

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**BIOSÍNTESIS DE UN BIONANOCOMPÓSITO DE TITANIO-NÍQUEL
(TiNi) Y DIÓXIDO DE TITANIO (TiO₂) CON PERSPECTIVAS DE
APLICACIÓN EN BIOMATERIALES**

Por

M.C. Luis Raúl Reyes Chávez

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con orientación en
QUÍMICA DE LOS MATERIALES

Julio, 2013

**“BIOSÍNTESIS DE UN BIONANOCOMPÓSITO DE TITANIO-
NÍQUEL (TiNi) Y DIÓXIDO DE TITANIO (TiO₂) CON
PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN EN BIOMATERIALES”**

Aprobación de la tesis:

Dra. Idalia del Consuelo Gómez de la Fuente

Presidente

- Nombre -

Secretario (a)

- Nombre -

1er. Vocal

- Nombre -

2do. Vocal

- Nombre -

3er. Vocal

Dra. Ma. Aracely Hernández Ramírez

Sub-Directora de Estudios de Posgrado

RESUMEN

M.C. Luis Raúl Reyes Chávez

Fecha de Graduación: Julio, 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Biosíntesis de un nanocompósito de Titanio-Níquel (TiNi) y Dióxido de Titanio (TiO₂) con perspectivas de aplicación en biomateriales

Número de páginas: 118

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales

Área de Estudio: **Química de los Materiales**

Propósito y Método del Estudio: El campo de los biomateriales ha ganado gran interés en el mundo de la ciencia desde los años 60. A la fecha existen reportados en literatura diversos tipos de biomateriales ya sea metálicos entre los que se encuentran Fe, Al, Cr, Co, Mg, Mn y Mo, cerámicos como el SiO₂, TiO₂, Al₂O₃, y Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, poliméricos y compósitos. Desafortunadamente los métodos de síntesis para la obtención de biomateriales son caros y necesitan de equipos sofisticados para ello. Sin embargo a la fecha, existe una fuerte área de investigación para síntesis de nanomateriales, más amigable con el medio ambiente, conocido como biosíntesis. En el presente trabajo se utilizó el hongo *Penicillium* sp para la síntesis de un nanocompósito de TiNi y TiO₂ a partir de sales de K₂TiF₆ como fuente de Ti y como fuente de Ni se partió de sales de Ni(NO₃)₂ y NiCl₂. Para validar la ruta enzimática se realizaron estudios adicionales con l-cisteína bajo las mismas condiciones experimentales de biosíntesis. Las muestras se caracterizaron por difracción de Rayos X, microscopía electrónica de barrido de emisión de campo, FTIR, UV-Vis y AFM. Además, las muestras se prepararon en forma de *pellets* sinterizados a dos temperaturas: 250 y 500°C, determinando su microdureza, las cuales fueron sometidas a tratamientos de bioestabilidad en presencia de un suero fisiológico, posteriormente se analizaron por FTIR, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

Contribuciones y Conclusiones: En este trabajo se ha demostrado que el hongo *Penicillium* sp tiene la capacidad de sintetizar extracelularmente un compósito cerámico-metal como es el de TiO₂ –TiNi, obteniendo nanoestructuras de 20 a 200 nm con morfologías poliédricas. Se demostró una histéresis de transformación para las fases martensita-austenita del TiNi del orden de 12°C. Así mismo se determinaron las temperaturas de inicio y terminación para estas fases: M_s = 45.16°C, M_f = 117.55°C y A_s = 46.53°C, A_f = 109.3°C. La ruta enzimática de biosíntesis se validó por medio de estudios adicionales de l-cisteína obteniendo en condiciones similares de experimentación, las fases de TiNi y TiO₂. Los resultados de bioestabilidad indican la generación de hidroxiapatita, encontrándose en mayor proporción sobre la muestra sinterizada a mayor temperatura. La biogeneración de hidroxiapatita del compósito biosintetizado y sinterizado lo potencializan para su uso como biomaterial.

FIRMA DEL ASESOR: _____

Dra. Idalia Gómez

DEDICATORIA

A mi madre la Sra. Ma. Luisa Chávez Domínguez por darme siempre el apoyo, comprensión y cariño durante todo este tiempo.

A la memoria de mi abuela Juanita (1922-2002) por todo lo que nos dimos en casi 22 años.

Te llevo dentro de mí!!

Al MES. Jaime Cesar Triana Contreras por todo su apoyo y la confianza que ha depositado en mí muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Gracias DIOS, por ser mi guía y por brindarme la paciencia, salud y fortaleza para poder terminar con una de mis metas.

A mi madre la Sra. Ma. Luisa Chávez Domínguez por darme siempre el apoyo, comprensión y cariño durante todo este tiempo.

A mi asesora la Dra. Idalia Gómez de la Fuente por su asesoría, paciencia, dedicación que mostró a lo largo de este proyecto, por darme la oportunidad de trabajar con usted, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A la Dra. Ma. Teresa Garza González por todo su apoyo durante la realización de este proyecto, además por darme los conocimientos necesarios y por brindarme todos los consejos para ser un mejor profesionista.

Al Dr. Carlos Guerrero por el apoyo brindado a través de una beca en su proyecto FOMIX-NL 2006-32652 durante tres años, así como a sus sugerencias y comentarios en la revisión de esta tesis.

A la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica por apoyarme en la realización de los ensayos de Microdureza.

Al Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León por su enorme apoyo en la realización del análisis por Microscopía Electrónica de Barrido de Campo y Microscopía de Fuerza Atómica.

A la M.C. Diana Bustos por apoyarme en la realización del análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido

A la Facultad de Ciencias Químicas por darme el apoyo en la realización de dicho proyecto. Y a todos mis maestros por ofrecerme todos sus conocimientos.

A la M.C. Juana María Rodríguez Salas por ser la persona que me ayudó a conocer y amar a la química y además por ser mi modelo a seguir.

Al Laboratorio de Materiales I y II por facilitarme los equipos necesarios para la realización y culminación de esta Tesis.

A mis amigos, gracias por brindarme su amistad, al apoyarme en las buenas y en las malas y por alentarme a conseguir siempre mis sueños.

MUCHAS GRACIAS.....

ÍNDICE

CAPÍTULO	PÁGINAS
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 Biomateriales.....	5
2.2 Ti-Ni.....	7
2.2.1 Transformaciones.....	8
2.2.2 Biocompatibilidad del TiNi.....	20
2.3 TiO ₂	21
2.3.1 Polimorfos.....	22
2.3.2 Biocompatibilidad del TiO ₂	24
2.4 Métodos de Síntesis.....	24
2.4.1. Síntesis en Estado Sólido.....	25
2.4.2 Biosíntesis.....	27
Hipótesis.....	32
Objetivo.....	32
Metas.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 Ubicación.....	33
3.2 Preparación del inoculo.....	34
3.3 Selección de la cepa con capacidad para reducir nitratos.....	34
3.4 Mantenimiento y viabilidad del microorganismo.....	35
3.5 Obtención de la biomasa.....	35
3.5.1 Propagación del hongo <i>Penicillium</i> sp.....	35
3.5.2 Producción de la biomasa.....	36
3.6 Preparación de las disoluciones.....	36
3.7 Producción de las nanoestructuras de TiO ₂ y TiNi.....	36
3.8 Caracterización.....	37
3.8.1 Análisis de Espectros de Infrarrojo.....	37
3.8.2 Análisis de Espectros de Ultravioleta Visible.....	37
3.8.3 Análisis de Difracción de Rayos X.....	38
3.8.4 Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido.....	38
3.8.5 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo.....	38
3.8.6 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica.....	39
3.8.7 Formación de las probetas sinterizadas.....	39
3.8.8 Procedimiento para los ensayos de Microdureza.....	40
3.8.9 Determinación del Análisis de Bioestabilidad.....	40
3.8.10 Manejo y Disposición de Residuos.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
4.1 Selección de la cepa a utilizar.....	42

4.2	Mantenimiento y Viabilidad del microorganismo.....	44
4.3	Biosíntesis del nanocompósito de TiO ₂ y TiNi.....	44
4.3.1	Análisis por Espectroscopia Infrarroja.....	44
4.3.2	Espectroscopia de UV-visible.....	47
4.3.3	Difracción de Rayos X.....	50
4.3.4	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	57
4.3.5	Microscopía de Barrido por Emisión de Campo.....	61
4.3.6	Microscopía de Fuerza Atómica.....	64
4.3.7	Microdureza.....	65
4.3.8	Análisis de Bioestabilidad.....	66
5.	CONCLUSIONES.....	77
6.	RECOMENDACIONES.....	79
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	80
	APENDICES.....	104
	APÉNDICE A.....	104
	APÉNDICE B.....	115

LISTA DE TABLAS

TABLA	PÁGINA
Tabla 1 Composición del medio de cultivo para la selección de la cepa...	34
Tabla 2 Composición del medio de Cultivo MGYP modificado.....	35
Tabla 3 Composición del Suero Fisiológico.....	41
Tabla 4 Diseño experimental para selección del microorganismo.....	42
Tabla 5 Absorciones características de los grupos funcionales presentes en la pared celular del microorganismo.....	45
Tabla 6 Intensidades y planos asociados a las reflexiones de las fases presentes en el nanocompósito obtenido mediante el proceso de biosíntesis analizadas por Difracción de Rayos.....	51
Tabla 7 Clasificación Taxonómica.....	116

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1	Transformación e histéresis martensítica.....	9
Figura 2	La transformación de la fase austenita-martensita y el efecto de memoria de forma.....	12
Figura 3	Diagrama de fases en el equilibrio para el sistema binario TiNi.....	13
Figura 4	Representación estructural de la fase austenítica (B2) en el sistema TiNi.....	15
Figura 5	Estructura de la fase R.....	16
Figura 6	Esquema de la estructura de la martensita B19' en la aleación TiNi...	18
Figura 7	Esquemas de la estructura de la fase austenítica (a), y las fases martensíticas (b) ortorrómbica (B19) y (c) monoclinica (B19') en el sistema Ni-Ti. También se encuentran representados los procesos de formación de <i>twinning</i> en ambas fases martensíticas.....	20
Figura 8	Fases cristalinas del TiO ₂ a) Brookita, b) Anatasa y c) Rutilo.....	22
Figura 9	Espectros de infrarrojo para la biomasa de <i>Penicillium</i> sp a) antes, b) y c) después del proceso de biosíntesis.....	46
Figura 10	Espectros UV-vis del seguimiento de la producción de nanopartículas obtenidas extracelularmente por el hongo <i>Penicillium</i> sp. En presencia de a) K ₂ TiF ₆ y Ni(NO ₃) ₂ 2.54 x 10 ⁻⁴ M, b) K ₂ TiF ₆ y NiCl ₂ ·6H ₂ O 2.54 x 10 ⁻⁴ M.....	49
Figura 11	Espectro de difracción para el nanocompósito obtenido a partir de las sales de K ₂ TiF ₆ y Ni(NO ₃) ₂ sintetizados por <i>Penicillium</i> sp., y cuyas reflexiones corresponden a TiNi martensita (JCPDS 35-1281), TiNi austenita (JCPDS 19850), TiO ₂ rutilo (JCPDS 211276), TiO ₂ anatasa (JCPDS 211272) además de las fases NiO (JCPDS 4-835) y Ni (JCPDS 4-850).....	50
Figura 12	Espectro de difracción para el nanocompósito obtenido a partir de las sales de K ₂ TiF ₆ y NiCl ₂ sintetizados por <i>Penicillium</i> sp y cuyas reflexiones corresponden a TiNi martensita (JCPDS 35-1281), TiNi austenita (JCPDS 19850), TiO ₂ rutilo (JCPDS 211276), TiO ₂ anatasa (JCPDS 211272) además del TiNi fase R (JCPDS 41-1379).....	52
Figura 13	Posible mecanismo de la reducción del metal y la formación de TiNi.	55
Figura 14	Espectro de difracción de Rayos X obtenido a partir de las sales K ₂ TiF ₆ y NiCl ₂ sintetizados por la L-cisteína.....	57
Figura 15	Imagen de FESEM para el nanocompósito obtenido por la enzima L-cisteína después de someterlo a tratamiento térmico.....	58
Figura 16	Curvas de DSC de las muestras sintetizadas en el proceso de calentamiento y enfriamiento.....	60
Figura 17	Imágenes de FESEM para la biosíntesis (a) y el nanocompósito obtenido después de someterlo a tratamientos térmicos de 250°C (b) y 500°C (c).....	61
Figura 18	Micrografía FESEM (a) del compuesto de TiNi/TiO ₂ b) Análisis EDS del nanocompósito obtenido por el hongo <i>Penicillium</i> sp.....	62
Figura 19	Micrografía FESEM del compuesto obtenido por la L-cysteina.	63

Figura 20	Micrografía de Fuerza Atómica para la muestra biosintetizada.....	64
Figura 21	Gráficas de microdureza Vickers para el material obtenido por biosíntesis tratadas térmicamente a 250°C y 500°C, también se muestran microdurezas para TiNi [88] y TiO ₂ [145] sinterizados....	66
Figura 22	Espectros de FTIR para muestras del compósito sinterizado a 250°C (SFA 250) y 500°C (SFA 500) después del contacto con el suero fisiológico, TiO ₂ e hidroxiapatita.....	67
Figura 23	Espectro de difracción de Rayos X para el nanocompósito en presencia del suero fisiológico. TiO ₂ (JCPDS 21-1272 y JCPDS 21-1276), TiNi (JCPDS 035-1281), hidroxiapatita (JCPDS 001-1008).	70
Figura 24	Micrografía de FESEM para la muestra SFA 500, nanocompósito calcinado a 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.....	71
Figura 25	EDS para la muestra SFA500, nanocompósito calcinado a 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.....	72
Figura 26	Imágenes de la distribución de los metales Ti y Ni para la muestra SFA 500, nanocompósito sinterizado a 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.....	73
Figura 27	Espectro de difracción de Rayos X para el nanocompósito en presencia del suero fisiológico. TiO ₂ (JCPDS 21-1272 y JCPDS 21-1276), TiNi (JCPDS 035-1281), hidroxiapatita (JCPDS 001-1008).	74
Figura 28	Micrografía de SEM para una muestra tipo SFA250 después de estar en contacto con el suero fisiológico.....	75
Figura 29	EDS para una muestra tipo SFA 250 después de estar en contacto con el suero fisiológico.....	75
Figura 30	Imágenes de la distribución de los metales Ti y Ni para la muestra SFA 250, nanocompósito sinterizado a 250°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.....	76
Figura 31	Estructura Cristalina de un Sólido.....	106
Figura 32	Equipo de MFA.....	109
Figura 33	Modo de Contacto del Cantilever.....	110
Figura 34	Modo de Altura Constante.....	111
Figura 35	Modo sin Contacto.....	112
Figura 36	Modo Dinámico del Cantilever.....	112
Figura 37	Observación Macroscópica del hongo <i>Penicillium</i> sp.....	117
Figura 38	Observación Microscópica del hongo <i>Penicillium</i> sp.....	118

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El campo de los biomateriales ha ganado gran interés en el mundo de la ciencia desde el primer congreso llevado a cabo en la Universidad de Clemson en el Sur de California en 1969 [1-3] A la fecha existen reportados en literatura diversos tipos de biomateriales entre los que se encuentran metales como el Fe, Al, Cr, Co, Mg, Mn y Mo, cerámicos como el SiO₂, TiO₂, Al₂O₃, y Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, poliméricos y compósitos [2-5].

Los biomateriales, artificiales o naturales, utilizados para el desarrollo de implantes con la finalidad de reemplazar estructuras biológicas que han sido dañadas o perdidas, mejoran la calidad y esperanza de vida. Según los demógrafos de Naciones Unidas dentro de 5 años es muy probable que existan más personas mayores de 60 años que niños menores de 15 años. Hoy en día 1 de cada 10 personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco, y así mismo el número de personas que tienen más de 80 años se multiplicará por cinco. Por lo tanto, el campo de los biomateriales ha mostrado un rápido crecimiento con la finalidad de satisfacer las demandas de una población cada vez de mayor edad.

Los biomateriales deben cumplir con las condiciones de ser biocompatibles, esto es que no generen un rechazo e incluso de inhibir la respuesta inflamatoria del organismo, ser resistentes a la corrosión debido a los fluidos corporales y además, tener una función biológica o mecánica específica [2-3, 5].

