preparation of fibrous apatite and apatite sheet, *Solid State Ionics.* 151 (2002) 147–150. doi:10.1016/S0167-2738(02)00593-3.
- [24] J. Liu, X. Ye, H. Wang, M. Zhu, B. Wang, H. Yan, The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method, *Ceram. Int.* 29 (2003) 629–633. doi:10.1016/S0272-8842(02)00210-9.
- [25] C. Li, S. Liu, G. Li, J. Bai, W. Wang, Q. Du, Hydrothermal synthesis of large-sized hydroxyapatite whiskers regulated by glutamic acid in solutions with low supersaturation of precipitation, *Adv. Powder Technol.* 22 (2011) 537–543. doi:10.1016/j.apt.2010.07.013.
- [26] G. Zhang, J. Chen, S. Yang, Q. Yu, Z. Wang, Q. Zhang, Preparation of amino-acid-regulated hydroxyapatite particles by hydrothermal method, *Mater. Lett.* 65 (2011) 572–574. doi:10.1016/j.matlet.2010.10.078.
- [27] S. Pina, J.M. Oliveira, R.L. Reis, Natural-Based Nanocomposites for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Review, *Adv. Mater.* 27 (2015) 1143–1169. doi:10.1002/adma.201403354.

- [28] Y. Yang, Q. Wu, M. Wang, J. Long, Z. Mao, X. Chen, Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite with Different Morphologies: Influence of Supersaturation of the Reaction System, *Cryst. Growth Des.* 14 (2014) 4864–4871. doi:10.1021/cg501063j.
- [29] B. Nasiri-Tabrizi, P. Honarmandi, R. Ebrahimi-Kahrizsangi, P. Honarmandi, Synthesis of nanosize single-crystal hydroxyapatite via mechanochemical method, *Mater. Lett.* 63 (2009) 543–546. doi:10.1016/j.matlet.2008.11.030.
- [30] M. Schneider, A. Baiker, Titania-based aerogels, *Catal. Today.* 35 (1997) 339–365.
- [31] C.A. García-González, M.C. Camino-Rey, M. Alnaief, C. Zetzl, I. Smirnova, Supercritical drying of aerogels using CO₂: Effect of extraction time on the end material textural properties, *J. Supercrit. Fluids.* 66 (2012) 297–306. doi:10.1016/j.supflu.2012.02.026.
- [32] R. Sui, A. Rizkalla, P.A. Charpentier, Experimental study on the morphology and porosity of TiO₂aerogels synthesized in supercritical carbon dioxide, *Microporous Mesoporous Mater.* 142 (2011) 688–695. doi:10.1016/j.micromeso.2011.01.016.
- [33] J.S. Griffin, D.H. Mills, M. Cleary, R. Nelson, V.P. Manno, M. Hodes, Continuous extraction rate measurements during supercritical CO₂drying of silica alcogel, *J. Supercrit. Fluids.* 94 (2014) 38–47. doi:10.1016/j.supflu.2014.05.020.
- [34] R. Moreno, Reología de suspensiones cerámicas, Bouncopy S.A., España, 2005.
- [35] S. Markovi, L. Vasinovic, M.J. Lukić, L. Karanovic, I. Bracko, Nenad Ignjatovic, Dragan Uskokovic, Synthetical bone-like and biological hydroxyapatites : a comparative study of crystal structure and morphology, *Biomed. Mater.* 6 (2011) 13. doi:10.1088/1748-6041/6/4/045005.
- [36] A.N. Vasiliev, E. Zlotnikov, J.G. Khinast, R.E. Riman, Chemisorption of silane compounds on hydroxyapatites of various morphologies, *Scr. Mater.* 58 (2008) 1039–1042. doi:10.1016/j.scriptamat.2007.12.014.
- [37] S.J. Segvich, H.C. Smith, D.H. Kohn, The adsorption of preferential binding peptides to apatite-based materials, *Biomaterials.* 30 (2009) 1287–1298. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.11.008.
- [38] L.G. Bach, M. Rafiqul Islam, T.-S. Vo, S.-K. Kim, K.T. Lim, Poly(allyl methacrylate) functionalized hydroxyapatite nanocrystals via the combination of surface-initiated RAFT polymerization and thiol-ene protocol: A potential anticancer drug nanocarrier, *J. Colloid Interface Sci.* 394 (2013) 132–140. doi:10.1016/j.jcis.2012.11.068.
- [39] J. Sun, L. Wu, Polyether sulfone/hydroxyapatite mixed matrix membranes for protein purification, *Appl. Surf. Sci.* 308 (2014) 155–160. doi:10.1016/j.apsusc.2014.04.123.
- [40] Y. Li, H. Zhou, G. Zhu, C. Shao, H. Pan, X. Xu, R. Tang, High efficient multifunctional Ag₃PO₄ loaded hydroxyapatite nanowires for water treatment, *J. Hazard. Mater.* 299 (2015) 379–387. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389415004884>.
- [41] R.A. Youness, M.A. Taha, H. Elhaes, M. Ibrahim, Molecular modeling, FTIR spectral characterization and mechanical properties of carbonated-hydroxyapatite prepared by mechanochemical synthesis, *Mater. Chem. Phys.* 190 (2017) 209–218. doi:10.1016/j.matchemphys.2017.01.004.
- [42] D. Sidane, H. Rammal, A. Beljebbar, S.C. Gangloff, D. Chicot, F. Velard, H. Khireddine, A. Montagne, H. Kerdjoudj, Biocompatibility of sol-gel hydroxyapatite-titania composite and bilayer coatings, *Mater. Sci. Eng. C.* 72 (2017) 650–658. doi:10.1016/j.msec.2016.11.129.
- [43] W. Liu, G. Qian, L. Liu, B. Zhang, X. Fan, A simple method to controlled synthesis of nano hydroxyapatite in different particle size, *Mater. Lett.* 217 (2018) 177–180. doi:10.1016/j.matlet.2018.01.079.
- [44] X.-Y.Y. Zhao, Y.-J.J. Zhu, B.-Q.Q. Lu, F. Chen, C. Qi, J. Zhao, J. Wu, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods using pyridoxal-5'-phosphate as a phosphorus source, *Mater. Res. Bull.* 55 (2014) 67–70. doi:10.1016/j.materresbull.2014.04.008.
- [45] X. Jin, X. Chen, Y. Cheng, L. Wang, B. Hu, J. Tan, Effects of hydrothermal temperature and time on hydrothermal synthesis of colloidal hydroxyapatite nanorods in the presence of sodium citrate, *J. Colloid Interface Sci.* 450 (2015) 151–158. doi:10.1016/j.jcis.2015.03.010.
- [46] H. Bensalah, M.F. Bekheet, S. Alami Younssi, M. Ouammou, A. Gurlo, Hydrothermal synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from phosphogypsum waste, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 1347–1352. doi:10.1016/j.jece.2018.01.052.
- [47] X. Ma, Y. Chen, J. Qian, Y. Yuan, C. Liu, Controllable synthesis of spherical hydroxyapatite nanoparticles using inverse microemulsion method, *Mater. Chem. Phys.* 183 (2016) 220–229. doi:10.1016/j.matchemphys.2016.08.021.
- [48] S. Manafi, S.H.S. Badiie, Effect of Ultrasonic on Crystallinity of Nano-Hydroxyapatite via Wet Chemical Method, *Iran. J. Pharm. Sci.* 4 (2008) 163–168. http://ijps.ir/?_action=articleInfo&article=2026.
- [49] T.T. Demirtaş, G. Kaynak, M. Gümüşdereliolu, Bone-like hydroxyapatite precipitated from 10×SBF-like solution by microwave irradiation, *Mater. Sci. Eng. C.* 49 (2015) 713–719. doi:10.1016/j.msec.2015.01.057.
- [50] I.S. Neira, Y. V. Kolen'ko, O.I. Lebedev, H.S. Gupta, F. Guitia, An effective morphology control of hydroxyapatite crystal via hydrothermal synthesis, *Cryst. Growth Des.* 9 (2009) 466–474.

- <http://ematweb.cmi.ua.ac.be/emat/pdf/1528.pdf>.
- [51] K. Byrappa, Y. Masahiro, HANDBOOK OF HYDROTHERMAL TECHNOLOGY, Noyes Publications/William Andrew Publishing,LLC, 2001.
- [52] H. Yang, Y. Wang, Morphology control of hydroxyapatite microcrystals: Synergistic effects of citrate and CTAB, *Mater. Sci. Eng. C*. 62 (2016) 160–165. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.052>.
- [53] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, X. Wang, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template, *Mater. Lett.* 60 (2006) 1484–1487. doi:[10.1016/j.matlet.2005.11.053](https://doi.org/10.1016/j.matlet.2005.11.053).
- [54] M. Khalid, M. Mujahid, S. Amin, R.S. Rawat, A. Nusair, G.R. Deen, Effect of surfactant and heat treatment on morphology, surface area and crystallinity in hydroxyapatite nanocrystals, *Ceram. Int.* 39 (2013) 39–50. doi:[10.1016/j.ceramint.2012.05.090](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.05.090).
- [55] A.M. Kirillov, Hexamethylenetetramine: An old new building block for design of coordination polymers, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 1603–1622. doi:[10.1016/j.ccr.2011.01.023](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.023).
- [56] M. Andrés-Vergés, C. Fernández-González, M. Martínez-Gallego, J.D. Solier, I. Cachadiña, E. Matijević, A new route for the synthesis of calcium-deficient hydroxyapatites with low Ca/P ratio: Both spectroscopic and electric characterization, *J. Mater. Res.* 15 (2000) 2526–2533. doi:[10.1557/JMR.2000.0362](https://doi.org/10.1557/JMR.2000.0362).
- [57] J. Shen, B. Jin, Y. Hu, Q. Jiang, An effective route to the synthesis of carbonated apatite crystals with controllable morphologies and their growth mechanism, *CrystEngComm.* 17 (2015) 5422–5430. doi:[10.1039/C5CE00812C](https://doi.org/10.1039/C5CE00812C).
- [58] F. Mohandes, M. Salavati-Niasari, Z. Fereshteh, M. Fathi, Novel preparation of hydroxyapatite nanoparticles and nanorods with the aid of complexing agents, *Ceram. Int.* 40 (2014) 12227–12233. doi:[10.1016/j.ceramint.2014.04.066](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2014.04.066).
- [59] J. Tao, W. Jiang, H. Pan, X. Xu, R. Tang, Preparation of large-sized hydroxyapatite single crystals using homogeneous releasing controls, *J. Cryst. Growth.* 308 (2007) 151–158. doi:[10.1016/j.jcrysgro.2007.08.009](https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2007.08.009).
- [60] G. Demazeau, Solvothermal processes: Definition, key factors governing the involved chemical reactions and new trends, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.* 65 (2010) 999–1006. doi:[10.1515/znb-2010-0805](https://doi.org/10.1515/znb-2010-0805).
- [61] R. Savu, R. Parra, E. Joanni, B. Jančar, S.A. Eliziário, R. de Camargo, P.R. Bueno, J.A. Varela, E. Longo, M.A. Zaghete, The effect of cooling rate during hydrothermal synthesis of ZnO nanorods, *J. Cryst. Growth.* 311 (2009) 4102–4108. doi:[10.1016/j.jcrysgro.2009.06.039](https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2009.06.039).
- [62] V.R. Sivaperumal, R. Mani, M.S. Nachiappan, K. Arumugam, Direct hydrothermal synthesis of hydroxyapatite/alumina nanocomposite, *Mater. Charact.* 134 (2017) 416–421. doi:[10.1016/j.matchar.2017.11.016](https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.11.016).
- [63] M. Yoshimura, P. Sujaridworakun, F. Koh, T. Fujiwara, D. Pongkao, A. Ahniyaz, Hydrothermal conversion of calcite crystals to hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C*. 24 (2004) 521–525. doi:[10.1016/j.msec.2004.01.005](https://doi.org/10.1016/j.msec.2004.01.005).
- [64] H. Zhang, B.W. Darvell, Synthesis and characterization n of hydroxyapatite whiskers by hydrothermal homogeneous precipitation using acetamide, *J. Am. Ceram. Soc.* (2010) 3216–3222. doi:[10.1111/j.1551-2916.2010.04338.x](https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2010.04338.x).
- [65] A.I. Bucur, R.A. Bucur, Z. Szabadai, C. Mosoarca, P.A. Linul, Influence of small concentration addition of tartaric acid on the 220 °C hydrothermal synthesis of hydroxyapatite, *Mater. Charact.* 132 (2017) 76–82. doi:[10.1016/j.matchar.2017.07.047](https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.07.047).
- [66] D. Yamini, G. Devanand Venkatasubbu, J. Kumar, V. Ramakrishnan, Raman scattering studies on PEG functionalized hydroxyapatite nanoparticles, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 117 (2014) 299–303. doi:[10.1016/j.saa.2013.07.064](https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.07.064).
- [67] M. Salarian, M. Solati-Hashjin, S. Sara Shafiei, A. Goudarzi, R. Salarian, A. Nemati, Surfactant-assisted synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods under hydrothermal conditions, *Mater. Sci. Pol.* 27 (2009) 961–971.
- [68] E. Iyyappan, P. Wilson, Synthesis of nanoscale hydroxyapatite particles using triton X-100 as an organic modifier, *Ceram. Int.* 39 (2013) 771–777. doi:[10.1016/j.ceramint.2012.06.090](https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.06.090).
- [69] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 600–612. doi:[10.1002/jbm.10280](https://doi.org/10.1002/jbm.10280).
- [70] B.D. Cullity, S.R. Stock, *Elements of X-Ray Diffraction*, 2012. doi:[10.1002/9781118521014.ch3](https://doi.org/10.1002/9781118521014.ch3).
- [71] T. Ma, Z. Xia, L. Liao, Effect of reaction systems and surfactant additives on the morphology evolution of hydroxyapatite nanorods obtained via a hydrothermal route, *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 4384–4388. doi:[10.1016/j.apsusc.2010.12.067](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2010.12.067).