Para la aplicación de los biomateriales como implantes se requiere hacer estudios de la composición tanto del material a implantar como de las partículas liberadas como consecuencia de su desgaste, así como de los productos de degradación que pueden generar, para evaluar la tolerancia o la toxicidad del implante en el organismo [2, 3, 6, 8].

Según su composición química los biomateriales se clasifican en materiales metálicos, poliméricos, cerámicos y materiales compuestos o compósitos [2-5, 9].

Los biomateriales poliméricos son ampliamente utilizados en medicina y deben su éxito a las excelentes propiedades que presentan tales como baja densidad, baja resistencia a la tensión y alto grado de elongación, además ofrecen la posibilidad de fabricarlos mediante diferentes rutas, con características definidas y con la facilidad de moldearlos como fibras, tejidos o películas [2-4]. Estos pueden ser naturales o sintéticos y en cualquier caso, se pueden encontrar formulaciones bioestables, para sustituir parcial o totalmente tejidos u órganos lesionados o destruidos de forma permanente y formulaciones biodegradables que cumplan una función de manera temporal mientras el problema persista, y después se deseche sin provocar toxicidad al organismo. [2-3].

De los biomateriales metálicos, cabría señalar que el número de elementos que se utilizan en la fabricación de implantes es muy limitado, si tomamos en cuenta que más de tres cuartas partes del sistema periódico lo son. El primer requisito para su utilización es que éstos sean tolerados por el organismo, para que no exista un rechazo inmediatamente después de que se coloque el implante. Otro requisito imprescindible es que presenten resistencia a la corrosión, debido a que se encontrarán inmersos en un medio hostil como lo es el organismo humano y a temperaturas del orden de 37°C. Algunos metales no presentan este problema, como los metales preciosos, otros se pasivan al formar una capa de óxido en su superficie, protegiendo el interior del metal y evitando así un avance en la corrosión, como ocurre con el titanio y sus aleaciones [7].

De los biomateriales cerámicos en primera instancia podría pensarse que su principal ventaja es su baja reactividad química, por su carácter inerte, que conlleva una clara biocompatibilidad. Pero no todas las biocerámicas son inertes y de hecho, muchos materiales cerámicos que se utilizan en cirugía reconstructiva son bioactivos. Los biocerámicos se introducen en la década de los 70's en la que comenzaban a observarse que los biomateriales utilizados hasta ese momento, como el acero, aleaciones de cobalto y polimetil metacrilato no funcionaban de manera adecuada debido, entre otras razones, a la encapsulación de estos materiales, lo que hizo dirigir la mirada hacia las cerámicas, en un intento de buscar una buena osteointegración.

Sin embargo, la fragilidad de las biocerámicas restringió, en gran medida, su campo de aplicación, usándolos sólo cuando no se necesitaran elevadas prestaciones mecánicas, a excepción de la alúmina y la zirconia, que hasta el día de hoy se siguen empleando en articulaciones de cadera [2-3, 6, 7].

Existen otras biocerámicas tales como las hidroxiapatitas, las cuales presentan gran biocompatibilidad con el hueso humano [2, 4, 7, 8], pero una vez más su resistencia mecánica aún es insuficiente [2, 4, 8-12].

En esta dirección podría pensarse en reforzar los biocerámicos ya conocidos, por ejemplo, sintetizando biocompósitos que mejoren los aspectos mecánicos de los cerámicos y profundizar en el estudio del mecanismo de formación del hueso natural para buscar las condiciones de síntesis que permitan obtener en el laboratorio biomateriales compuestos con propiedades mecánicas aceptables. El objetivo final de la comunidad científica que trabaja en este campo es fabricar hueso artificial equivalente al hueso natural [2, 3, 5, 6].

Por lo que en esta tesis se propone la síntesis del compuesto cerámico-metal $\text{TiO}_2\text{-TiNi}$, con características químicas, mecánicas y nanoestructurales con la finalidad de desarrollar un nuevo biomaterial, sintetizado además por una ruta amigable con el medio ambiente como es la biosíntesis.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Biomateriales

La ciencia de los Biomateriales examina las propiedades físicas, químicas, mecánicas y biológicas del material. Así, la ciencia de los Biomateriales ha sido definida oficialmente como el estudio de los materiales y su interacción con el medio biológico. Un biomaterial se define como aquel material destinado a la interacción con los sistemas biológicos para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo [18-20].

El descubrimiento e invención de los biomateriales está notablemente relacionado con el desarrollo de la cirugía moderna [18-19]. Entre los materiales usados actualmente como implantes ortopédicos se incluyen al acero inoxidable 316 [21], aleaciones de cobalto [22] y cromo así como al Ti y sus aleaciones [23]. Sin embargo, elementos tales como el Ni, Cr y Co se han reportado como subproductos de aceros inoxidables y de aleaciones de Co-Cr debido a la corrosión por los fluidos corporales. Los efectos tóxicos de estos metales disminuyen la biocompatibilidad de este tipo de implantes [24]. Así mismo se ha reportado efectos de dermatitis debido a la toxicidad del Ni en presencia de Co [24], esto en estudios de seres vivos.

Además, tanto el acero inoxidable como las aleaciones de Co-Cr poseen un módulo elástico mucho mayor que el hueso, provocando una deficiente transferencia de esfuerzo del hueso llevando a una reabsorción de esta energía al mismo, perdiendo así el implante después de algunos años de implantación. El alto ciclo de fatiga lleva a la falla de implantes de cadera después de varios años [23-26].

A principios de la década de los 60's Sir J. Charnley realizó el primer intento para unir una prótesis de cadera de acero inoxidable y polietileno de alta densidad con cemento óseo metacrilato [26]. Esto puede considerarse como el inicio de la ortopedia moderna, en la que el desarrollo de mejores materiales juega un papel importante.

A finales de esa misma década se descubrieron los excelentes atributos del Ti en la medicina. A partir de ese momento, algunos de los materiales comenzaron a ser clasificados como biomateriales [29]. Diversos materiales como metales, polímeros, cerámicos y compósitos se han desarrollado desde entonces [29-30].

Hoy en día existe un gran número de científicos de distintas áreas que se interesan y se preocupan de los problemas relacionados con los biomateriales [30]. Existiendo diversas organizaciones internacionales que dan recomendaciones y normas para la fabricación y prueba de los biomateriales como la *ISO* (Organización Internacional de Normalización), la *ASTM* (Sociedad de Pruebas y Materiales), entre otras, que supervisan la aplicación de éstos en el uso humano [31].

Uno de los factores más importantes en los materiales a utilizar dentro del cuerpo humano es la biocompatibilidad, que se define como la capacidad de un material para llevar a cabo una adecuada respuesta a una aplicación específica [32].

Existen dos factores fundamentales que determinan la biocompatibilidad de un material, como son las reacciones inducidas y la degradación del material en el cuerpo. Al ser evaluada la biocompatibilidad se encuentra que los materiales base Ti, son fuertes candidatos para ser utilizados como implantes ortopédicos debido a la combinación de características tales como alta resistencia mecánica, baja densidad, alta inmunidad a la corrosión, completa inercia química en medio ambiente humano, bajo módulo elástico, biocompatibilidad y además alta capacidad para unirse al hueso y tejidos humanos [32].

1.2Ti-Ni

El TiNi o nitinol, como se nombra en la literatura científica al compuesto equimolar de Ti-Ni, ha sido una de las aleaciones de mayor importancia en los últimos años debido a sus características de memoria de forma, así como de su inercia química, pudiendo ser utilizado en el desarrollo de biomateriales [33].

En los años 60's Buehler *et al* descubrieron el efecto de memoria de forma en una aleación de Titanio y Níquel (TiNi) [33-34]. Desde entonces las investigaciones metalúrgicas se han intensificado para explorar el mecanismo de sus componentes fundamentales [34].

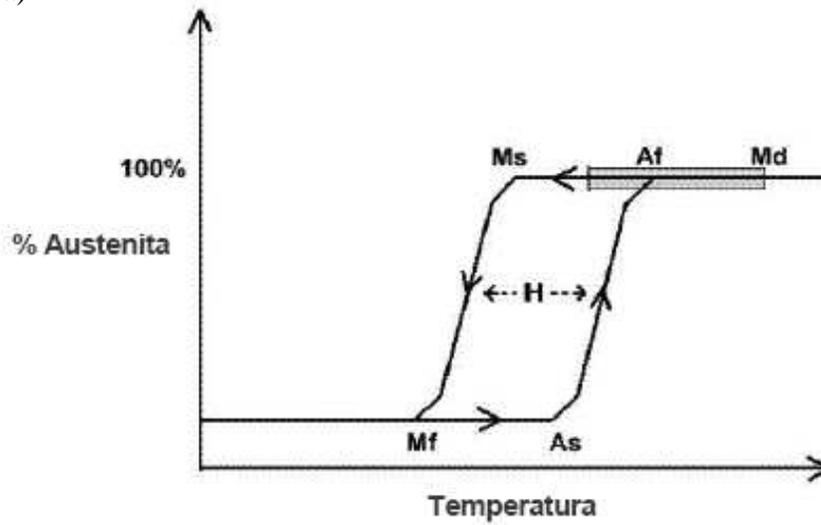
El efecto de memoria de forma se basa principalmente en la temperatura, pues en función de ésta ocurre una transformación a escala atómica de las fases austenita a martensita. El TiNi también muestra excelentes propiedades pseudoelásticas y biocompatibles [35].

Estas propiedades únicas hacen que el TiNi sea un material interesante para aplicaciones médicas, debido a sus propiedades de memoria de forma, por lo que provee la posibilidad de preparar implantes funcionales que son activos a la temperatura del cuerpo humano [36].

2.2.1 Transformaciones del TiNi

El rango de temperatura para la transformación martensita-austenita, es decir la transición de suave a duro que toma lugar sobre el calentamiento es más alto para la transformación en el enfriamiento (ver Figura 1). La diferencia entre las temperaturas de transición se llama histéresis. La histéresis es generalmente definida como la diferencia entre las temperaturas en la cual el material es transformado en un 50% a austenita en el calentamiento y transformado en un 50% a martensita en el enfriamiento. Esta diferencia puede ser hasta de 20-30°C [37-38]. En la práctica, esto significa que una aleación diseñada puede transformarse totalmente por la temperatura del cuerpo, sobre el calentamiento ($A_f < 37^\circ\text{C}$) y requiere de un enfriamiento de 5°C para retransformarse a martensita (M_f) [39].

a)



b)

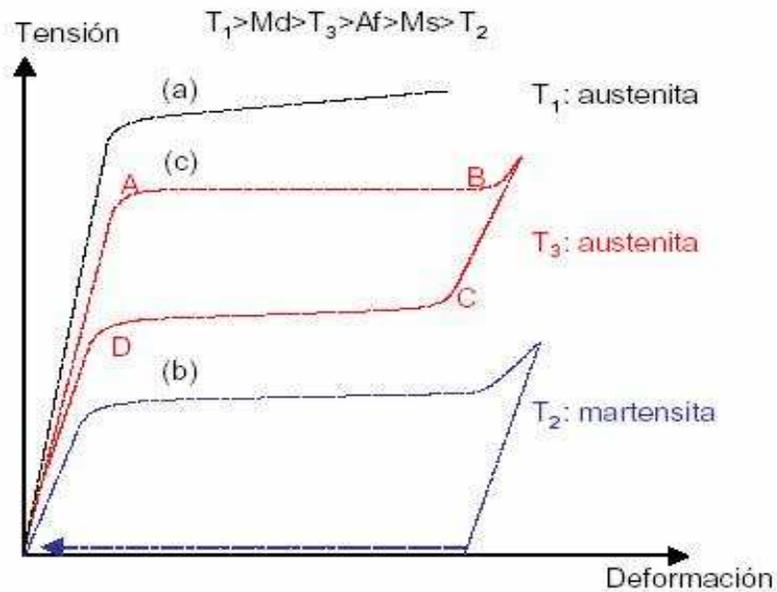


Figura 1. a) Transformación e histéresis martensítica (H) sobre un cambio de temperatura. A_s = comienzo de la austenita, A_f = Fin de la austenita, M_s = comienzo de la martensita, M_f = Fin de la martensita, **b)** Comportamiento de la tensión-deformación de diversas fases de TiNi a temperatura constante. [47]

El comportamiento único del TiNi se basa en la transformación de fase austenita-martensita en escala atómica, que también es llamada transformación martensítica termoelástica.

La transformación martensítica termoelástica provoca la recuperación de forma, que es el resultado de la necesidad que tiene la estructura de celda cristalina de acomodar al mínimo la energía para una temperatura dada [40]. En el TiNi las simetrías relativas entre las dos fases llevan a una transformación altamente necesaria, donde las dislocaciones de átomos individuales se pueden predecir exactamente y eventualmente conlleva a un cambio de forma en escala macroscópica.

La estructura cristalina de la martensita es relativamente menos simétrica comparada a la fase de origen. Si un solo cristal de la fase de origen es enfriado debajo de M_f entonces las variantes de la martensita crean un total de 24 planos cristalográficos equivalentes.

Sin embargo, existe sólo una orientación posible de la fase original (austenita) y todas las configuraciones martensíticas se revierten a una estructura y forma simple sobre el calentamiento por encima de A_f .

El mecanismo por el cual las variantes de la martensita se deforman se conoce como entrecruzado y este se puede describir como un desplazamiento simétrico de átomos a través de un plano atómico particular, el plano entrecruzado [41].

Aunque la mayoría de los metales se deforman por deslizamiento o dislocación, el TiNi responde al estrés simplemente cambiando la orientación de su estructura cristalina a través del movimiento.

Una muestra de TiNi se deforma hasta que produce una variante con tensión máxima. Sin embargo, la deformación más allá de esto se traducirá en la clásica deformación plástica por deslizamiento, que es irrecuperable y por lo tanto no tiene efecto de memoria de forma.

Si la deformación se detiene a mitad del camino, la muestra contendrá diferentes variantes. Si esta muestra se calienta por encima de A_f una fase original con una orientación idéntica a la existente antes de la deformación puede crearse por las variantes de acuerdo con la red correspondiente entre la fase original y cada variante (ver Figura 2). La estructura cristalina de la austenita es una estructura cúbica simple, mientras que la martensita tiene una estructura romboédrica más compleja.

Este fenómeno provoca en el espécimen una inversión completa de la forma que tenía antes de la deformación [41-42]. El fenómeno anterior es la base de las propiedades especiales como la memoria de forma y la superelasticidad.

El efecto de memoria de forma se refiere entonces, al proceso en el cual una aleación es deformada a bajas temperaturas y posteriormente se calienta, volviendo a su forma original [42].

Durante este proceso, el metal se somete a un complejo cambio cristalino llamado transformación martensita-austenita (ver Figura 2).

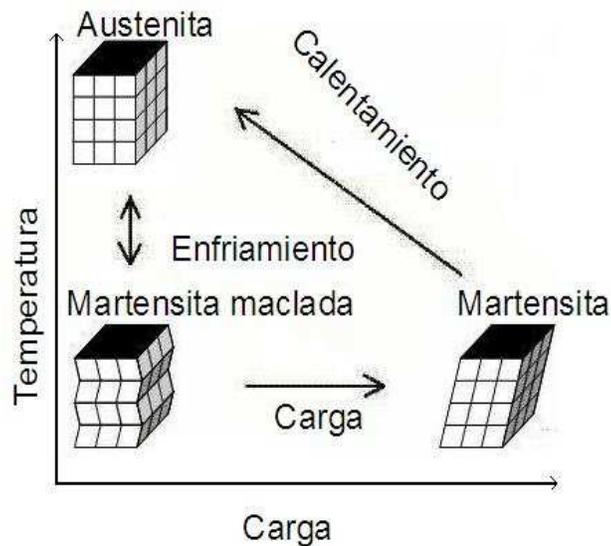


Figura 2. La transformación de la fase austenita-martensita y el efecto de memoria de forma. La alta temperatura de la estructura austenítica, donde existe un entrecruzamiento cuando la temperatura es baja. Esta estructura entrecruzada es llamada martensita. La estructura martensítica es fácilmente deformada por una tensión externa en una forma particular y la estructura cristalina se somete a un registro paralelo. Cuando es calentada la martensita reasume su forma austenítica y se considera el fenómeno macroscópico de la memoria de forma.

El enfriamiento del metal promueve la entrada de la estructura cristalina dentro de la fase de baja temperatura (martensita), donde el metal es suave y fácilmente deformable.