- [72] V. Strano, R.G. Urso, M. Scuderi, K.O. Iwu, F. Simone, E. Ciliberto, C. Spinella, S. Mirabella, Double role of HMTA in ZnO nanorods grown by chemical bath deposition, *J. Phys. Chem. C*. 118 (2014) 28189–28195. doi:[10.1021/jp507496a](https://doi.org/10.1021/jp507496a).
- [73] K.M. McPeak, T.P. Le, N.G. Britton, Z.S. Nickolov, Y.A. Elabd, J.B. Baxter, Chemical bath deposition of ZnO nanowires at near-neutral pH conditions without hexamethylenetetramine (HMTA): Understanding the role of HMTA in ZnO nanowire growth, *Langmuir.* 27 (2011) 3672–

3677. doi:10.1021/la105147u.
- [74] A. Sugunan, H.C. Warad, M. Boman, J. Dutta, Zinc oxide nanowires in chemical bath on seeded substrates: Role of hexamine, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 39 (2006) 49–56. doi:10.1007/s10971-006-6969-y.
- [75] Z. Cao, B.I. Lee, W.D. Samuels, G.J. Exarhos, Thermal behavior of sol-gel derived phosphate ceramics, *J. Phys. Chem. Solids.* 61 (2000) 1677–1685. doi:10.1016/S0022-3697(00)00028-7.
- [76] X. Ji, R. Zuo, S. Qi, L. Liu, Synthesis, characterization and electrical properties of sol-gel derived $0.63\text{Bi}(\text{Mg } 1/2\text{Ti } 1/2)\text{O } 3-0.37\text{PbTiO } 3$ high-T c piezoelectric ceramics, *Mater. Chem. Phys.* 134 (2012) 1179–1184. doi:10.1016/j.matchemphys.2012.04.017.
- [77] A. Kritikaki, A. Tsetsekou, Fabrication of porous alumina ceramics from powder mixtures with sol-gel derived nanometer alumina: Effect of mixing method, *J. Eur. Ceram. Soc.* 29 (2009) 1603–1611. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2008.10.011.
- [78] B. Naderi-Beni, A. Alizadeh, Development of a new sol-gel route for the preparation of aluminum oxynitride nano-powders, *Ceram. Int.* 46 (2020) 913–920. doi:10.1016/j.ceramint.2019.09.049.
- [79] E.K. Papynov, O.O. Shichalin, V.I. Apanasevich, I.S. Afonin, I.O. Evdokimov, V.Y. Mayorov, A.S. Portnyagin, I.G. Agafonova, Y.E. Skurikhina, M.A. Medkov, Synthetic CaSiO_3 sol-gel powder and SPS ceramic derivatives: “In vivo” toxicity assessment, *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* 29 (2019) 569–575. doi:10.1016/j.pnsc.2019.07.004.
- [80] N. Pawlik, B. Szpikowska-Sroka, T. Goryczka, W.A. Pisarski, Photoluminescence investigation of sol-gel glass-ceramic materials containing $\text{SrF}_2:\text{Eu}^{3+}$ nanocrystals, *J. Alloys Compd.* 810 (2019) 151935. doi:10.1016/j.jallcom.2019.151935.
- [81] D. Kowalczyk, S. Brzezinski, I. Kaminska, S. Wrobel, U. Mizerska, W. Fortuniak, E. Piorkowska, M. Svyntkivska, T. Makowski, Electrically conductive composite textiles modified with graphene using sol-gel method, *J. Alloys Compd.* 784 (2019) 22–28. doi:10.1016/j.jallcom.2018.12.368.
- [82] H. Yang, C. Li, X. Yue, J. Huo, F. Ye, J. Liu, F. Shi, J. Ma, New BN/SiOC aerogel composites fabricated by the sol-gel method with excellent thermal insulation performance at high temperature, *Mater. Des.* 185 (2020) 108217. doi:10.1016/j.matdes.2019.108217.
- [83] A. Abdollahi, H. Roghani-Mamaqani, M. Salami-Kalajahi, A. Mousavi, B. Razavi, S. Shahi, Preparation of organic-inorganic hybrid nanocomposites from chemically modified epoxy and novolac resins and silica-attached carbon nanotubes by sol-gel process: Investigation of thermal degradation and stability, *Prog. Org. Coatings.* 117 (2018) 154–165. doi:10.1016/j.porgcoat.2018.01.001.
- [84] M. Geffers, U. Gbureck, C. Moseke, E. Vorndran, *Organic/Inorganic Hybrid Nanoceramics Based on Sol-Gel Chemistry*, Elsevier Ltd., 2015. doi:10.1016/b978-0-12-799947-0.00003-1.
- [85] H.E. Romeo, M. Cameo, M. V. Choren, M.A. Fanovich, Functionalized bridged silsesquioxane-based nanostructured microspheres: Ultrasound-assisted synthesis and in vitro cytotoxicity characterization, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22 (2011) 935–943. doi:10.1007/s10856-011-4261-3.
- [86] W. Zhu, H. Yang, Y. Xie, S. Sun, X. Guo, Hierarchically porous titania xerogel monoliths: Synthesis, characterization and electrochemical properties, *Mater. Res. Bull.* 73 (2016) 48–55. doi:10.1016/j.materresbull.2015.08.025.
- [87] N. Abbas, G.N. Shao, M.S. Haider, S. Muhammad, S. Soo, S. Jeon, H. Taik, Inexpensive sol-gel synthesis of multiwalled carbon nanotube-TiO₂ hybrids for high performance antibacterial materials, *Mater. Sci. Eng. C.* 68 (2016) 780–788. <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.036>.
- [88] G.J. Owens, R.K. Singh, F. Foroutan, M. Alqaysi, C. Han, C. Mahapatra, H. Kim, J.C. Knowles, Sol-gel based materials for biomedical applications, *Prog. Mater. Sci.* 77 (2016) 1–79. doi:10.1016/j.pmatsci.2015.12.001.
- [89] H. Yang, Z. Liu, H. Gao, Z. Xie, Synthesis and characterization of hierarchical titania-silica monolith, *Catal. Today.* 216 (2013) 90–94. doi:10.1016/j.cattod.2013.05.025.
- [90] J.Y. Han, Z.T. Yu, L. Zhou, Hydroxyapatite/titania composite bioactivity coating processed by sol-gel method, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 455–458. doi:10.1016/j.apsusc.2008.06.072.
- [91] M. Ogawa, A simple sol-gel route for the preparation of silica-surfactant mesostructured materials, *Chem. Commun.* (1996) 1149–1150. doi:10.1039/CC9960001149.
- [92] J. Zhang, J. Zhou, X. Huang, L. Wang, G. Liu, J. Cheng, In situ preparation of hierarchically porous β -tricalcium phosphate bioceramic scaffolds by the sol-gel method combined with F127, *Ceram. Int.* (2019). doi:10.1016/j.ceramint.2019.11.117.
- [93] J. Aguado-Serrano, M.L. Rojas-Cervantes, Titania aerogels: Influence of synthesis parameters on textural, crystalline, and surface acid properties, *Microporous Mesoporous Mater.* 88 (2006) 205–213. doi:10.1016/j.micromeso.2005.09.011.