La temperatura a la que este fenómeno se inicia es la temperatura de inicio de la martensita (M_s) y la temperatura a la que se completa el proceso es la temperatura del final de la martensita (M_f). Cuando el metal se vuelve a calentar éste restaura su forma y rigidez original (austenita). El rango de temperatura necesario para este proceso es más alto. La temperatura de partida de este proceso se llama temperatura de comienzo de la austenita (A_s) y la temperatura a la cual está completo es llamada temperatura final de la austenita (A_f).

La estructura cristalina de la aleación titanio-níquel cambia gradualmente en una forma no lineal, durante el periodo de transición [43]. El rango de temperatura de esta transición puede modificarse por el contenido metálico, el enfriamiento y el recocido de esta aleación [44]. Mediante estos procedimientos se pueden preparar una variedad de implantes para diferentes propósitos en la medicina.

Ahora bien, dadas las excelentes propiedades que las aleaciones de TiNi han presentado desde el comienzo del estudio de los materiales con memoria de forma, se han realizado muchos esfuerzos para establecer el diagrama de fases de equilibrio de este sistema [45-46]. En la Figura 3 se muestra uno de estos trabajos realizados para todo el rango de composiciones de la aleación binaria TiNi [47]. Por debajo de los 650°C no se tiene un conocimiento claro del diagrama de equilibrio, aunque se acepta de manera general que la zona de estabilidad de la fase matriz es sumamente estrecha (entre 50.0 % Ti y 50.0% de Ni).

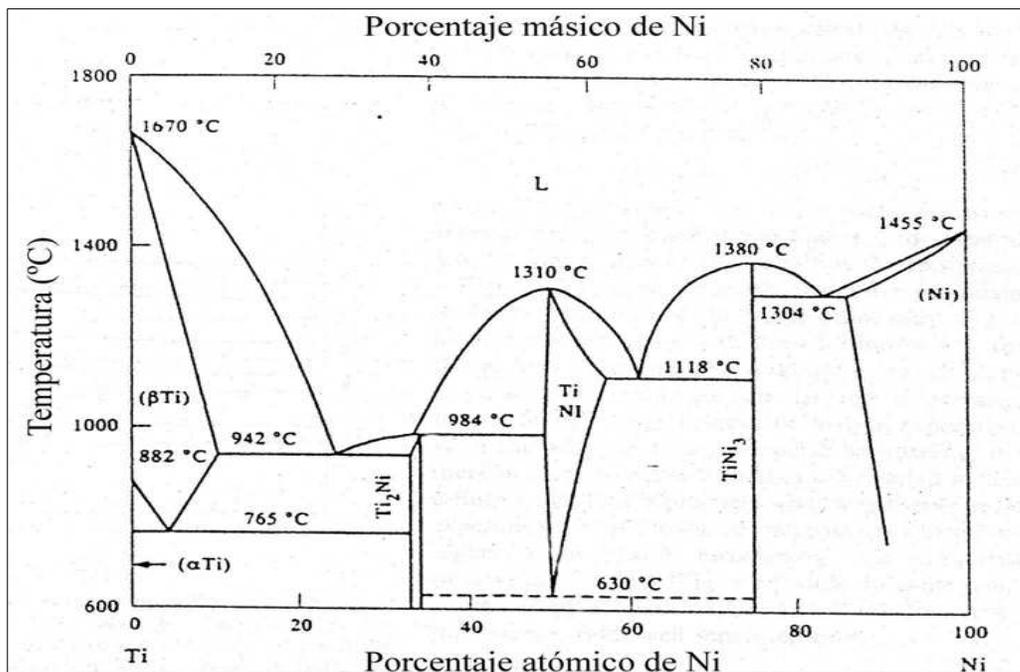


Figura 3. Diagrama de fases en el equilibrio para el sistema binario TiNi [47].

Con la observación del diagrama de fases en equilibrio se pueden conocer datos como el punto de fusión del TiNi equimolar o que el compuesto Ti_2Ni se puede formar por una reacción peritética y el $TiNi_3$ por una reacción eutéctica. También es fácil distinguir las fases de equilibrio que acompañarán al TiNi (la única que sufre la transformación martensítica) cuando las composiciones sean ricas en Ni o en Ti pero no muy lejanas de la aleación equimolar. Sin embargo, el diagrama no resulta suficiente para explicar de una manera detallada la secuencia de la aparición de estas fases adicionales en la matriz cuando se enfría lentamente desde una temperatura alta.

Se han efectuado numerosos estudios sobre esta cuestión, investigando las fases que aparecen en función de la temperatura y el tiempo de envejecimiento para diversas aleaciones con diferentes composiciones [44, 48-50].

La transformación martensítica, es una transformación de estado sólido entre dos fases cristalinas. Estas fases han sido objeto de un estudio extensivo desde un punto de vista cristalográfico. En el caso de la aleación binaria TiNi y, en general, las aleaciones de la familia Ni-Ti, podemos distinguir la fase austenita (B2) y varios tipos de martensita, entre las que podemos destacar la que se conoce como fase R, una fase monoclinica (B19') y una ortorrómbica (B19).

La austenita, en las aleaciones del sistema TiNi, corresponde a la fase que aparece en el diagrama de fases (Figura 3) en composiciones cercanas a la equimolar. Es una estructura cúbica simple ordenada de tipo B2 (comúnmente llamada CsCl, con posiciones de los átomos en 000 y $1/2, 1/2, 1/2$) y grupo espacial es Pm3m (Figura 4).

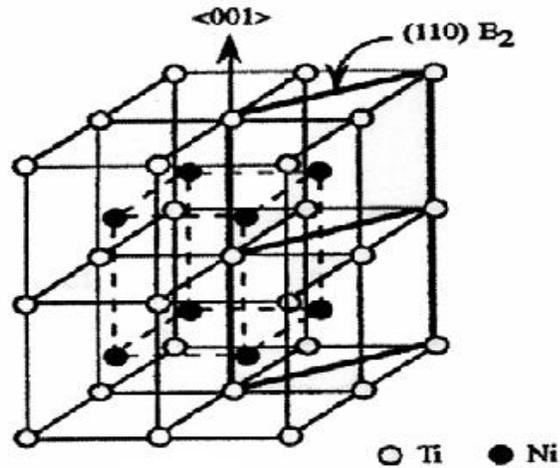


Figura 4. Representación estructural de la fase austenítica (B2) en el sistema TiNi

Los parámetros de red que podemos encontrar en la literatura pueden variar significativamente, especialmente a causa de los elementos adicionales a la aleación binaria y la cantidad de los mismos. Sin embargo, incluso para la aleación binaria, se pueden encontrar valores dispares, generalmente comprendidos entre 2.9 y 3.1 Å.

La fase R, es una estructura martensítica correspondiente a una distorsión ortorrómbica de la malla cúbica (B2) en la dirección $\langle 111 \rangle$ (ver Figura 5), aunque es más común utilizar para su descripción una red de tipo hexagonal.

Su grupo espacial es P31m (nº 162) y un ejemplo de los parámetros de red hallados para el TiNi son:

$$a = 7.38 \text{ \AA} \quad c = 5.32 \text{ \AA} \quad c/a = 0.7211$$

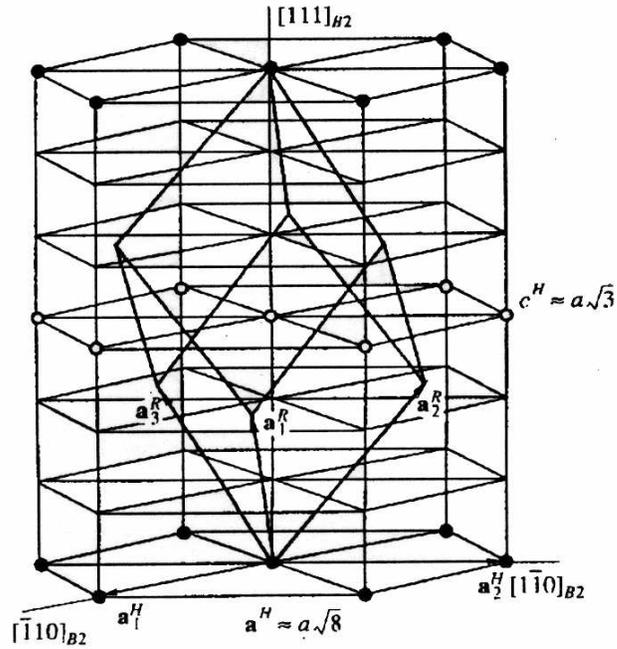


Figura 5. Estructura de la fase R

Esta fase martensítica, a veces también llamada premartensítica para describir una transformación que tiene lugar a una temperatura más alta que la martensita final (M), forma grupos autoacomodados que pueden tener hasta 4 posibles variantes.

La relación de orientación con la austenita es:

$$(111)_{B2} \parallel (0001)_R \quad \langle 211 \rangle_{B2} \parallel \langle 2110 \rangle_R.$$

La entalpía de la transformación $B2 \rightarrow R$ es pequeña (inferior a los 6 J/g) en comparación con las transformaciones $B2 \rightarrow M$ o $R \rightarrow M$, por ejemplo, del mismo Ni-Ti.

Así mismo, también es característica de esta transformación la presencia de una histéresis pequeña (5-6°C), debido a que en realidad es una pequeña deformación microscópica de la austenita, mientras que la transformación $B2 \rightarrow M$ o $R \rightarrow M$ implica un cambio estructural de la red sensiblemente mayor. La transformación es perfectamente reversible y muy estable bajo el ciclado térmico [51].

En el microscopio electrónico de transmisión es posible distinguirla, mediante difracción de electrones, por la presencia de unos puntos extras situados a $1/3$ y $2/3$ de las posiciones $\langle 110 \rangle$ de la red recíproca de la austenita [52], mientras que en difracción de rayos X se distingue fácilmente por el desdoblamiento de la reflexión $\{011\}$ de la austenita [53].

Es posible encontrar esta fase en sistemas ternarios como Ti-Ni-Fe, Ti-Ni-Co y Ti-Ni-Al, pero también se produce en el sistema binario Ni-Ti cuando se presentan ciertas condiciones. Así, en una aleación $Ni_{50}Ti_{50}$ homogeneizada (es decir, que ha sido sometida a un tratamiento térmico suficientemente prolongado en la zona donde B2 es estable), la fase R no aparece, aunque sí que lo hace espontáneamente después de varios ciclos térmicos.

También las aleaciones ricas en níquel parecen favorecer la formación de la fase R mediante una transformación directa $B2 \rightarrow R \rightarrow M$ y una inversa $M \rightarrow B2$, mayormente gracias a la presencia de precipitados de Ti_3Ni_4 que introducen los campos de deformación favorables [54]. La fase R en este caso se produce por nucleación, preferentemente en zonas con esfuerzos internos grandes, y posterior crecimiento.

Para la secuencia de transformación $B2 \rightarrow R \rightarrow M$, se ha llegado a postular la hipótesis de una transformación inconmensurable de segundo orden que precede a la aparición de la fase R, puesto en evidencia por medidas de resistividad eléctrica y difracción de electrones (observación de puntos de subestructuras difusas cercanas a las posiciones $1/3 \langle 110 \rangle_{B2}$), aunque esta posibilidad no ha sido completamente confirmada [55].

La indexación de la martensita ($B19'$) no es trivial ya que las estructuras obtenidas divergen esencialmente en los valores de los parámetros de red y en los valores de las posiciones atómicas (Figura 6).

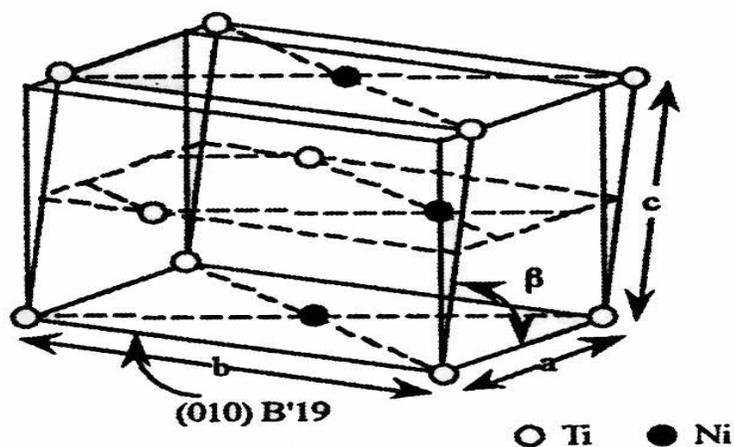


Figura 6. Esquema de la estructura de la martensita $B19'$ en la aleación TiNi.

Entre la martensita monoclinica $B19'$ y la fase matriz existen 12 correspondencias de red, lo que nos ofrece hasta doce posibles variantes en el proceso de autoacomodo de la martensita [56].

Las relaciones de orientación entre la austenita y la martensita son:

$$(100)_{B2} \parallel (011)_{B19'} \quad (110)_{B2} \parallel (010)_{B19'} \quad \langle 001 \rangle_{B2} \parallel \langle 100 \rangle_{B19'}$$

mientras que entre la fase R y la martensita B19' son:

$$(010)_R \parallel (010)_{B19}, \quad (111)_R \parallel (011)_{B19'} \quad \langle 101 \rangle_R \parallel \langle 100 \rangle_{B19'}$$

Otra de las fases es la B19, dicha fase martensítica aparece en sistemas ternarios, como el Ni-Ti-Cu, cuando se sustituye el níquel por el cobre en cantidades de aproximadamente el 10 % atómico o mayores. En muchas ocasiones se considera como una fase premartensítica, en el sentido que precede a la B19', aunque si el contenido de cobre es suficientemente elevado esta última puede no llegar a detectarse.

La martensita B19 es ortorrómbica y sus parámetros dependen muy ligeramente de la cantidad de cobre que contiene la aleación, así se pueden obtener desde $a = 2.89 \text{ \AA}$, $b = 4.5 \text{ \AA}$, $c = 4.26 \text{ \AA}$ para un 15 % atómico de cobre hasta $a = 2.87 \text{ \AA}$, $b = 4.53 \text{ \AA}$, $c = 4.26 \text{ \AA}$ con el 25 % atómico [57], lo que muestra la estabilidad de los parámetros de red con la cantidad de cobre.

Las relaciones de orientación entre la austenita y la martensita son las siguientes:

$$(001)_{B2} \parallel (100)_{B19} \quad (110)_{B2} \parallel (010)_{B19} \quad (110)_{B2} \parallel (001)_{B19}$$

por lo que se pueden establecer seis correspondencias equivalentes de la red entre la austenita y la martensita y por tanto seis variantes diferentes [58].

Estas relaciones pueden verse fácilmente en la Figura 7 donde se muestra la estructura de esta fase. En esta figura también es posible apreciar el proceso de formación de maclas en las fases B19 y B19', teniendo siempre de referencia la celda original de austenita.

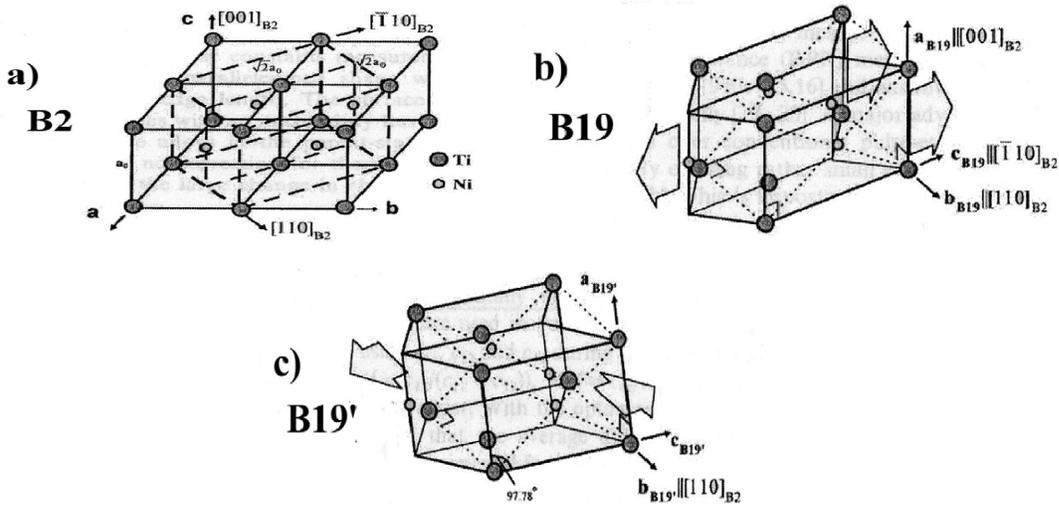


Figura 7. Esquemas de la estructura de la fase austenítica (a), y las fases martensíticas (b) ortorrómbica (B19) y (c) monoclinica (B19') en el sistema Ni-Ti. También se encuentran representados los procesos de formación de *twinning* en ambas fases martensíticas.