- [94] C.J. Brinker; G. W. Scherer, *Sol-Gel Science The physics and chemistry of sol-gel processing*, 1990. doi:10.1016/S0254-0584(02)00315-2.
- [95] Y. Ochoa, Y. Ortégón, J. Enrique, R. Páez, J.E. Rodríguez Páez, J. Enrique, R. Páez, Synthesis of TiO₂, anatase phase by the sol-gel method: study of the effect of the presence of AcacH in

- the system, *Rev. Fac. Ing. Unive. Antioquia*. 52 (2010) 29–40.
- [96] L.L. Hench, J.K. West, The Sol-Gel Process, *Chem. Rev.* 90 (1990) 33–72. doi:10.1021/cr00099a003.
- [97] J. Ge, M. Li, Q. Zhang, C.Z. Yang, P.H. Wooley, X. Chen, S.Y. Yang, Silica aerogel improves the biocompatibility in a poly- ϵ -caprolactone composite used as a tissue engineering scaffold, *Int. J. Polym. Sci.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/402859.
- [98] R.R. Mallepally, M.A. Marin, V. Surampudi, B. Subia, R.R. Rao, S.C. Kundu, M.A. McHugh, Silk fibroin aerogels: Potential scaffolds for tissue engineering applications, *Biomed. Mater.* 10 (2015) 35002. doi:10.1088/1748-6041/10/3/035002.
- [99] M. Martins, A.A. Barros, S. Quraishi, P. Gurikov, S.P. Raman, I. Smirnova, A.R.C. Duarte, R.L. Reis, Preparation of macroporous alginate-based aerogels for biomedical applications, *J. Supercrit. Fluids*. 106 (2015). doi:10.1016/j.supflu.2015.05.010.
- [100] D. Arcos, M. Vallet-regí, Sol – gel silica-based biomaterials and bone tissue regeneration, *Acta Biomater.* 6 (2010) 2874–2888. doi:10.1016/j.actbio.2010.02.012.
- [101] F. Kong, Z. Nie, Z. Liu, S. Hou, J. Ji, Developments of nano-TiO₂ incorporated hydroxyapatite/PEEK composite strut for cervical reconstruction and interbody fusion after corpectomy with anterior plate fixation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 187 (2018) 120–125. doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.07.016.
- [102] L. Stipnicec, I. Narkevica, M. Sokolova, J. Locs, J. Ozolins, Novel scaffolds based on hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol) nanocomposite coated porous TiO₂ ceramics for bone tissue engineering, *Ceram. Int.* 42 (2016) 1530–1537. doi:10.1016/j.ceramint.2015.09.101.
- [103] H. Tiainen, J.C. Wohlfahrt, A. Verket, S.P. Lyngstadaas, H.J. Haugen, Bone formation in TiO₂ bone scaffolds in extraction sockets of minipigs, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2384–2391. doi:10.1016/j.actbio.2012.02.020.
- [104] P. Amaravathy, S. Sathyanarayanan, S. Sowndarya, N. Rajendran, Bioactive HA/TiO₂ coating on magnesium alloy for biomedical applications, *Ceram. Int.* 40 (2014) 6617–6630. doi:10.1016/j.ceramint.2013.11.119.
- [105] A. Szczes, L. Holysz, E. Chibowski, Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications, *Adv. Colloid Interface Sci.* 249 (2017) 321–330. doi:10.1016/j.cis.2017.04.007.
- [106] H. Tiainen, D. Wiedmer, H.J. Haugen, Processing of highly porous TiO₂ bone scaffolds with improved compressive strength, *J. Eur. Ceram. Soc.* 33 (2013) 15–24. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2012.08.016.
- [107] W. Xu, W.Y. Hu, M.H. Li, Q.Q. Ma, P.D. Hodgson, C.E. Wen, Sol-gel derived HA/TiO₂ double coatings on Ti scaffolds for orthopedic applications, *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)* 16 (2006) 209–216. doi:10.1016/S1003-6326(06)60177-5.
- [108] H.J. Haugen, M. Monjo, M. Rubert, A. Verket, S.P. Lyngstadaas, J.E. Ellingsen, H.J. Rønold, J.C. Wohlfahrt, Porous ceramic titanium dioxide scaffolds promote bone formation in rabbit peri-implant cortical defect model, *Acta Biomater.* 9 (2013) 5390–5399. doi:10.1016/j.actbio.2012.09.009.
- [109] Y. Zarazua-Aguilar, S.P. Paredes-Carrera, J.C. Sánchez-Ochoa, J.R. Avendaño-Gomez, S.O. Flores-Valle, Influence of microwave/ultrasound irradiation on the sol-gel synthesis of titanium dioxide nanoparticles for application in photocatalysis, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 16 (2017) 899–909.
- [110] V. Etacheri, C. Di Valentin, J. Schneider, D. Bahnemann, S.C. Pillai, Visible-light activation of TiO₂ photocatalysts: Advances in theory and experiments, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 25 (2015) 1–29. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2015.08.003.
- [111] C.N.R. Rao, S.R. Yoganarasimhan, P.A. Faeth, STUDIES ON THE BROOKITE-RUTILE TRANSFORMATION *, *J. Home.* (1960).
- [112] R. Katal, S. Masudy-Panah, M. Tanhaei, M.H.D.A. Farahani, H. Jiangyong, A review on the synthesis of the various types of anatase TiO₂ facets and their applications for photocatalysis, *Chem. Eng. J.* 384 (2020) 123384. doi:10.1016/j.cej.2019.123384.
- [113] N. Rahimi, R.A. Pax, E.M.A. Gray, Review of functional titanium oxides. I: TiO₂ and its modifications, *Prog. Solid State Chem.* 44 (2016) 86–105. doi:10.1016/j.progsolidstchem.2016.07.002.
- [114] B.L. Bischoff, M.A. Anderson, Peptization Process in the Sol-Gel Preparation of Porous Anatase (TiO₂), *Chem. Mater.* 7 (1995) 1772–1778. doi:10.1021/cm00058a004.
- [115] M. Reinke, E. Ponomarev, Y. Kuzminykh, P. Hoffmann, combinatorial characterization of TiO₂ chemical vapor deposition utilizing titanium isopropoxide, *ACS Comb. Sci.* 17 (2015) 413–420.
- [116] H. Sakai, H. Kawahara, M. Shimazaki, M. Abe, Preparation of ultrafine titanium dioxide particles using hydrolysis and condensation reactions in the inner aqueous phase of reversed micelles: Effect of alcohol addition, *Langmuir*. 14 (1998) 2208–2211. doi:10.1021/la970952r.
- [117] Y.W. Jun, J.S. Choi, J. Cheon, Shape control of semiconductor and metal oxide nanocrystals through nonhydrolytic colloidal routes, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45 (2006) 3414–3439. doi:10.1002/anie.200503821.
- [118] T. Fiedler, I. V. Belova, G.E. Murch, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, Tailoring elastic properties of PLGA/TiO₂ biomaterials, *Comput. Mater. Sci.* 61 (2012) 283–286.

- doi:10.1016/j.commat.2012.04.043.
- [119] M. Vedhanayagam, S. Anandasadagopan, B.U. Nair, K.J. Sreeram, Polymethyl methacrylate (PMMA) grafted collagen scaffold reinforced by PdO-TiO₂ nanocomposites, *Mater. Sci. Eng. C*. 108 (2020) 110378. doi:10.1016/j.msec.2019.110378.
- [120] A. Klemm, M. Gomez-Florit, P.A. Carvalho, M. Wachendörfer, M.E. Gomes, H.J. Haugen, H. Tiainen, Grain boundary corrosion in TiO₂ bone scaffolds doped with group II cations, *J. Eur. Ceram. Soc.* 39 (2019) 1577–1585. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2018.12.055.
- [121] A. Klemm, H. Tiainen, Coagulated concentrated anatase slurry leads to improved strength of ceramic TiO₂ bone scaffolds, *Ceram. Int.* 44 (2018) 6265–6271. doi:10.1016/j.ceramint.2018.01.013.
- [122] S.M. Mirhadi, N. Hassanzadeh Nemati, F. Tavangarian, M. Daliri Joupari, Fabrication of hierarchical meso/macroporous TiO₂ scaffolds by evaporation-induced self-assembly technique for bone tissue engineering applications, *Mater. Charact.* 144 (2018) 35–41. doi:10.1016/j.matchar.2018.06.035.
- [123] M. Rasoulboroujeni, F. Fahimipour, P. Shah, K. Khoshroo, M. Tahriri, H. Eslami, A. Yadegari, E. Dashtimoghdam, L. Tayebi, Development of 3D-printed PLGA/TiO₂ nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering applications, *Mater. Sci. Eng. C*. 96 (2019) 105–113. doi:10.1016/j.msec.2018.10.077.
- [124] R. Shafaghi, O. Rodriguez, S. Phull, E.H. Schemitsch, P. Zalzal, S.D. Waldman, M. Papini, M.R. Towler, Effect of TiO₂ doping on degradation rate, microstructure and strength of borate bioactive glass scaffolds, *Mater. Sci. Eng. C*. 107 (2020) 110351. doi:10.1016/j.msec.2019.110351.
- [125] R. Wang, P. Zhu, W. Yang, S. Gao, B. Li, Q. Li, Direct-writing of 3D periodic TiO₂ bio-ceramic scaffolds with a sol-gel ink for in vitro cell growth, *Mater. Des.* 144 (2018) 304–309. doi:10.1016/j.matdes.2018.02.040.
- [126] Q. Zhu, X. Li, Z. Fan, Y. Xu, H. Niu, C. Li, Y. Dang, Z. Huang, Y. Wang, J. Guan, Biomimetic polyurethane/TiO₂ nanocomposite scaffolds capable of promoting biomineralization and mesenchymal stem cell proliferation, *Mater. Sci. Eng. C*. 85 (2018) 79–87. doi:10.1016/j.msec.2017.12.008.
- [127] A.J. Sunija, Biomaterials and biotechnological schemes utilizing TiO₂ nanotube arrays—A review, Elsevier Ltd, 2018. doi:10.1016/b978-0-08-102205-4.00008-8.
- [128] N. Watcharajittanont, M. Tabrizian, C. Putson, P. Pripatnanont, J. Meesane, Osseointegrated membranes based on electro-spun TiO₂/hydroxyapatite/polyurethane for oral maxillofacial surgery, *Mater. Sci. Eng. C*. 108 (2020) 110479. doi:10.1016/j.msec.2019.110479.
- [129] R. Arumugam, V. Subramanyam, R.K. Chinnadurai, E.S. Srinadhu, B. Subramanian, S. Nallani, Development of novel mechanically stable porous nanocomposite (PVDF-PMMA/HAp/TiO₂) film scaffold with nanowiskers surface morphology for bone repair applications, *Mater. Lett.* 236 (2019) 694–696. doi:10.1016/j.matlet.2018.11.023.
- [130] H.R. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, M.P. Staiger, G.J. Dias, Z. Hadisi, M. Saheban, M. Kashefian, Drug release, cytocompatibility, bioactivity, and antibacterial activity of doxycycline loaded Mg-Ca-TiO₂ composite scaffold, *Mater. Des.* 139 (2018) 212–221. doi:10.1016/j.matdes.2017.10.072.
- [131] L. Bergamonti, C. Bergonzi, C. Graiff, P.P. Lottici, R. Bettini, L. Elviri, 3D printed chitosan scaffolds: A new TiO₂ support for the photocatalytic degradation of amoxicillin in water, *Water Res.* 163 (2019) 114841. doi:10.1016/j.watres.2019.07.008.
- [132] H. Eslami, H. Azimi Lisar, T.S. Jafarzadeh Kashi, M. Tahriri, M. Ansari, T. Rafiei, F. Bastami, A. Shahin-Shamsabadi, F. Mashhadi Abbas, L. Tayebi, Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)/TiO₂ nanotube bioactive composite as a novel scaffold for bone tissue engineering: In vitro and in vivo studies, *Biologicals*. 53 (2018) 51–62. doi:10.1016/j.biologicals.2018.02.004.
- [133] K. Khoshroo, T.S. Jafarzadeh Kashi, F. Moztarzadeh, M. Tahriri, H.E. Jazayeri, L. Tayebi, Development of 3D PCL microsphere/TiO₂ nanotube composite scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*. 70 (2017) 586–598. doi:10.1016/j.msec.2016.08.081.
- [134] Q. He, Z. Zhang, J. Xiong, Y. Xiong, H. Xiao, A novel biomaterial - Fe₃O₄:TiO₂ core-shell nano particle with magnetic performance and high visible light photocatalytic activity, *Opt. Mater. (Amst)*. 31 (2008) 380–384. doi:10.1016/j.optmat.2008.05.011.
- [135] M. Hasmaliza, H.S. Foo, K. Mohd, Anatase as Antibacterial Material in Ceramic Tiles, *Procedia Chem.* 19 (2016) 828–834. doi:10.1016/j.proche.2016.03.109.
- [136] H.U. Lee, S.C. Lee, S.M. Lee, J.W. Lee, H.J. Kim, J. Lee, Improved photocatalytic and antibacterial activities of three-dimensional polycrystalline anatase TiO₂ photocatalysts, *Appl. Catal. A Gen.* 467 (2013) 394–399. doi:10.1016/j.apcata.2013.07.042.
- [137] T. Tao, I.T. Bae, K.B. Woodruff, K. Sauer, J. Cho, Hydrothermally-grown nanostructured anatase TiO₂ coatings tailored for photocatalytic and antibacterial properties, *Ceram. Int.* 45 (2019) 23216–23224. doi:10.1016/j.ceramint.2019.08.017.
- [138] P. Rokicka-Konieczna, A. Wanag, A. Sienkiewicz, E. Kusiak-Nejman, A.W. Morawski, Antibacterial effect of TiO₂ nanoparticles modified with APTES, *Catal. Commun.* 134 (2020) 105862. doi:10.1016/j.catcom.2019.105862.

- [139] X. Zhang, M. Li, X. He, R. Hang, X. Huang, Y. Wang, X. Yao, B. Tang, Antibacterial activity of single crystalline silver-doped anatase TiO₂ nanowire arrays, *Appl. Surf. Sci.* 372 (2016) 139–144. doi:10.1016/j.apsusc.2015.12.094.