2.2.2 Biocompatibilidad del TiNi

Existen dos factores principales que determinan la biocompatibilidad del material las cuales son:

4.1 Las reacciones inducidas por el material.

5.1 La degradación del material en el cuerpo.

Esto es debido a la posibilidad de que los iones Níquel (Ni) y Titanio (Ti) puedan disolverse de la aleación debido a la corrosión, este es un importante efecto que debe ser entendido para estos componentes.

En literatura se encuentra que el titanio puro es bien tolerado por los tejidos del cuerpo humano [59]. Encontrándose reportes que indican que la buena respuesta célula - TiNi es debida a que en presencia de fluidos biológicos esta aleación se pasiva, es decir, forma espontáneamente una capa delgada de óxido de titanio (TiO_2) estabilizándolo y proporcionándole gran resistencia a la corrosión y una elevada biocompatibilidad de los implantes de TiNi [53]. Cuando la aleación de TiNi es implantada, esta biocapa activa de TiO_2 facilita la osteointegración del implante mediante una serie de reacciones superficiales con el medio, en estas reacciones se produce entre otras, la formación de una capa de hidroxiapatita amorfa, que termina cristalizando y favoreciendo la reacción del tejido con el material [59].

Ahora bien, además del TiNi, el TiO_2 es otro de los compuestos de gran interés en el área de la medicina debido a sus grandes características de biocompatibilidad por lo cual se ha propuesto como un potencial candidato para la elaboración de implantes en la medicina. A continuación se describen algunas de las características que lo hacen un excelente candidato.

2.3 TiO_2

El dióxido de titanio (TiO_2) es un material que ha sido extensamente estudiado debido a sus excepcionales propiedades fisicoquímicas que le permiten ser un material apto para una gran variedad de aplicaciones tecnológicas [60-61].

La interacción del TiO_2 con el medio biológico ha sido siempre explicada a partir de los estudios realizados en las prótesis de Ti metálico.

Considerando la superficie de éste compuesta por TiO_2 ya sea por oxidación directa al exponer la superficie metálica al ambiente, o bien mediante la pasivación de la misma de forma controlada. [62].

2.3.1 Polimorfos del TiO_2

Este óxido, también alotrópico, se encuentra de forma natural en tres fases cristalinas: Brookita, Anatasa y Rutilo (ver Figura 8) [60-63].

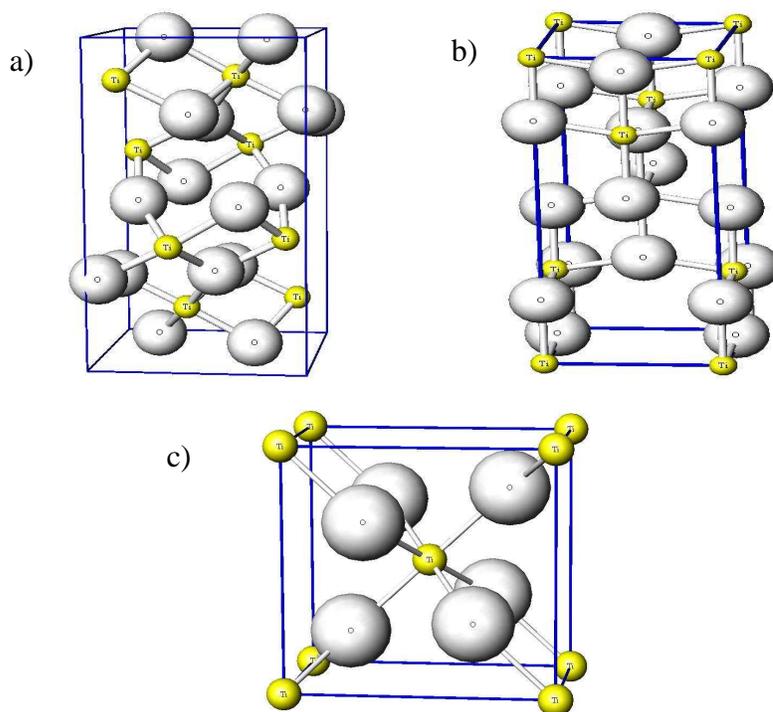


Figura 8. Fases cristalinas del TiO_2 a) Brookita, b) Anatasa y c) Rutilo

Tanto la brookita y la anatasa son fases metaestables, mientras que el rutilo es un material termodinámicamente muy estable.

Estas fases presentan elevada resistividad eléctrica [64], considerable dureza, estimada en el rango 5 - 6.5 en la escala de Mohs, son transparentes en el espectro visible (ancho de energía de banda prohibida en torno a 3 eV), birrefringentes y con los mayores valores de índice de refracción de los óxidos conocidos [65-66].

La brookita es muy difícil de obtener de forma artificial. Recientemente se ha conseguido sintetizarla en forma de película delgada [67].

Es también conocido que, entre los 750°C y los 1000°C, la anatasa sufre una transición de fase irreversible a rutilo [68-70]. La anatasa y el rutilo merecen una mención aparte, dada la gran cantidad de propiedades físico-químicas que les confieren un enorme interés tecnológico.

El TiO₂ presenta un color gris. Debido al elevado valor de su índice de refracción, partículas sub-micrométricas de TiO₂ en dispersión proporcionan al material un color blanco mate que hace que sea utilizado como pigmento en prácticamente todo tipo de pinturas [71]. Igualmente, su uso es también muy extendido en la óptica de películas delgadas para producir películas antirreflejantes, espejos dieléctricos para láseres y filtros interferenciales [72].

La elevada permitividad dieléctrica de este material ($\epsilon_r = 110 - 117$) [73-74] permite que, en forma de película delgada de pocos nanómetros de espesor, sea uno de los mejores candidatos a reemplazar el SiO₂ en la puerta de los transistores MOSFET [75-76].

A pesar de no ser materiales magnéticos, películas delgadas de anatasa y rutilo dopadas con una pequeña cantidad de Co son ópticamente transparentes, semiconductoras y ferromagnéticas a temperatura ambiente.

Estas características las convierten en candidatas ideales para utilizarse en dispositivos electrónicos basados en el espín [77]. Películas delgadas de TiO₂ nanocrystalino han sido utilizadas también en dispositivos electrocrómicos, por ejemplo, en espejos y *displays* [78-79].

2.3.2 Biocompatibilidad del TiO₂

Es por eso que el TiO₂, además de ser un excelente cerámico cuenta con excelentes propiedades de corrosión en presencia de fluidos humanos, esto se debe a que el TiO₂ actúa como una barrera química contra los iones metálicos desprendidos del implante protegiendo de esta manera al organismo, favorece significativamente la proliferación de células endoteliales, mientras que restringe el crecimiento de células de tejido muscular liso. Así también el TiO₂ provee la posibilidad de electro estimular y a la vez eliminar la respuesta inflamatoria desencadenada, al implantar un material, evitando la formación de una capa proteica, fibroblastos, o glias en torno al mismo [80]

2.4 Métodos de Síntesis

En la literatura se reportan diversas rutas de síntesis para la preparación de TiO₂, ya sea por sol-gel, síntesis coloidal, estado sólido, entre otras [81-85].

La obtención de nanoestructuras de TiO_2 en condiciones suaves se remite fundamentalmente a procesos sol gel. Así mismo, se han reportado numerosas investigaciones sobre la síntesis de aleaciones de TiNi por métodos convencionales tales como Sinterización Convencional [86], Síntesis de Autopropagación a Altas Temperaturas [87] y Método de Polvos Metalúrgicos [88-90], todos estos se enmarcan dentro de lo que se conoce en la Química como síntesis por estado sólido. En la actualidad se ha reportado un método de síntesis enmarcado en la Química Verde, la Biosíntesis.

A continuación se describirán brevemente algunos métodos de síntesis convencionales, tanto para el TiNi como para el TiO_2 , finalmente se presentará el estado del arte de la Biosíntesis método por el cual se propone la obtención del bionanocompósito TiO_2 -TiNi en esta tesis.

2.4.1 Síntesis en Estado Sólido

Es un método muy utilizado para la preparación de compuestos termodinámicamente estables como compuestos metálicos, semiconductores, entre otros. Este es un método en el cual se ponen en contacto los reactivos a temperaturas elevadamente altas para permitir la interdifusión y reacción en estado sólido.

Este método se basa principalmente en el mezclado de las materias primas adecuadas como pueden ser óxidos, carbonatos, nitratos entre otros, para posteriormente calcinar la mezcla a temperaturas elevadas.

La reacción comienza en las zonas en contacto entre las distintas especies, continuando con la difusión iónica a través del sólido, cuya velocidad de reacción es rápida inicialmente y se va haciendo más lenta a medida en que mayor es el camino de difusión de los iones, y por lo tanto se requiere de altas temperaturas y tiempos de retención mayores [91].

Khodorenko y cols. [36] sintetizaron TiNi a partir de la compactación de un polvo metálico mediante presión isostática, el material compactado se colocó en un horno y se sinterizó bajo atmósferas controladas a temperaturas altas obteniendo TiNi con morfología esférica y con tamaño de partícula de 20 μm , además de la presencia de una mezcla de fases de Ti. Por otro lado, Layton [86] llevó a cabo la síntesis de TiNi a partir de polvos, en el cual un polvo frío y compacto de Ni y Ti fueron prensados a partir de una mezcla de polvos elementales conformando un pellet, y posteriormente se sinterizó a temperaturas cercanas a la fusión, para producir una fase binaria de TiNi a través de la difusión de los elementos obteniendo la síntesis de TiNi poroso, el cual presentó un módulo elástico similar al del hueso humano por lo que pudiera utilizarse como implante.

Algunas investigaciones llevadas a cabo por Facchini y cols. [81], así como Gao y cols. [82] reportan la síntesis de dióxido de Titanio (TiO_2) mediante el método Sol-Gel. En estos trabajos pusieron en contacto los reactivos sólidos previamente mezclados y posteriormente se pusieron en un horno a altas temperaturas para permitir la interdifusión y reacciones de estado sólido, obteniendo nanobarras con elevada capacidad fotocatalítica con un tamaño de partícula de 60-130 nm.

La característica similar de estos métodos de síntesis es que utilizan altas presiones, altas temperaturas y son muy costosos, además de que no presentan homogeneidad. Es por eso que los científicos en materiales han emprendido una ardua búsqueda por encontrar rutas de síntesis alternas más económicas, fáciles de implementar y que sean amigables con el medio ambiente.

2.4.2 Biosíntesis

Como resultado de investigaciones en el campo de la síntesis de nanopartículas se ha visto el uso de sistemas biológicos para este propósito [92-98].

Estos sistemas tienen muchas aplicaciones biotecnológicas, tales como en la remediación de metales tóxicos; que frecuentemente ocurre por la reducción de iones metálicos y la formación de sulfuros metálicos [99-108], y aunque existe amplia literatura respecto al uso de microorganismos, el área de investigación en materiales es muy reciente.

A este respecto se ha encontrado que los microorganismos son capaces de producir materiales inorgánicos tanto dentro como fuera de su célula, mediante el proceso conocido como biosíntesis.

Algunos microorganismos tolerantes a metales, presentan en su metabolismo normal el mecanismo de remoción de los metales mediante su precipitación. Cuando el microorganismo es cultivado en presencia de sales de metales puede generar enzimas reductoras, intra o extracelulares, que transforman el metal a su forma insoluble, generando cristales de diferentes

formas y tamaños [108]. Por lo que se ha visto a los microorganismos como una fuente potencial para la síntesis de nanopartículas de diferentes metales, óxidos y sulfuros.

Algunos hongos han sido objeto de estudio en el campo de los materiales debido a su capacidad para producir nanopartículas metálicas, las cuales han presentado buena distribución de tamaño de partícula y dimensiones bien definidas [108].

Es conocido que las levaduras han sido utilizadas desde la antigüedad en algunos procesos, y actualmente son empleadas en la síntesis de nanopartículas metálicas y semiconductores [109].

La síntesis de nanopartículas de Ag^+ extracelularmente es llevada a cabo por una levadura resistente MKY3 (2003) [110] cuando ésta fue expuesta en soluciones de 1mM de Ag^+ obteniendo partículas con tamaño de 2-5 nm.

Así también, se ha comprobado que al exponer la levadura *Candida glabrata* con iones Cd^{2+} se lleva a cabo la síntesis intracelular de nanopartículas de CdS [111].

Por otro lado se ha demostrado que la levadura *Saccharomyces pombe* sintetiza intracelularmente nanopartículas de CdS las cuales exhiben características de un diodo ideal [112]. En estudios realizados con *Torulopsis* sp se comprobó que ésta es capaz de sintetizar nanocristales de PbS intracelularmente con un tamaño de 2-5 nm cuando es incubado en presencia de iones Pb^{2+} [112].

Lo anteriormente descrito permite elucidar que las levaduras son una ruta de obtención nanopartículas metálicas intracelularmente por lo que la separación de las nanopartículas obtenidas tendría que darse por liofilización, quedando entonces imposibilitado este proceso para la obtención de aleaciones metálicas. Por lo que pensando en la manera de formación de compuestos a partir de microorganismos el uso de hongos es factible debido a la gran secreción de enzimas para la producción de nanopartículas metálicas y nanoaleaciones, sin la necesidad de liofilizar, pues en función de la respuesta de éstos a algunos medios pudiera darse un proceso extracelular.

Algunos estudios han demostrado procesos de bio-reducción de iones acuosos AuCl_4^- cuando se utilizó el hongo *Verticillium* sp, obteniendo nanopartículas de oro con excelente monodispersidad y dimensiones bien definidas [113]. También el hongo *Trichothecium* sp es capaz de sintetizar nanopartículas de Au^{3+} tanto intra- como extracelularmente con diferentes morfologías [113].

Estos resultados muestran que los iones AuCl_4^- son atrapados en la superficie celular y ocurre por la interacción electrostática con grupos cargados positivamente (como residuos de lisina) debido a las enzimas presentes en la pared celular. Dicho estudio fue comparado con investigaciones realizadas en bacterias, señalando que los hongos podrían ser una fuente potencial para la producción de grandes cantidades de nanopartículas, debido a la habilidad que tienen los hongos de secretar una alta proporción de enzimas, teniendo así una considerable productividad de nanopartículas en el enfoque biosintético. La elucidación del mecanismo de formación, fue seguido in vitro, donde la reductasa específica del NADH,

liberada por el *Fusarium oxysporum*, realizó satisfactoriamente la reducción de iones AuCl_4^- obteniendo nanopartículas de oro.

Otro estudio basado en las propiedades de *Fusarium oxysporum*, lo utilizó en la formación de un hidrosol de plata sumamente estable [113].

En otro reporte, pero con el hongo acidófilo *Verticillium* sp se demostró la capacidad de éste para producir nanopartículas tanto de oro y plata cuando fue incubado con iones Ag^+ y AuCl_4^- [111-112].

Lo anterior ha abierto la posibilidad de producción de nanopartículas que pueden quedar atrapadas en la biomasa en forma de película o producidas en una solución, ambos tienen un notable potencial comercial [111-113].

En este sentido, el hongo, *Aspergillus flavus* ha sido estudiado por su capacidad para acumular nanopartículas de plata en la superficie de la pared celular cuando es incubado con una disolución de nitrato de plata [112-114].

Algunos parámetros, como el tiempo mínimo de reacción, la miniaturización y un proceso no peligroso son claves para el desarrollo de tecnología en tamaño nano. En este esfuerzo, Bhainsa y D'Souza [113] obtuvieron nanopartículas de plata con alta monodispersidad en un lapso de 10 minutos usando *Aspergillus fumigatus*.

En relación a la síntesis de nanopartículas con propiedades electrónicas se tiene que se obtuvieron nanopartículas de titanato de bario tetragonal (BaTiO_3) con dimensiones de 10 nm por medio de *Fusarium oxysporum* en condiciones ambientales, observando que es un método de síntesis económico y amigable en la obtención de nanomateriales de interés tecnológico [114-115]. También, se obtuvo la síntesis de puntos cuánticos como el CdSe a temperatura ambiente, utilizando para esto el hongo *Fusarium oxysporum* incubado con una mezcla de CdCl_2 y SeCl_4 [115]. Recientemente, el hongo *Fusarium oxysporum* también ha sido usado en la síntesis de nanopartículas de SiO_2 y TiO_2 exponiéndolo a una mezcla de SiF_6^- y TiF_6^- respectivamente. En este reporte se induce que la hidrólisis extracelular de los complejos aniónicos mediante las proteínas provoca la síntesis de partículas cristalinas [113-115].

En relación a la biosíntesis de TiNi, solo existe un reporte en literatura a la fecha, realizado por Schabes-Retchkiman en el 2006 [115], quienes indicaron que la Alfalfa (*Medicago sativa*) al ser expuesta a sales de los metales Ni y Ti es capaz de producir nanopartículas de TiNi por medio de una reducción obteniendo tamaños de partícula de 1-4 nm, con estructura tipo cúbica centrada en las caras (fcc).

En base a todo lo anteriormente descrito, se establece que los microorganismo de origen eucariótico (hongos), tienen en sus procesos mayor factibilidad para la producción de nanopartículas metálicas y nanoaleaciones debido a la alta producción de enzimas reductoras teniendo la posibilidad de generar en el medio iones metálicos posibilitando a éstos para una rápida recombinación y formación de una nanoaleación, por lo que en este estudio se propone la biosíntesis de un nanocompuesto de TiO_2 -TiNi utilizando una cepa de hongo.

HIPÓTESIS

Se biosintetizarán nanoestructuras de TiO_2 y TiNi con características químicas y mecánicas para el desarrollo de un biomaterial.

OBJETIVO

Biosintetizar nanoestructuras de TiO_2 y TiNi y caracterizar sus propiedades mediante técnicas estructurales, químicas y mecánicas con perspectivas de aplicación como biomaterial.

METAS

- Seleccionar la cepa de hongo a utilizar entre los géneros *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Alternaria* sp, *Curvularia* sp y *Aspergillus Níger*.
- Sintetizar las nanoestructuras de TiO_2 y TiNi .
- Caracterizar las nanoestructuras por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía de Fuerza Atómica (MFA), Microscopía Electrónica de Barrido de emisión de campo (*FESEM*) y Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).
- Realizar tratamientos térmicos de sinterización de las nanoestructuras obtenidas y caracterizarlas por DRX, *FESEM* así como microdureza Vickers.
- Realizar ensayos de cultivos en un suero fisiológico artificial.
- Caracterizar las probetas utilizadas en los ensayos de cultivo por FTIR y *FESEM*.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se describen las condiciones de preparación y caracterización utilizadas durante el desarrollo del presente trabajo. El fundamento de las técnicas de caracterización utilizadas se detallan en el Apéndice A. Así mismo en el Apéndice B se dan a conocer las características morfo-culturales del hongo *Penicillium sp* utilizado en esta tesis.

2. Ubicación

Se desarrolló la presente investigación en las instalaciones del Centro de Laboratorios Especializados de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.N.L., teniendo como base de operaciones el Laboratorio de Materiales I y el Laboratorio de Biotecnología. Además se tuvo el apoyo del Laboratorio de Ingeniería Química para la realización de los análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido, así mismo se contó con el apoyo de la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica para la realización de los Ensayos de Microdureza. En relación al análisis por Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM) se agradece el apoyo al Centro de Innovación, Investigación y Desarrollo en Ingeniería y Tecnología (CIIDIT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León para la realización de estos análisis. Además se agradece el apoyo al Centro de Análisis de JEOL México por los análisis de microscopía de fuerza atómica realizados.

3.2 Preparación del inoculo

Antes de proceder a la prueba de reducción de nitratos y con el fin de obtener cultivos en crecimiento activo, se estudiaran 5 cepas de hongos: *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., las cuales se sembraron en agar Patata Dextrosa incubándose a 28 °C por un lapso de 3 días.

3.3 Selección de la cepa con capacidad de reducir nitratos

La selección de la cepa con capacidad de reducción de nitratos se realizó tomando las cepas de *Alternaria* sp, *Curvularia* sp, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp y *Penicillium* sp de la colección de Hongos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, conservadas en agar Patata Dextrosa. Las cepas fueron previamente aisladas y se sembraron en el medio de cultivo (ver Tabla 1) los cuales posteriormente se incubaron a 28 °C por un tiempo de 3 días.

Tabla 1

Composición del Medio de Cultivo para la selección de la cepa

Extracto de Levadura	11.70%
Nitrato de Potasio	0.78%
Agua Destilada	100mL

3.4 Mantenimiento y Viabilidad del microorganismo

Una vez determinado el microorganismo a partir de las pruebas de reducción de nitratos, se prosiguió con el mantenimiento y la viabilidad del mismo con el propósito de mantener viable el cultivo puro, realizando resiembras mensuales para el mantenimiento de la cepa pura. Cabe aclarar que todos los microorganismos fueron previamente obtenidos de ecosistemas contaminados con metales pesados.

3.5 Obtención de la biomasa

3.5.1 Propagación del Hongo *Penicillium* sp.

Se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer que contenían 150mL del medio (ver tabla 2) los cuales fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos a 15 lb/in², posteriormente se dejaron enfriar y se inocularon con 10⁶ células del cultivo, en condiciones de asepsia, para después llevar a cabo la propagación del hongo a 28°C y 200 rpm.

Tabla 2.

Composición del Medio de cultivo MGYP modificado

Sacarosa	1.00%
Extracto de malta	0.3%
Peptona	0.5%
Extracto de levadura	0.3%
Agua Bidestilada	100.0mL

2.4.3 Producción de la biomasa

El micelio obtenido fue separado por filtración, éste se lavó con agua destilada estéril en condiciones de asepsia, guardando el micelio en matraces cerrados para su posterior utilización.

3.6 Preparación de las disoluciones de Ni(NO₃)₂, NiCl₂·6H₂O y K₂TiF₆

Las disoluciones de $2.54 \times 10^{-4} \text{M}$ fueron preparadas a partir de sus sales pesando 0.06g de NiCl₂·6H₂O, 0.03g de K₂TiF₆ aforando a 500mL con agua destilada. Las soluciones preparadas se guardaron para ser posteriormente utilizadas.

3.7 Producción de las Nanoestructuras de TiO₂ y TiNi

En matraces Erlenmeyer se resuspendió 10g de la biomasa en 100 mL de la disolución $2.54 \times 10^{-4} \text{M}$ que contenía las sales de Titanio y de Níquel en relación 1:1 y se colocaron en agitación a temperatura ambiente por un lapso de 180 min, tomándose alícuotas de 5 mL cada 20 minutos , éstas se filtraron y el sobrenadante se analizó por espectroscopia UV-visible, posteriormente se separó la biomasa del sobrenadante, conteniendo las nanoestructuras, y se evaporó para obtener un polvo fino el cual se utilizó para el análisis por Difracción de Rayos X (DRX). Posteriormente, se realizaron probetas sinterizadas en forma de película y pastilla, bajo tratamientos térmicos de 250°C y 500°C en atmósfera de aire. Estas muestras se utilizaron para realizar ensayos de Microdureza, además de realizarles un análisis microestructural y

morfológico por Microscopía de Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (FESEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM). Así mismo, estas probetas fueron sujetas a ensayos de Bioestabilidad.

3.8 Caracterización

3.8.1 Análisis de Espectros de Infrarrojo (IR).

La identificación de los grupos funcionales presentes en la pared celular del microorganismo tiene un papel importante en la síntesis de las nanoestructuras de TiO_2 y TiNi . Por lo que se llevó a cabo análisis por IR, para esto se tomó el micelio de los microorganismos antes y después de la producción de las nanoestructuras, el cual se secó y pulverizó. Posteriormente este polvo se compactó y se mezcló con KBr en una relación en peso de 1:100 formando una pastilla la cual fue analizada en un equipo de FTIR, con la finalidad de confirmar el mecanismo extracelular de biosíntesis, así como de descartar mecanismos alternos de reacción. Este análisis se realizó en un Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadas de Fourier marca Perkin-Elmer FTIR Spectrometer Paragon 1000 PCTM en un intervalo de 1000 a 4000 cm^{-1} .

3.8.2 Análisis de Espectros de Ultravioleta visible.

Se tomaron 10g de biomasa, éstos fueron puestos en contacto con las disoluciones de las sales en agitación por 160 min. Se tomaron alícuotas de 5 mL y se filtraron. Al sobrenadante se le midió la absorbancia en un Espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 12. Además se realizó previamente el análisis de la disolución tanto del K_2TiF_6 como del $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ y del $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

3.8.3 Análisis de Difracción de Rayos X.

El sobrenadante obtenido se evaporó y se obtuvo un polvo el cual se colocó en un mortero de ágata y se trituró finamente. Esta muestra se analizó por Difracción de Rayos X en polvos en un equipo Siemens D5000 usando radiación monocromada de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=1.5406\text{Å}$), el tiempo de paso fue de 30 minutos en el rango de 2θ de 0-70°.

3.8.4 Análisis por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

El polvo finamente obtenido se comprimió formando una pastilla, la cual se llevó a analizar en el DSC con el fin de determinar las temperaturas de transformación de fase de martensita a austenita del TiNi obtenido. Este análisis se llevó a cabo en un equipo de Calorimetría Diferencial de Barrido Perkin-Pyris1 con una rampa de calentamiento de 10°C/min bajo una atmósfera de Nitrógeno de acuerdo a la norma ASTM F 2004 [44].

3.8.5 Análisis por Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM).

Se realizó un análisis por microscopía electrónica de barrido tanto del polvo obtenido de la biosíntesis, como de las muestras obtenidas después de los tratamientos térmicos aplicados. Estos análisis se realizaron en un equipo JSM6510LV marca JEOL *Scanning Electron Microscopy*, además dichos análisis se volvieron a analizar en un equipo FEI Nano SEM acoplado con una microsonda EDAX modelo DX prime.

3.8.6 Análisis por Microscopía de Fuerza Atómica.

Las nanoestructuras sintetizadas se analizaron por Microscopía de Fuerza Atómica, esto con el fin de proveer una imagen topográfica del material y así poder determinar la distribución del tamaño de las nanoestructuras obtenidas. Esto se llevó a cabo preparando la muestra en forma de película delgada sobre un portaobjetos y se analizó en un equipo de AFM Nanoscope III Multimode de Veeco Inc. Se utilizó el modo de no contacto, realizando barridos de 1 μ m. Para este análisis se utilizó una punta de SiN modelo RTESP, marca Veeco.

3.8.7 Formación de las probetas sinterizadas.

Con la finalidad de estudiar el efecto de bioestabilidad de las muestras biosintetizadas, se realizó un proceso de sinterización. Para esto se compactaron muestras del nanocompósito en modo isostático uniaxial bajo una carga de 8 Toneladas sobre un área de 1 cm², aplicando una presión de 4000 kg/m³ durante un tiempo de 60 segundos. Obteniéndose probetas con un espesor de 2.5 micras. Una vez prensadas las probetas se sometieron a tratamientos térmicos de sinterización a temperaturas de 250°C y 500°C en tiempos de 60 min bajo atmósfera de aire. Para esto se utilizó una prensa CARVER modelo 4350, así como una mufla Thermolyne modelo 47900 con control de temperatura.

3.8.8 Procedimiento para los Ensayos de Microdureza.

Los ensayos de microdureza se realizaron en probetas previamente sinterizadas. Para el procedimiento de este ensayo se utilizó en un microdurómetro Vickers, marca Future Tech, se aplicó una carga de 250g perpendicular a la superficie del material y se mantuvo durante un tiempo de 15 segundos, de acuerdo a la norma ASTM 384-89 [90]. Se realizaron al menos cinco indentaciones por muestra, con el fin de obtener el promedio de microdureza en cada muestra sinterizada.

3.8.9 Determinación del Análisis de Bioestabilidad.

En el análisis de la literatura la determinación de la biocompatibilidad es reportada por De Aza y cols. [90] los cuales realizan las pruebas de biocompatibilidad y bioestabilidad en sueros fisiológicos, con la finalidad de simular los fluidos corporales y así monitorear la transformación o estabilidad de las fases. Por lo que en este estudio se realizaron análisis de bioestabilidad de las probetas sinterizadas a 250°C y 500°C. Para esto se sumergieron las probetas obtenidas en un suero fisiológico artificial (SFA), cuya composición se muestra en la tabla 3. Este ensayo se realizó a la temperatura normal del cuerpo humano (36.5°C) durante un periodo de tiempo de incubación de 7 días con agitación constante. Las muestras sometidas a estas pruebas fueron posteriormente analizadas por microscopía electrónica en un SEM NovaTM Nano SEM 30 en el modo de electrones retrodispersados, así como análisis por FTIR en un equipo Perkin-Elmer Spectrum One.

Tabla 3

Composición del Suero Fisiológico Artificial

Componentes	Concentración (g/L)
NaCl	8.00
CaCl ₂	0.20
KCl	0.22
NaHCO ₃	1.00
NaH ₂ PO ₄	0.05
MgCl ₂	0.20

3.8.10 Manejo y Disposición de los Residuos

Los residuos generados durante el transcurso de este proyecto de tesis se dispondrán de acuerdo a los protocolos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos de la investigación así como su correspondiente discusión.

4.1 Selección de la cepa a utilizar

Se realizó una experimentación preliminar de acuerdo al diseño experimental descrito en el capítulo 3, sección 3.3. Se utilizaron cinco diferentes cepas de hongos con la finalidad de establecer cuál de éstas presenta la característica de reducción de nitratos y favorecer así el proceso de biosíntesis del nanocompósito de $\text{TiO}_2\text{:TiNi}$. En la tabla 4 se muestran los resultados de la experimentación.

Tabla 4

Diseño experimental preliminar para selección de microorganismo

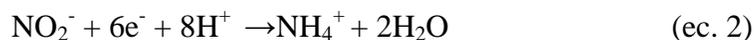
Microorganismo	Reducción de nitratos
<i>Fusarium</i> sp.	(-)
<i>Penicillium</i> sp.	(+)
<i>Curvulariasp.</i>	(-)
<i>Aspergillus niger</i>	(-)
<i>Alternariasp.</i>	(-)

La tabla de resultados muestra los cinco géneros de hongos utilizados, donde el *Penicillium*sp. fué el que presentó la mejor capacidad de reducción de nitratos en comparación con las cuatro cepas de hongos restantes. La determinación de reducción de nitratos se llevó a cabo mediante el procedimiento reportado por Holt y cols. [116] en donde con el uso de granalla de cinc se aumenta la coloración de la solución en función de la reducción de nitratos. Observándose en nuestros ensayos que este efecto se denotó más claramente en los que se utilizó el *Penicillium*sp .

Este resultado se debe a que el hongo *Penicillium*sp. además de necesitar el agua, requiere concentraciones de nitratos los cuales sirven como fuente de nitrógeno para sus funciones vitales y su supervivencia. Esto concuerda con los estudios realizados por Moreno y cols. [117], en donde ciertas cepas de hongos realizan la reducción asimilativa de nitrato a amonio para su crecimiento celular, proponiendo que este proceso se realiza en dos pasos. En el primer paso se realiza la reducción de los nitratos a nitritos, dicha reacción es catalizada por enzimas llamadas nitrato reductasas (Nas) que supone la movilización de dos electrones de acuerdo a la ecuación 1. Estas nitrato reductasas tienen un cofactor de Molibdeno (MoCo) en su centro activo denominados molibdoenzimas.



En el segundo paso se lleva a cabo la reducción de nitrito a amonio en donde el proceso es catalizado por las enzimas denominadas nitrito reductasas (NiR), este proceso propone la movilización de seis electrones de acuerdo a la ecuación 2.



En ésta el amoníaco que se genera en el citoplasma es debido a la actividad de la nitrito reductasa dependiente de la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH).

Lo descrito anteriormente, nos permite inferir que los resultados obtenidos para la reducción de nitratos indican que el hongo *Penicillium*sp. es el candidato adecuado para la obtención del compuesto TiO₂-TiNi.