- [140] P. Maheswari, S. Harish, M. Navaneethan, C. Muthamizhchelvan, S. Ponnusamy, Y. Hayakawa, Bio-modified TiO₂ nanoparticles with *Withania somnifera*, *Eclipta prostrata* and *Glycyrrhiza glabra* for anticancer and antibacterial applications, *Mater. Sci. Eng. C.* 108 (2020) 110457. doi:10.1016/j.msec.2019.110457.
- [141] Y. Chen, X. Tang, X. Gao, B. Zhang, Y. Luo, X. Yao, Antimicrobial property and photocatalytic antibacterial mechanism of the TiO₂-doped SiO₂ hybrid materials under ultraviolet-light irradiation and visible-light irradiation, *Ceram. Int.* 45 (2019) 15505–15513. doi:10.1016/j.ceramint.2019.05.054.
- [142] A. Kar, K.S. Raja, M. Misra, Electrodeposition of hydroxyapatite onto nanotubular TiO₂ for implant applications, *Surf. Coatings Technol.* 201 (2006) 3723–3731. doi:10.1016/j.surfcoat.2006.09.008.
- [143] R.M. Khattab, H.A. Badr, M.F. Zawrah, Effect of processing techniques on properties of porous TiO₂ and TiO₂/hydroxyapatite composites, *Ceram. Int.* 44 (2018) 8643–8649. doi:10.1016/j.ceramint.2018.02.084.
- [144] A. Kodama, S. Bauer, A. Komatsu, H. Asoh, S. Ono, P. Schmuki, Bioactivation of titanium surfaces using coatings of TiO₂ nanotubes rapidly pre-loaded with synthetic hydroxyapatite, *Acta Biomater.* 5 (2009) 2322–2330. doi:10.1016/j.actbio.2009.02.032.
- [145] C.K. Lee, Fabrication, characterization and wear corrosion testing of bioactive hydroxyapatite/nano-TiO₂ composite coatings on anodic Ti-6Al-4V substrate for biomedical applications, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 177 (2012) 810–818. doi:10.1016/j.mseb.2012.03.034.
- [146] A.J. Nathanael, N.S. Arul, N. Ponpandian, D. Mangalaraj, P.C. Chen, Nanostructured leaf like hydroxyapatite/TiO₂ composite coatings by simple sol-gel method, *Thin Solid Films.* 518 (2010) 7333–7338. doi:10.1016/j.tsf.2010.04.105.
- [147] J. Nie, J. Zhou, X. Huang, L. Wang, G. Liu, J. Cheng, Effect of TiO₂ doping on densification and mechanical properties of hydroxyapatite by microwave sintering, *Ceram. Int.* 45 (2019) 13647–13655. doi:10.1016/j.ceramint.2019.04.007.
- [148] F.N. Oktar, Hydroxyapatite-TiO₂ composites, *Mater. Lett.* 60 (2006) 2207–2210. doi:10.1016/j.matlet.2005.12.099.
- [149] R. Palanivelu, A.R. Kumar, Scratch and wear behaviour of plasma sprayed nano ceramics bilayer Al₂O₃-13 wt%TiO₂/hydroxyapatite coated on medical grade titanium substrates in SBF environment, *Appl. Surf. Sci.* 315 (2014) 372–379. doi:10.1016/j.apsusc.2014.07.167.
- [150] M. Prodana, M. Duta, D. Ionita, D. Bojin, M.S. Stan, A. Dinischiotu, I. Demetrescu, A new complex ceramic coating with carbon nanotubes, hydroxyapatite and TiO₂ nanotubes on Ti surface for biomedical applications, *Ceram. Int.* 41 (2015) 6318–6325. doi:10.1016/j.ceramint.2015.01.060.
- [151] S.H. Tsai, Y.C. Yang, Synthesis of the mesoporous TiO₂ array for hydroxyapatite precipitation, *Surf. Coatings Technol.* 231 (2013) 578–582. doi:10.1016/j.surfcoat.2012.11.017.
- [152] Y. Yan, X. Zhang, H. Mao, Y. Huang, Q. Ding, X. Pang, Hydroxyapatite/gelatin functionalized graphene oxide composite coatings deposited on TiO₂ nanotube by electrochemical deposition for biomedical applications, *Appl. Surf. Sci.* 329 (2015) 76–82. doi:10.1016/j.apsusc.2014.12.115.
- [153] Y. Yan, X. Zhang, Y. Huang, Q. Ding, X. Pang, Antibacterial and bioactivity of silver substituted hydroxyapatite/TiO₂ nanotube composite coatings on titanium, *Appl. Surf. Sci.* 314 (2014) 348–357. doi:10.1016/j.apsusc.2014.07.027.
- [154] L.A. Pires, L.J. de Azevedo Silva, B.M. Ferrairo, R. Erbereli, J.F.P. Lovo, O. Ponce Gomes, J.H. Rubo, P.N. Lisboa-Filho, J.A. Griggs, C.A. Fortulan, A.F.S. Borges, Effects of ZnO/TiO₂ nanoparticle and TiO₂ nanotube additions to dense polycrystalline hydroxyapatite bioceramic from bovine bones, *Dent. Mater.* (2019) 1–9. doi:10.1016/j.dental.2019.11.006.
- [155] H. Anmin, L. Tong, L. Ming, C. Chengkang, L. Huiqin, M. Dali, Preparation of nanocrystals hydroxyapatite/TiO₂ compound by hydrothermal treatment, *Appl. Catal. B Environ.* 63 (2006) 41–44. doi:10.1016/j.apcatb.2005.08.003.
- [156] A. Araghi, M.J. Hadianfard, Fabrication and characterization of functionally graded hydroxyapatite/TiO₂ multilayer coating on Ti-6Al-4V titanium alloy for biomedical applications, *Ceram. Int.* 41 (2015) 12668–12679. doi:10.1016/j.ceramint.2015.06.098.
- [157] A. Belcarz, J. Bienias, B. Surowska, G. Ginalska, Studies of bacterial adhesion on TiN, SiO₂-TiO₂ and hydroxyapatite thin layers deposited on titanium and Ti6Al4V alloy for medical applications, *Thin Solid Films.* 519 (2010) 797–803. doi:10.1016/j.tsf.2010.08.117.
- [158] T. Dey, P. Roy, B. Fabry, P. Schmuki, Anodic mesoporous TiO₂ layer on Ti for enhanced formation of biomimetic hydroxyapatite, *Acta Biomater.* 7 (2011) 1873–1879. doi:10.1016/j.actbio.2010.11.011.
- [159] Y. Huang, X. Zhang, H. Zhang, H. Qiao, X. Zhang, T. Jia, S. Han, Y. Gao, H. Xiao, H. Yang, Fabrication of silver- and strontium-doped hydroxyapatite/TiO₂ nanotube bilayer coatings for

- enhancing bactericidal effect and osteoinductivity, *Ceram. Int.* 43 (2017) 992–1007. doi:10.1016/j.ceramint.2016.10.031.
- [160] L. Janovák, Á. Deák, S.P. Tallósy, D. Sebók, E. Csapó, K. Bohinc, A. Abram, I. Pálinkó, I. Dékány, Hydroxyapatite-enhanced structural, photocatalytic and antibacterial properties of photoreactive TiO₂/HAp/polyacrylate hybrid thin films, *Surf. Coatings Technol.* 326 (2017) 316–326. doi:10.1016/j.surfcoat.2017.07.072.
- [161] S. Saber-samandari, H. Yekta, S. Ahmadi, K. Alamara, The role of titanium dioxide on the morphology, microstructure, and bioactivity of grafted cellulose / hydroxyapatite nanocomposites for a potential application in bone repair, *Int. J. Biol. Macromol.* 106 (2018) 481–488. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.031.
- [162] S. Doeuff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage, Hydrolysis of titanium alkoxides: Modification of the molecular precursor by acetic acid, *J. Non. Cryst. Solids.* 89 (1987) 206–216. doi:10.1016/S0022-3093(87)80333-2.
- [163] J. Konishi, K. Fujita, K. Nakanishi, K. Hirao, Monolithic TiO₂ with controlled multiscale porosity via a template-free sol-gel process accompanied by phase separation, *Chem. Mater.* 18 (2006) 6069–6074. doi:10.1021/cm0617485.
- [164] B. Yao, L. Zhang, Preparation and characterization of mesoporous titania gel-monolith, *J. Mater. Sci.* 34 (1999) 5983–5987. doi:10.1023/A:1004780728297.
- [165] J. He, D. Avnir, L. Zhang, Sol-gel derived alumina glass: Mechanistic study of its structural evolution, *Acta Mater.* 174 (2019) 418–426. doi:10.1016/j.actamat.2019.05.062.
- [166] D. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, W.J. Tseng, Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite, *Biomaterials.* 23 (2002) 1679–1687. doi:10.1016/S0142-9612(01)00295-2.
- [167] A.J. Vega, G.W. Scherer, Study of structural evolution of silica gel using ¹H and ²⁹Si NMR, *J. Non. Cryst. Solids.* 111 (1989) 153–166. doi:10.1093/jicru/os23.1.1.
- [168] C. Scherdel, G. Reichenauer, Highly porous silica xerogels without surface modification, *J. Supercrit. Fluids.* 106 (2015) 160–166. doi:10.1016/j.supflu.2015.08.016.
- [169] M.C. Marchi, Estudio de la transición SOL-GEL y de la estructura de geles de titania con sondas fotofísicas, Universidades de Buenos Aires, 2001. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3311_Marchi.pdf.
- [170] J. Zhang, Y. Ma, F. Shi, L. Liu, Y. Deng, Room temperature ionic liquids as templates in the synthesis of mesoporous silica via a sol-gel method, *Microporous Mesoporous Mater.* 119 (2009) 97–103. doi:10.1016/j.micromeso.2008.10.003.
- [171] S. Sert Çok, F. Koç, F. Balkan, N. Gizli, Revealing the pore characteristics and physicochemical properties of silica ionogels based on different sol-gel drying strategies, *J. Solid State Chem.* 278 (2019). doi:10.1016/j.jssc.2019.07.038.
- [172] H.D. Gesser, P.C. Goswami, Aerogels and Related Porous Materials, *Chem. Rev.* 89 (1989) 765–788. doi:10.1021/cr00094a003.
- [173] U. Schubert, Part One Sol – Gel Chemistry and Methods, in: *Sol-Gel Handb. Synth. Charact. Appl.*, 2015; pp. 1–28. doi:10.1002/9783527670819.ch01.
- [174] M.H.A. Alnaief, Process development for production of aerogels with controlled morphology as potential drug carrier systems, Universität Hamburg-Harburg, 2011. doi:10.15480/882.1009.
- [175] V. Baudron, P. Gurikov, I. Smirnova, A continuous approach to the emulsion gelation method for the production of aerogel micro-particle, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 566 (2019) 58–69. doi:10.1016/j.colsurfa.2018.12.055.
- [176] José Luis González Moral, Preparación y caracterización de aerogeles de sílice por secado supercrítico directo y asistido por dióxido de carbono, Universidad Pública de Navarra, 2017.
- [177] M. Lazrag, C. Lemaitre, C. Castel, A. Hannachi, D. Barth, Aerogel production by supercritical drying of organogels: Experimental study and modelling investigation of drying kinetics, *J. Supercrit. Fluids.* 140 (2018) 394–405. doi:10.1016/j.supflu.2018.07.016.
- [178] G. Brunner, *Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and the Application to Separation Processes (Topics in Physical Chemistry)*, Springer, New York, 1994.
- [179] R. Eggers (Ed), *Industrial high pressure applications*, Wiley-VCH Verlag & Co, Weinheim, Germany, 2012.
- [180] C. Tzia, G. Liadakis, eds., *In Extraction Optimization in Food Engineering*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2003.
- [181] B. Long, K.M. Ryan, L. Padrela, From batch to continuous — New opportunities for supercritical CO₂ technology in pharmaceutical manufacturing, *Eur. J. Pharm. Sci.* 137 (2019) 104971. doi:10.1016/j.ejps.2019.104971.
- [182] M. Mukhopadhyay, B.S. Rao, Modeling of supercritical drying of ethanol-soaked silica aerogels with carbon dioxide, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 83 (2008) 1101–1109. doi:10.1002/jctb.
- [183] P. Wawrzyniak, G. Rogacki, J. Pruba, Z. Bartczak, Diffusion of ethanol-carbon dioxide in silica gel, *J. Non. Cryst. Solids.* 225 (1998) 86–90. doi:10.1016/S0022-3093(98)00105-7.
- [184] J.H. Yoon, H.S. Lee, H. Lee, High-Pressure Vapor-Liquid Equilibria for Carbon Dioxide + Methanol, Carbon Dioxide + Ethanol, and Carbon Dioxide + Methanol + Ethanol, *J. Chem. Eng. Data.* 38 (1993) 53–55. doi:10.1021/je00009a012.
- [185] S. Ugaonkar, T.E. Needham, G.D. Bothun, Solubility and partitioning of carbamazepine in a

- two-phase supercritical carbon dioxide/polyvinylpyrrolidone system, *Int. J. Pharm.* 403 (2011) 96–100. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.10.031.
- [186] G. Ozkan, P. Franco, E. Capanoglu, I. De Marco, PVP/flavonoid coprecipitation by supercritical antisolvent process, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 146 (2019). doi:10.1016/j.cep.2019.107689.
- [187] P. Franco, E. Reverchon, I. De Marco, PVP/ketoprofen coprecipitation using supercritical antisolvent process, *Powder Technol.* 340 (2018) 1–7. doi:10.1016/j.powtec.2018.09.007.
- [188] A. Di Capua, R. Adami, E. Cosenza, V. Jalaber, C. Crampon, E. Badens, E. Reverchon, β -Carotene/PVP microspheres produced by Supercritical Assisted Atomization, *Powder Technol.* 346 (2019) 228–236. doi:10.1016/j.powtec.2019.01.069.