4.2 Mantenimiento y Viabilidad del microorganismo.

Se resembró el hongo *Penicillium*sp. mensualmente en Agar Patata Dextrosa a una temperatura de 28°C y pH 7 durante un lapso de tiempo de 72 horas logrando así que el microorganismo creciera satisfactoriamente en el medio de cultivo, obteniendo una producción de biomasa de 2 gmL⁻¹.

4.3 Biosíntesis del nanocompuesto de TiO₂ y TiNi.

4.3.1 Análisis por Espectroscopia Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR).

Con el uso de microorganismos están reportados procesos de biosíntesis de forma intra y extracelular, tal como se describió en el capítulo 2, sección 2.2. Con la finalidad de identificar los posibles grupos funcionales adheridos a la pared celular, se realizaron análisis por espectroscopia de infrarrojo en muestras de biomasa para el hongo utilizado, *Penicillium*sp., antes y después del proceso de biosíntesis.

En la Tabla 5 se resumen las vibraciones características de grupos funcionales identificados en la pared celular del microorganismo.

Tabla 5

Vibraciones características de grupos funcionales presentes en la pared celular del microorganismo.

Grupo Funcional	Número de onda (cm ⁻¹)
C-O-C	1054
C-C	1534
-CONH-	1656
O=C=O	2339
CO-CH ₃	2943
O-H	3473
O-H tensión	3899

Los espectros de FTIR obtenidos se presentan en la Figura 9. En éstos se muestran tanto los espectros de la biomasa previa a la biosíntesis (a), como la biomasa después de ser utilizada en los procesos de biosíntesis con las sales de nitratos (b) y cloruros (c).

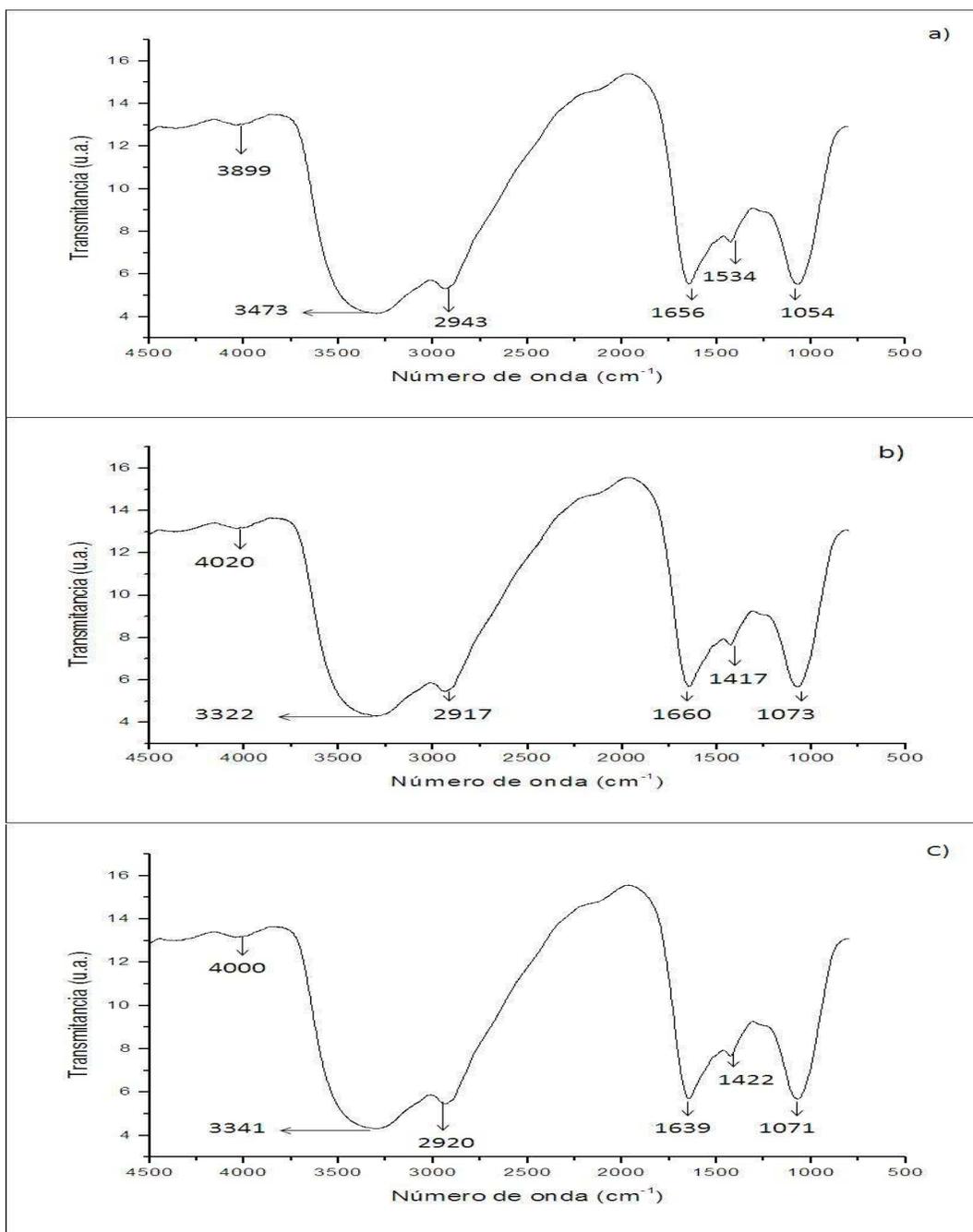


Figura 9. Espectros de infrarrojo para la biomasa de *Penicillium*sp. **a)** antes, **b)** y **c)** después del proceso de biosíntesis.

El objetivo principal de realizar este análisis, es el de identificar posibles grupos funcionales adheridos a la pared celular, tal y como lo reportó Garza y cols [118], en cuyo trabajo, relacionado con la biosorción de metales utilizando cepas de microorganismos, observaron una banda de absorción a 750 cm⁻¹ característico de la unión Ni-O. El cuál no se

apreció en ninguno de los análisis por FTIR obtenidos en sobre la biomasa utilizada en todos los experimentos, lo que permite deducir que el proceso de biosíntesis se da extracelularmente, como consecuencia a que el hongo *Penicillium* sp genera un mayor número de enzimas reductoras extracelularmente debido a que posiblemente en su ciclo de vida tiene como mecanismo principal la producción de metabolitos secundarios intracelularmente teniendo entonces la generación extracelular de enzimas reductoras, las cuales son las responsables de la biosíntesis de nanopartículas metálicas, hecho que se comprobó mediante experimentos adicionales, los cuales se presentarán y discutirán en la sección 4.3.3.

4.3.2 Espectroscopía de UV-Vis.

Después de realizar los experimentos de biosíntesis de acuerdo al diseño experimental planteado en el capítulo 3, sección 3.7. Se realizaron análisis del sobrenadante por UV-Vis. Los análisis se realizaron cada 20 min, hasta 160 min. Estos espectros se muestran en la Figura 10.

En estos espectros se identificaron las longitudes de onda de absorbancia máxima correspondientes al TiO_2 en tamaño nanométrico. Pues al tener nanoestructuras de TiO_2 con tamaños menores al radio del exciton de Bohr, el cual es solamente de 1.5 nm [119], se denotan efectos de confinamiento cuántico, característicos con un corrimiento hacia el azul de las bandas de absorbancia, tal y como se aprecia en los espectros de la Figura 10.

Por lo que en base a esto se puede determinar el valor de la Energía de banda prohibida (E_g), mediante la ecuación de Planck modificada (Ec. 3)[120].

$$E_g = \frac{1240}{\lambda} \quad (\text{Ec. 3})$$

En donde λ es la longitud de onda en nanómetros correspondiente a la extrapolación de una línea recta a partir de la curva de absorción, la cual se convierte en unidades de energía en electrón volts (eV).

Realizando entonces el análisis de los espectros de UV-Vis de las muestras del sobrenadante, se determinaron los valores de la energía de banda prohibida, obteniendo un valor de 3.26 eV para el caso en donde se parte de sales de cloruros y de 3.40 eV para el caso en el cual se parte de sales de nitratos, cuyo valor coincide con el reportado en literatura para TiO_2 por Tuesta y cols. [121], quienes obtuvieron películas delgadas de TiO_2 con espesores menores de 500 nm en fase rutilo y un tamaño de partícula de 40 nm, pero cabe aclarar que este reporte es a partir de un proceso de síntesis por estado sólido.

Ahora bien, de acuerdo a lo reportado en literatura [122], respecto a la relación inversamente proporcional entre la energía de banda prohibida y el radio de la partícula (ec. 4), es posible inferir la obtención de un menor tamaño de partícula en función del tiempo de exposición, debido a los corrimientos de absorbancia hacia el azul de estos experimentos conforme aumenta el tiempo.

$$E_g \propto \frac{1}{r^2} \quad (\text{ec. 4})$$

Lo cual indicaría la recombinación de los iones Ti y Ni para la formación de la aleación TiNi. Esto se pudo corroborar mediante el análisis por difracción de Rayos X en polvos (DRX).

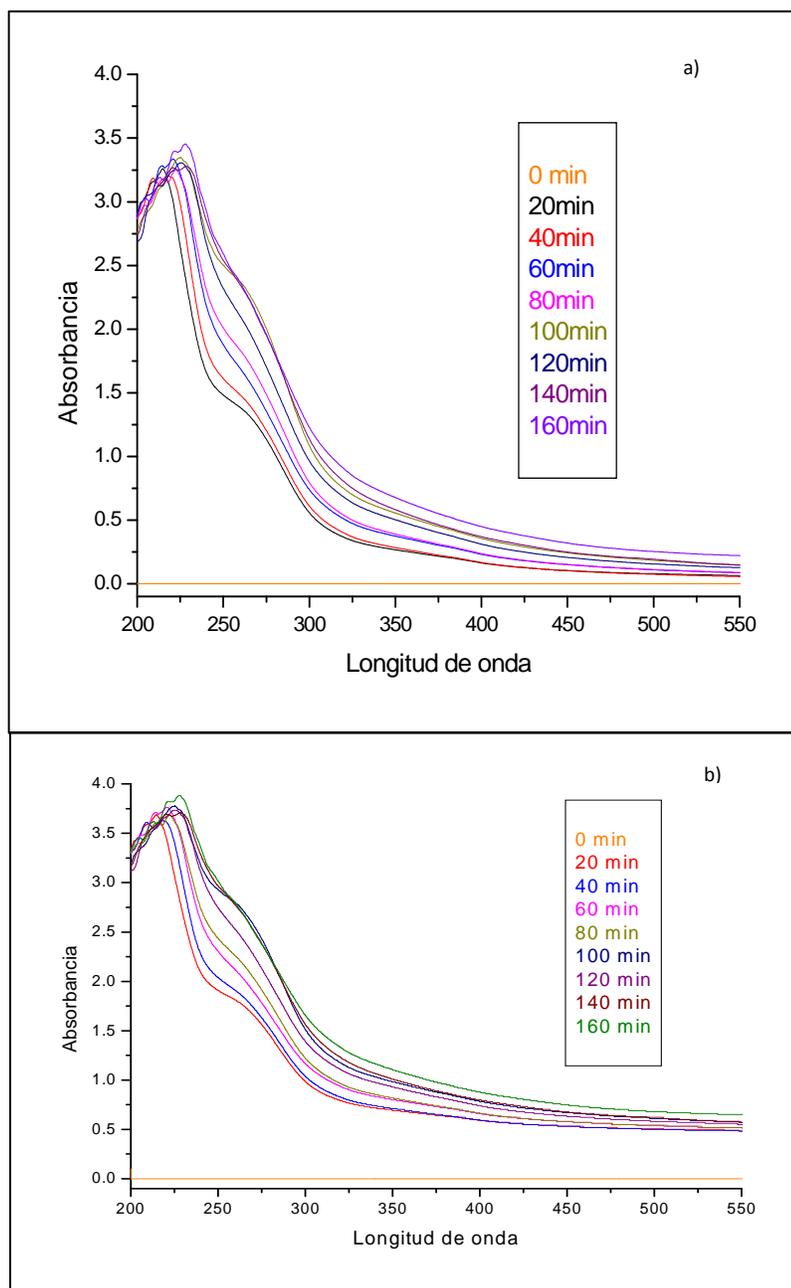


Figura 10. Espectros UV-vis del seguimiento de la producción de nanopartículas obtenidas extracelularmente por el hongo *Penicillium* sp. En presencia de a) K_2TiF_6 y $Ni(NO_3)_2$ $2.54 \times 10^{-4}M$, b) K_2TiF_6 y $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ $2.54 \times 10^{-4}M$

4.3.3 Difracción de Rayos X (DRX).

En la Figura 11 se muestra uno de los espectros de difracción de Rayos X obtenido bajo las condiciones de sales de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ y K_2TiF_6 llevada a cabo mediante el proceso de biosíntesis, descrito en la sección 3.8.3 del capítulo 3.

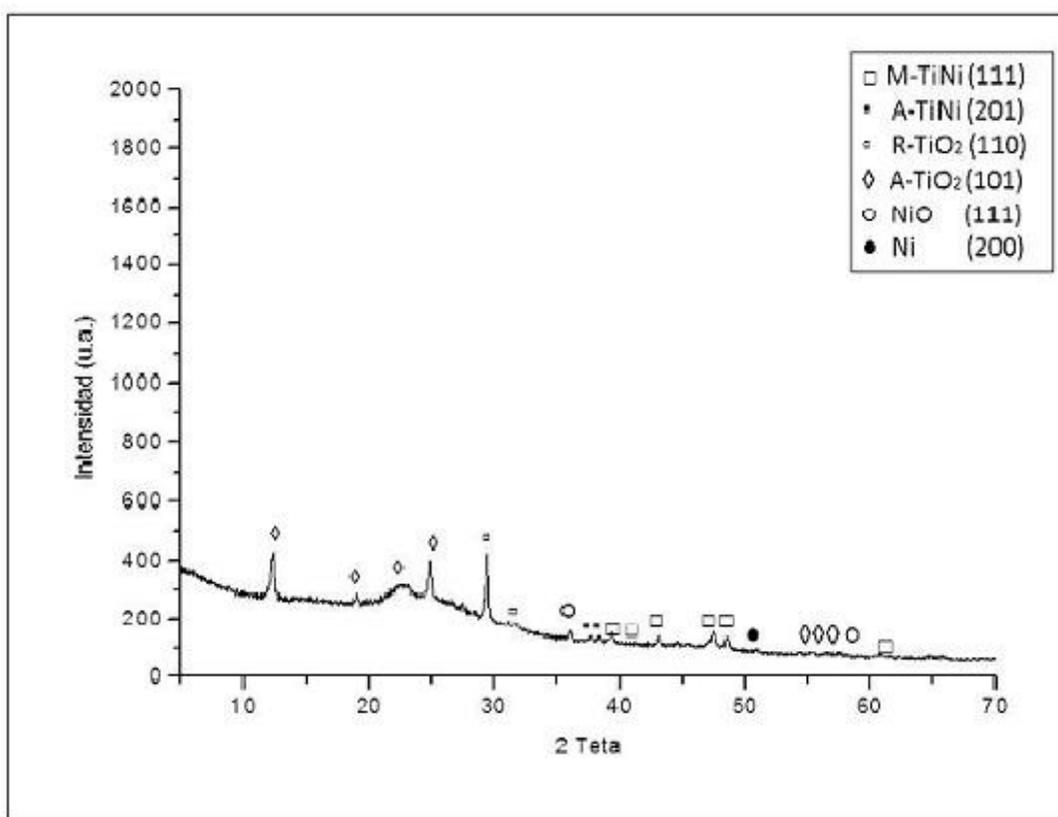


Figura 11. Espectro de difracción de Rayos X para el nanocompuesto obtenido a partir de las sales de K_2TiF_6 y $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ sintetizados por *Penicillium* sp., y cuyas reflexiones corresponden a TiNi martensita (JCPDS 35-1281), TiNi austenita (JCPDS 19850), TiO_2 rutilo (JCPDS 211276), TiO_2 anatasa (JCPDS 211272) además de las fases NiO (JCPDS 4-835) y Ni (JCPDS 4-850).

En éste se observan las reflexiones características de los polimorfos del TiO_2 así como de dos de las fases que presenta el TiNi, como son la Austenita y la Martensita, además, se observan la presencia de otras fases como son el NiO y de impurezas como el Ni que quedó sin reaccionar.

En la tabla 6 se resumen los parámetros de red de las fases presentes, así como de los planos correspondientes a cada una de las reflexiones observadas.