- [189] Juvenal González González, DETECCIÓN DE ÉTER ETÍLICO EN MEZCLA CON ETANOL EMPLEANDO COMPUESTOS POLIMÉRICOS A BASE DE POLIVINILPIRROLIDONA (PVP), POLIBUTADIENO (PBD) Y NEGRO DE CARBONO, Universidad Autónoma México, Estado D E Química, Facultad D E, 2016.
- [190] Z. Novak, Ž. Knez, Diffusion of methanol-liquid CO₂ and methanol-supercritical CO₂ in silica aerogels, *J. Non. Cryst. Solids.* 221 (1997) 163–169. doi:10.1016/S0022-3093(97)00342-6.
- [191] D.A.H. Hanaor, C.C. Sorrell, Review of the anatase to rutile phase transformation, *J. Mater. Sci.* 46 (2011) 855–874. doi:10.1007/s10853-010-5113-0.
- [192] M.A. Fanovich, J. Ivanovic, I. Zizovic, D. Misic, P. Jaeger, Functionalization of polycaprolactone/hydroxyapatite scaffolds with *Usnea lethariiformis* extract by using supercritical CO₂, *Mater. Sci. Eng. C.* 58 (2016) 204–212. doi:10.1016/j.msec.2015.08.024.
- [193] J. Xie, S. Lee, X. Chen, Nanoparticle-based theranostic agents, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 1064–1079. doi:10.1016/j.addr.2010.07.009.
- [194] P.A.C. Bedoya, P.M. Botta, M.A. Fanovich, MAGNETIC IRON OXIDES NANOPARTICLES OBTAINED BY MECHANOCHEMICAL REACTIONS FROM DIFFERENT SOLID PRECURSORS, *En Redacción.* (n.d.).
- [195] N. Monmaturapoj, A. Sri-on, W. Klinsukhon, K. Boonnak, C. Prahsarn, Antiviral activity of multifunctional composite based on TiO₂-modified hydroxyapatite, *Mater. Sci. Eng. C.* 92 (2018) 96–102. doi:10.1016/j.msec.2018.06.045.
- [196] Y. Lei, X. Chen, H. Song, Z. Hu, B. Cao, The influence of thermal treatment on the microstructure and thermal insulation performance of silica aerogels, *J. Non. Cryst. Solids.* 470 (2017) 178–183. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2017.05.020.
- [197] X. Wu, W. Li, G. Shao, X. Shen, S. Cui, J. Zhou, Y. Wei, X. Chen, Investigation on textural and structural evolution of the novel crack-free equimolar Al₂O₃-SiO₂-TiO₂ ternary aerogel during thermal treatment, *Ceram. Int.* 43 (2017) 4188–4196. doi:10.1016/j.ceramint.2016.12.044.
- [198] G.W. SCHERER, Viscous Sintering of a Bimodal Pore-Size Distribution, *J. Am. Ceram. Soc.* 67 (1984) 709–715. doi:10.1111/j.1151-2916.1984.tb19506.x.
- [199] A. Emmerling, W. Lenhard, J. Fricke, G.A.L. Van De Vorst, Densification Behaviour of Silica Aerogels upon Isothermal Sintering, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 8 (1997) 837–842. doi:10.1007/BF02436947.
- [200] M.L. Corrin, A COMPARISON OF THE SPECIFIC SCRFACE AREAS OF SOLIDS AS CALCULATED BY THE BRUNAUER-EMMETT-TELLER A_iVD THE HVTTIG EQUATIONS, *J. Phys. Chem.* 309 (1951) 612–613.
- [201] J. Phalippou, T. Woignier, M. Prassas, Glasses from aerogels, *J. Mater. Sci.* 25 (1990) 3111–3117. doi:10.1007/bf00587659.
- [202] S.R. Yoganarasimhan, N.R. Rao, Mechanism of Crystal Structure Transformations, *Trans. Faraday Soc.* (1962) 1579–1589.
- [203] C. Anderson, A.J. Bard, Improved photocatalytic activity and characterization of mixed TiO₂/SiO₂ and TiO₂/Al₂O₃ materials, *J. Phys. Chem. B.* 101 (1997) 2611–2616. doi:10.1016/S0169-4332(98)00318-3.
- [204] M.S.P. Francisco, V.R. Mastelaro, Inhibition of the anatase-rutile phase transformation with addition of CeO₂ to CuO-TiO₂ system: Raman spectroscopy, X-ray diffraction, and textural studies, *Chem. Mater.* 14 (2002) 2514–2518. doi:10.1021/cm011520b.
- [205] C. Byrne, L. Moran, D. Hermosilla, N. Merayo, Á. Blanco, S. Rhatigan, S. Hinder, P. Ganguly, M. Nolan, S.C. Pillai, Effect of Cu doping on the anatase-to-rutile phase transition in TiO₂ photocatalysts: Theory and experiments, *Appl. Catal. B Environ.* 246 (2019) 266–276. doi:10.1016/j.apcatb.2019.01.058.
- [206] P.C. Rath, L. Besra, B.P. Singh, S. Bhattacharjee, Titania/hydroxyapatite bi-layer coating on Ti metal by electrophoretic deposition: Characterization and corrosion studies, *Ceram. Int.* 38 (2012) 3209–3216. doi:10.1016/j.ceramint.2011.12.026.
- [207] M. Zheng, M. Gu, Y. Jin, H. Wang, P. Zu, P. Tao, J. He, Effects of PVP on structure of TiO₂ prepared by the sol-gel process, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* B87 (2001) 197–201.
- [208] T.M. Sebbowa, SURFACE MODIFICATION OF A TITANIUM ALLOY VIA ELECTROSPRAYING FOR BIOMEDICAL ENGINEERING APPLICATIONS A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy By Theresa Mirembe Sebbowa, (2013).

- [209] P.A. Ramires, F. Cosentino, E. Milella, B. Unit, P. Torricelli, G. Giavaresi, R. Giardino, In vitro response of primary rat osteoblasts to titania / hydroxyapatite coatings compared with transformed human osteoblast-like cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 3 (2002) 797–801.
- [210] N. Price, S.P. Bendall, C. Frondoza, R.H. Jinnah, D.S. Hungerford, Human osteoblast-like cells (MG63) proliferate on a bioactive glass surface, *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1997) 394–400. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19971205)37:3<394::AID-JBM10>3.0.CO;2-C.
- [211] S. Mondal, G. Hoang, P. Manivasagan, M. Santha, T. Phuoc, T. Tuong, V. Phan, H. Hyun, M. Hwan, Nano-hydroxyapatite bioactive glass composite scaffold with enhanced mechanical and biological performance for tissue engineering application, *Ceram. Int.* 44 (2018) 15735–15746. doi:10.1016/j.ceramint.2018.05.248.
- [212] A. Ponche, M. Biggerelle, K. Anselme, Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 1: Physico-chemical effects, *J. Eng. Med.* 224 (2010) 1471. doi:10.1243/09544119JEIM900.
- [213] K. Anselme, A. Ponche, M. Biggerelle, Relative influence of surface topography and surface chemistry on cell response to bone implant materials. Part 2: Biological aspects, *J. Eng. Med.* 224 (2010) 1487. doi:10.1243/09544119JEIM901.