Tabla 6

Intensidades y planos asociados a las reflexiones de las fases presentes en el nanocompósito obtenido mediante el proceso de biosíntesis analizadas por Difracción de RayosX

Fase	2θ (rad)	Intensidad (u.a)
○ A-TiO ₂	12.36	426.57
○ A-TiO ₂	18.91	280.97
○ A-TiO ₂	22.68	313.23
○ A-TiO ₂	24.82	400.11
□ R-TiO ₂	29.39	422.36
□ R-TiO ₂	30.88	192.36
◆ NiO	36.02	153.62
■ A-TiNi	37.34	137.45
■ A-TiNi	38.28	135.42
▲ M-TiNi	39.44	145.53
▲ M-TiNi	43.24	137.45
▲ M-TiNi	47.59	145.57
▲ M-TiNi	48.75	131.05
◼ Ni	51	94.33
○ A-TiO ₂	54.43	88.27
○ A-TiO ₂	55.21	84.22
○ A-TiO ₂	56.51	85.74
◆ NiO	57.46	86.3
▲ M-TiNi	60.84	76.62
□ R-TiO ₂	64-71	73.23
□ R-TiO ₂	65.5	73.8

En la Figura 12 se muestra un espectro de difracción de Rayos X de una muestra expuesta a sales de K_2TiF_6 y $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ por un tiempo de 160 minutos. En éste se aprecia las reflexiones características del TiO_2 en sus dos polimorfos rutilo y anatasa, el primero se encuentra en mayor cantidad. Esto es similar a lo obtenido por Shabalovskaya y cols. [123] quienes reportan mayor presencia de TiO_2 fase rutilo en la superficie de TiNi, lo cual es debido a un proceso de pasivación del TiNi, cabe aclarar que ellos utilizaron síntesis por estado sólido.

Por otro lado, en el mismo espectro de difracción de rayos X, se denotan las reflexiones del TiNi, entre las que se encuentran la Austenita, Martensita, y la fase R, encontrándose la fase Martensita en mayor proporción.

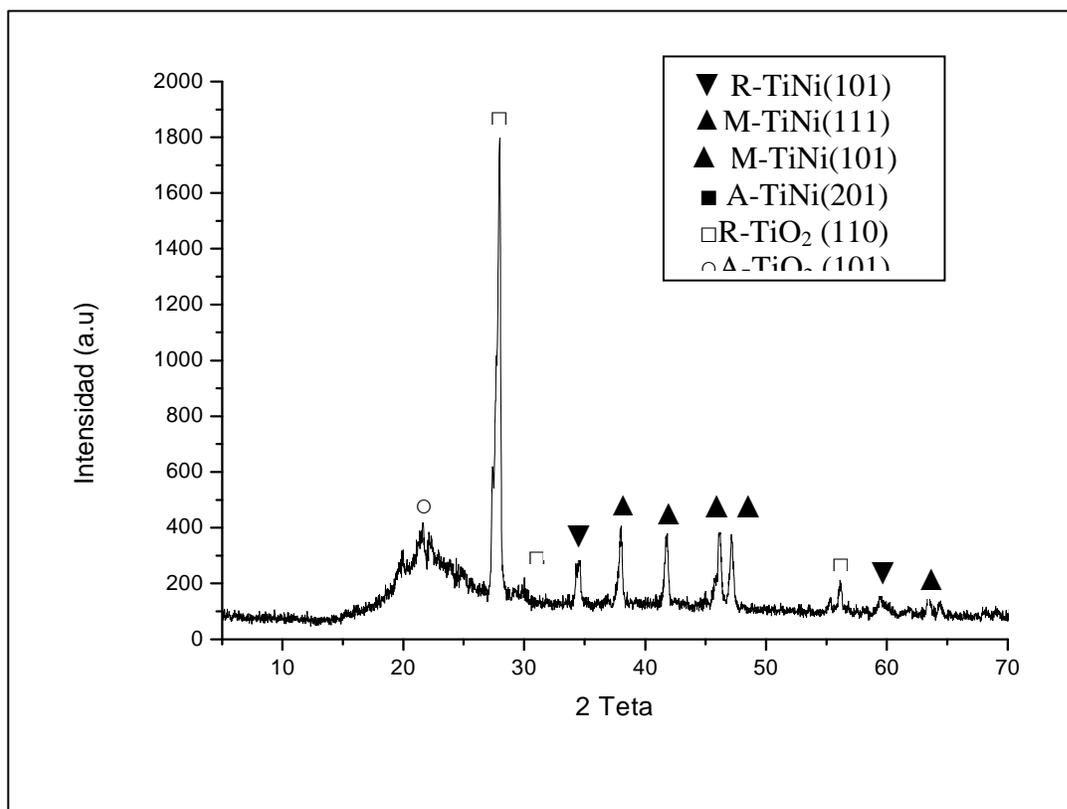


Figura 12. Espectro de difracción de Rayos X para el nanocompuesto obtenido a partir de las sales de K_2TiF_6 y $NiCl_2$ sintetizados por *Penicillium* sp y cuyas reflexiones corresponden a TiNi martensita (JCPDS 35-1281), TiNi austenita (JCPDS 19850), TiO_2 rutilo (JCPDS 211276), TiO_2 anatasa (JCPDS 211272) además del TiNi fase R (JCPDS 41-1379).

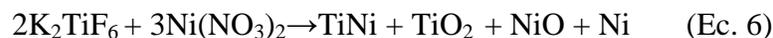
En base a este espectro, se determinó el tamaño de partícula teórico utilizando la ecuación de Scherrer (Ec. 5), que relaciona el diámetro de la partícula cristalina con el ancho del pico de mayor reflexión del espectro de Difracción de Rayos X.

$$B = \frac{k\lambda}{D \cos \theta} \text{ (Ec. 5)}$$

Donde B es la anchura del pico, λ es la longitud de onda empleada, D es el diámetro de la partícula, k es un parámetro dependiente de la morfología y $\cos\theta$ es el valor para la difracción de la reflexión considerada. Calculando un tamaño de partícula de 14.2 nm para el TiNi en fase martensítica. Así mismo, en base a las reflexiones correspondientes al óxido de titanio (TiO₂), se determinó éste con un valor promedio de partícula de 21.15 nm.

En estos análisis, es evidente que existe una diferencia en resultados respecto al tipo de solución al que fue expuesto el microorganismo.

Por lo que, analizando la química de las reacciones de las sales utilizadas, se proponen las siguientes ecuaciones, según sea el caso:



Cabe recordar que las condiciones de temperatura y presión utilizadas para estos experimentos son de temperatura y presión ambiente, lo cual potencializa esta ruta de síntesis como un proceso de química verde.

Además, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Ultravioleta-visible, debido a que por este análisis se detectó la presencia de la fase TiO_2 , por lo que se confirma que el hongo *Penicillium*sp. llevó a cabo la obtención del nanocompuesto de interés.

Es importante denotar en el proceso de biosíntesis por cloruros, (Fig. 12) la obtención de la fase R. Esta fase está reportada como una fase intermedia entre la martensita y austenita [124-125]. Por otro lado, en la muestra tratada con nitratos se denota Ni metálico y óxido, lo cual valida la reacción [ec. 7] propuesta bajo estas condiciones, pero esto delimita su uso para la preparación de un biocompuesto [125], debido a la toxicidad del Ni y del NiO. Así que en base a esto, y a lo obtenido por difracción de Rayos X es claro que el microorganismo es una fuente de enzimas capaces de proporcionar el proceso de óxido-reducción necesario para obtener las fases de interés.

Por otro lado, cabe aclarar que por procesos de obtención por estado sólido de TiNi, la fase que se obtiene es austenita, y la fase martensita se obtiene a mayor temperatura [125-126] y si ésta es enfriada bruscamente se asegura solo esta fase. Por lo que en función de esto así como de la presencia de la fase R en los experimentos llevados a cabo, nos permite determinar que a 160 min, el microorganismo se encuentra en proceso de transformación entre la fase austenita y martensita.

El conjunto de resultados presentados y analizados anteriormente nos indica que el *Penicillium* sp. tiene la capacidad de sintetizar nanocompuestos de TiO_2 y TiNi extracelularmente debido a un proceso enzimático. Por lo que se propone que el posible mecanismo por el cual el hongo es capaz de sintetizar nanocompuestos de TiO_2 y TiNi involucra un transporte de electrones durante el proceso de reducción, de acuerdo al esquema mostrado en la Figura 13.

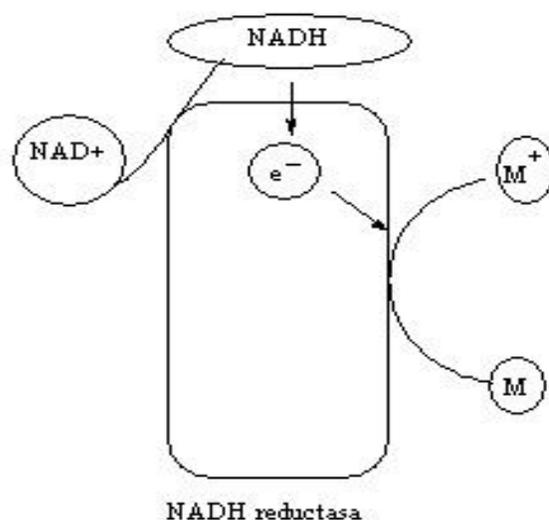


Figura 13. Posible mecanismo de la reducción del metal y la formación de TiNi.

En este esquema, se propone que la formación del nanocompuesto se inicia por la transferencia de electrones provenientes del NADH el cual es inducido por la enzima NADH reductasa que actúa como transportador de electrones. Esta propuesta concuerda con lo reportado por He y cols. [127], quienes indican que la formación de nanopartículas de Au es debido a una transferencia de electrones y señalan que el cofactor NADH y la enzima NADH reductasa son factores importantes en el proceso de biosíntesis.

Con la finalidad de sustentar lo anterior, se realizaron experimentos de síntesis adicionales del nanocomposito, utilizando para ello la l-cisteína, $\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SH}$, la cual tiene propiedades para la formación de enlaces metálicos de péptido, proteínas estructurales y enzimas [128]. Se ha reportado en procesos bacterianos la coordinación de uno o más átomos de azufre unidos al Ni, y este azufre es proporcionado por la cisteína [129]. Este aminoácido es parte importante en las enzimas debido a la formación de enlaces azufre-azufre, característico de la estructura terciaria de las enzimas [129].

Debido a la presencia de grupos sulfhídricos, en su estructura puede tener reacciones de acomplejamiento con iones metálicos tales como Cd^{2+} [130], Hg^{2+} [131] y Zn^{2+} [132]. También existen reportes en literatura de la formación de ligandos en mezclas de iones metálicos metálicos Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} con la l-cisteína [133]. Además, se ha reportado que la l-cisteína está presente en las enzimas reductoras del *Penicilium* sp [134-136], por lo que es factible utilizar la l-cisteína para validar el proceso de biosíntesis de TiNi y TiO_2 de nuestro sistema.

Estos experimentos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones en que se trabajó con el hongo; utilizando sales de NiCl_2 . Los polvos obtenidos después de la filtración y evaporación se caracterizaron por DRX, cuyo resultado se muestra en la figura 14.

En el espectro de difracción de rayos X se identificaron las reflexiones características del TiO_2 en fase anatasa y rutilo (JCPDS 211272 y 211276, respectivamente), así como las reflexiones características para el TiNi en las fases de austenita y martensita (JCPDS 19850 y 35.281, respectivamente). Esto es similar a lo obtenido por el microorganismo, lo que permite corroborar el proceso enzimático de biosíntesis propuesto en esta tesis.

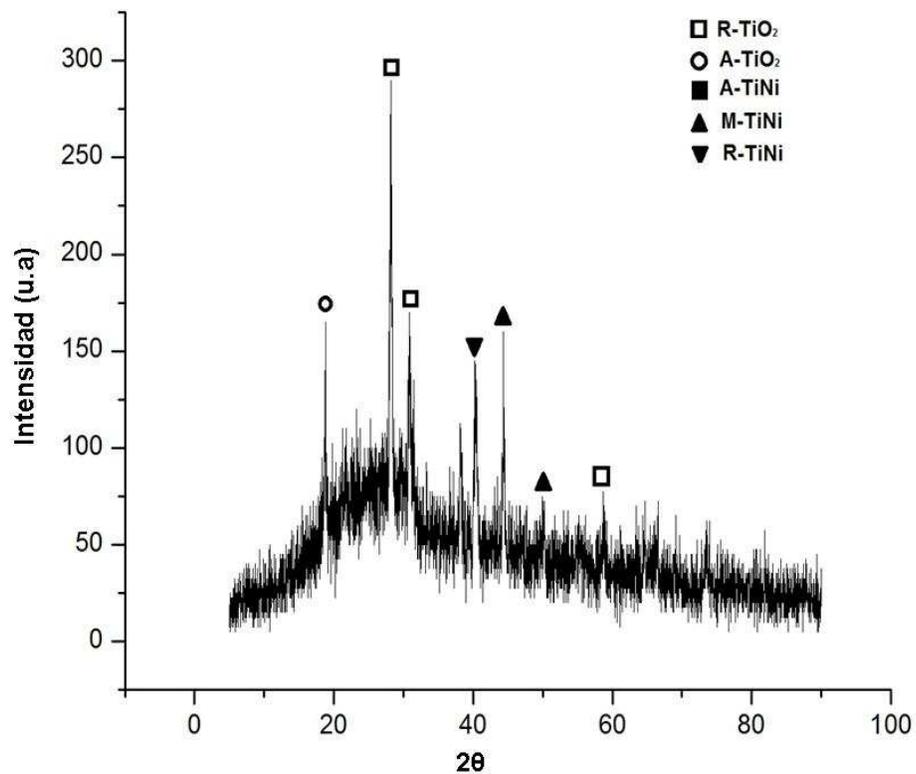


Figura 14. Espectro de difracción de Rayos X de una muestra obtenida por biosíntesis utilizando la l-cisteína.

4.3.4 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Las muestras obtenidas por el proceso de biosíntesis se caracterizaron por calorimetría diferencial de barrido con la finalidad de determinar las temperaturas de transición entre las fases Martensita y austenita del TiNi.

La Fig. 15 muestra dos termogramas en el ciclo de calentamiento para muestras obtenidas a partir de las sales de cloruros y de nitratos para el nanocompósito obtenido.

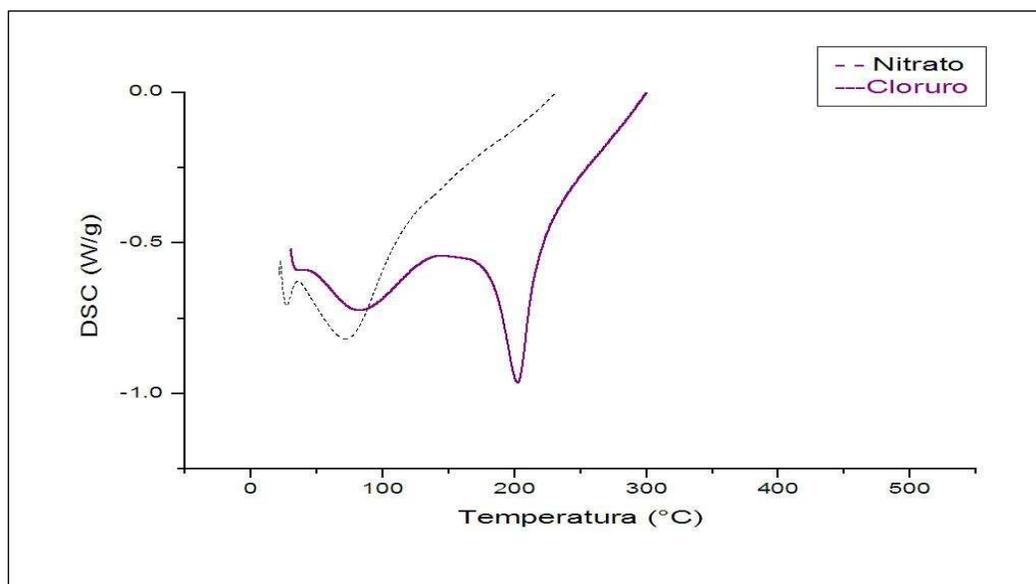


Figura 15. Termogramas para muestras obtenidas por biosíntesis a partir de las dos diferentes sales bajo estudio.

En ésta se observa la presencia de dos picos endotérmicos a las temperaturas de 40°C y 90°C para la muestra sintetizada en sales de nitratos. Así mismo se aprecian dos endotermas, una a 95 °C y otra a 200°C aproximadamente, en la muestra sintetizada con sales de cloruros. Estos picos endotérmicos pertenecen a la transformación de martensita a austenita, ya que en literatura se reporta esta temperatura de inicio para la transformación alrededor de 70°C [137-138] y puede modificarse en función de metales presentes [139], lo cual justifica el corrimiento de estas temperaturas en las muestras analizadas, debido a que en éstas existen además metales de Ni y Ti. Al exceder esta temperatura de transformación, se asegura una total transformación de la fase [137-138].

Además, la diferencia observada entre el tipo de sal utilizado, concuerda con lo encontrado por difracción de rayos X, ya que en la muestra obtenida bajo sales de nitrato se denotaron bajas intensidades de reflexión para el TiNi, lo cual indica tamaños de cristal muy pequeño, por lo que en función de ello se esperaba corrimientos de la temperatura de transición austenita-martensita a temperaturas más tempranas, tal y como lo observado en las endotermas de este tipo de muestra.

En relación a la muestra obtenida con sales de cloruro, las temperaturas de transición tienen mayor coincidencia con lo reportado en literatura, lo cual concuerda también con lo encontrado por difracción de rayos X, ya que en estas muestras se determinaron solo las fases de TiNi y TiO₂.

En función de lo anterior, se decidió estudiar más a detalle las muestras utilizadas bajo sales de cloruro. En la Figura 16 se muestran las curvas obtenidas tanto en el ciclo de calentamiento como en el enfriamiento. Este análisis se realizó en un rango de temperatura de 23°C a 160°C con la finalidad de determinar las temperaturas de inicio y final para la transformación de fases martensita – austenita.

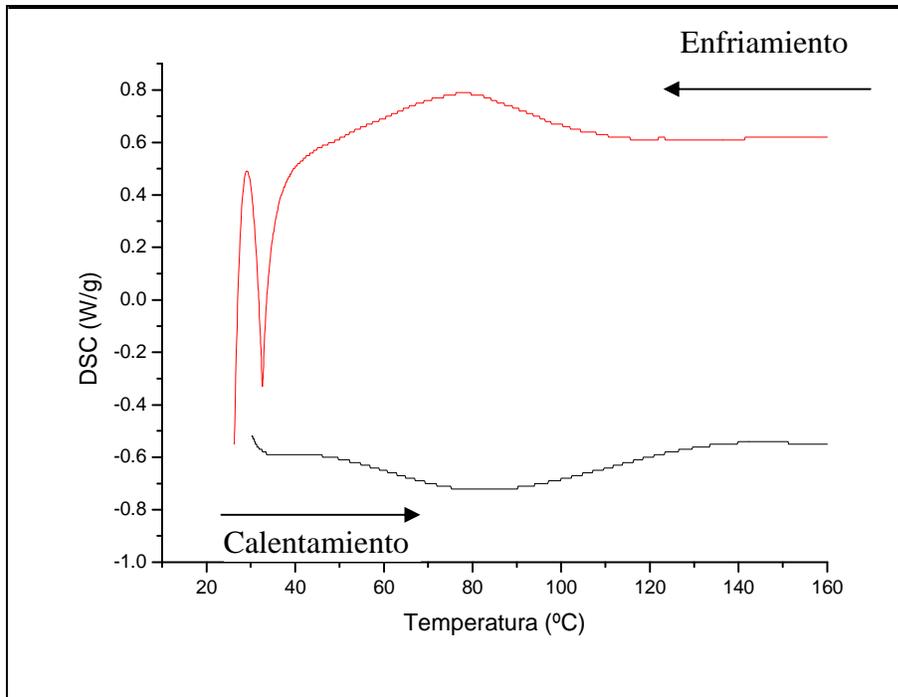


Figura 16. Curvas de DSC de las muestras sintetizadas en el proceso de calentamiento y enfriamiento.

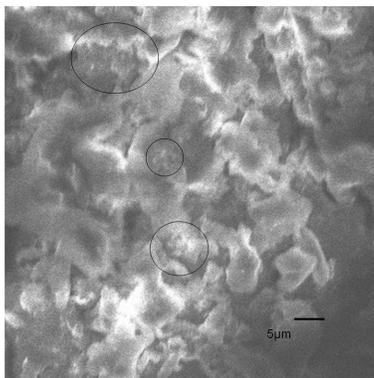
Las temperaturas de transformación medidas por calorimetría diferencial de barrido (DSC), las cuales son $M_s = 45.16^\circ\text{C}$, $M_f = 117.55^\circ\text{C}$ y $A_s = 46.53^\circ\text{C}$, $A_f = 109.3^\circ\text{C}$. El hecho de que las temperaturas M_s y A_s no sean iguales se debe a la energía extra necesaria para nuclear la primera capa de martensita. El valor para la transformación de histéresis $A_f - M_s$ es de 12°C , cuyo valor es menor a lo reportado en literatura para esta transformación, la cual es aproximadamente de 20°C para el TiNi en tamaño micrométrico [139].

Por otra parte, la anchura de los picos correspondiente con la diferencia entre las temperaturas M_s y M_f la cual es de 72.3°C y entre A_s y A_f la cual es de 62.7°C , indica que el TiNi posee un ciclo de histéresis mayor, por consiguiente el tamaño de partícula es pequeño y esto cambia de manera drástica las propiedades del TiNi lo que implica que se requiere de una mayor temperatura para regresar a su forma original, obteniéndose así un material mucho más duro.

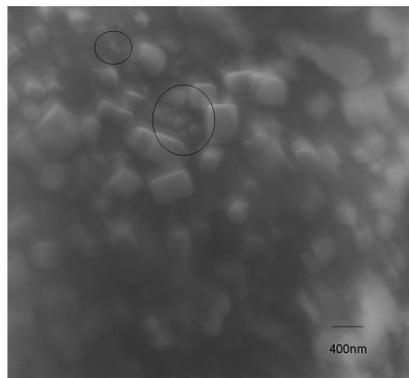
4.3.5 Microscopía Electrónica de Barrido por Emisión de Campo (*FESEM*).

En la Figura 17 se muestran las micrografías obtenidas por *FESEM* para la biomasa antes del proceso de biosíntesis (a), y para el nanocompósito obtenido después de los tratamientos térmicos a 250°C (b) y 500°C (c).

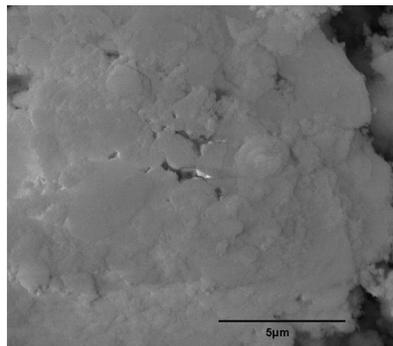
Cabe recordar que el nanocompósito se obtuvo después de evaporar el sobrenadante.



a)



b)



c)

Figura 17. Imágenes de FESEM para la biosíntesis (a) y el nanocompósito obtenido después de someterlo a tratamientos térmicos de 250°C (b) y 500°C (c).

La Figura 17 (a) muestra la micrografía del polvo obtenido después del proceso de evaporación, en ésta se observan microestructuras tipo hojuelas denotando arreglos alineados, así también se señalan zonas de aglomeramiento de estructuras poligonales en tamaños menores a $1\mu\text{m}$. En la Figura 17 (b) se muestran las micrografías de FESEM después de llevar a cabo un tratamiento térmico a 250°C en donde se distingue la obtención de nanopartículas de morfología poliédrica bien definida en un rango de tamaño de 20-200 nm. En la imagen mostrada en la Figura 17 (c) se denota la sinterización total del material después de haberlo sometido a un tratamiento térmico de 500°C .

Con el propósito de verificar la obtención del nanocomposito se llevó a cabo un microanálisis puntual por EDS, cuyos resultados se muestran en la Figura 18.

En la Figura 18 (a) se muestra una micrografía en donde se aprecian nanoestructuras de tamaños que van desde 20 nm a 250nm, así mismo, en ésta se denota la zona analizada, cuyo resultado se muestra en el gráfico de barras (Figura 18 (b)), en donde se muestra el porcentaje en peso de Ti, Ni y O, los cuales dan como base para la formación del TiO_2 y TiNi .

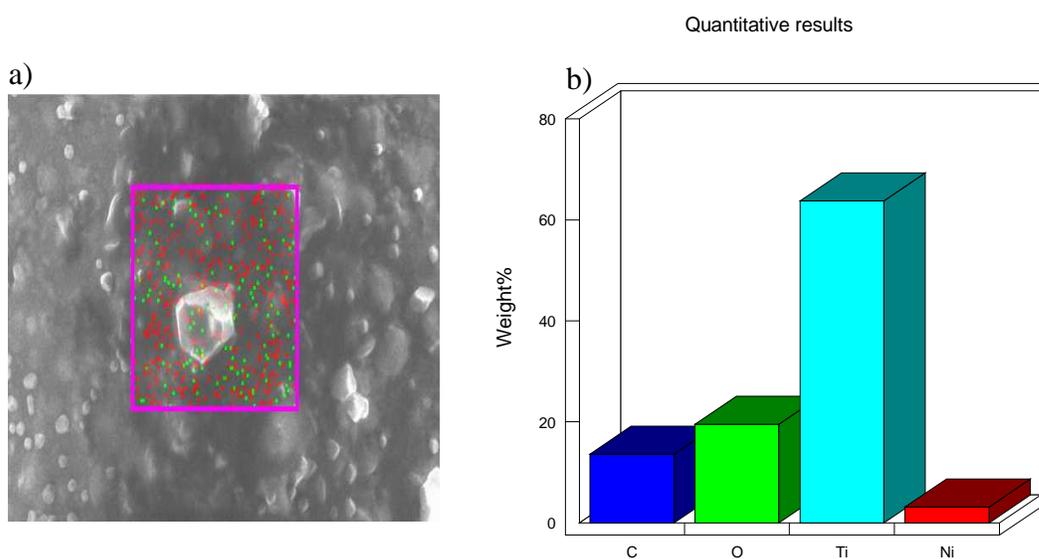


Figura 18. Micrografía FESEM (a) del compuesto de TiNi/TiO_2 , b) Análisis EDS del nanocompósito obtenido por el hongo *Penicillium* sp.

Por otro lado, con la finalidad de seguir también el análisis de las fases obtenidas con la l-cisteína por medio de FESEM, se presenta en la Figura 19 una micrografía. En esta se denotan arreglos morfológicos alineados, similar a lo obtenido por el microorganismo (ver Figura 17 a), lo cual corrobora de nueva cuenta el proceso enzimático extracelular seguido por el hongo para la biosíntesis de las fases de TiO_2 y del TiNi. En la Figura 19 se muestra la micrografía obtenida después de la síntesis, en donde se denotan los arreglos morfológicos tipo hojuelas, similar a lo observado del sobrenadante del proceso de biosíntesis (ver Figura 17 a).

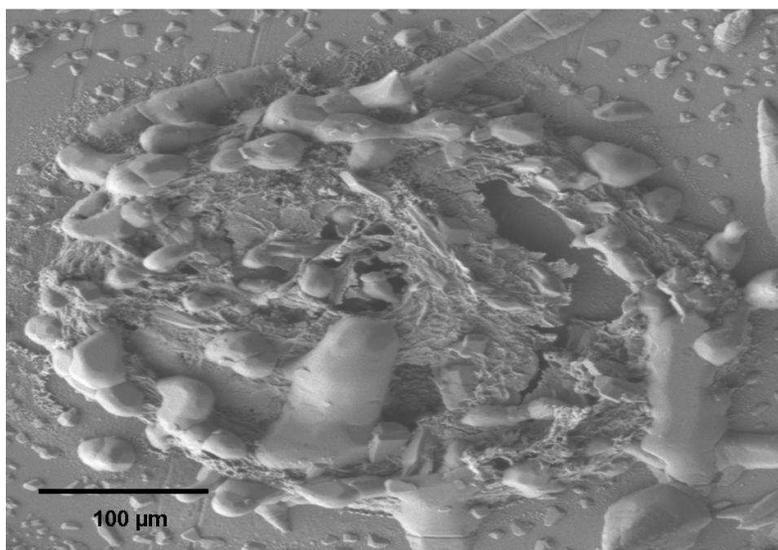


Figura 19. Micrografía FESEM del compuesto obtenido por la l-cisteína.

4.3.6 Microscopía De Fuerza Atómica

Con el propósito de analizar con mayor resolución las muestras del nanocompósito de TiO_2 y TiNi , se procedió a realizar análisis de Microscopia de Fuerza Atómica. En la Figura 20 se muestra una imagen para el nanocompósito obtenido por biosíntesis sin tratamiento térmico. En ésta es posible apreciar aglomerados de partículas con morfología esférica, esta característica permite comprobar de nueva cuenta que el proceso de biosíntesis se llevó a cabo extracelularmente debido a que este análisis se realizó sobre una muestra del sobrenadante preparado por evaporación sobre un portamuestras de vidrio. En esta imagen se denotan claramente las nanoestructuras de tipo esferoidal claramente aglomeradas, acomodándose en forma poligonal.

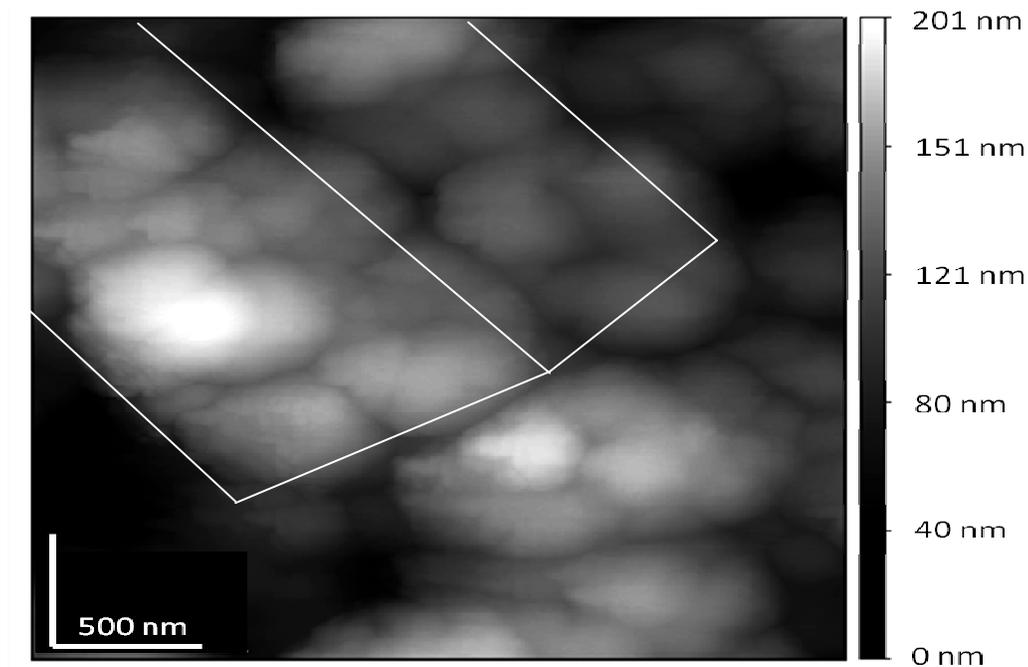


Figura 20. Micrografía de Fuerza Atómica para una muestra biosintetizada.

4.3.7 Microdureza

Los datos de microdureza obtenidos en las muestras sinterizadas a 250°C y 500°C fueron graficados y se presentan en la Figura 21. En esta misma figura se muestran los datos de TiNi y de TiO₂ de muestras obtenidas por estado sólido, sinterizadas a 900°C por un tiempo de 15 min las cuales fueron compactadas bajo una carga de 9 toneladas aplicando una presión de 4600 kg/m³ durante 60 segundos como referencia [140-142]. Lo anterior se realizó con la finalidad de tener un mayor entendimiento sobre el comportamiento de los resultados obtenidos para el compuesto biosintetizado después de los tratamientos térmicos realizados.

Como se muestra en el gráfico de la Figura 21 se obtuvo un valor promedio de 363 HV en las muestras tratadas térmicamente a 250°C, y un valor promedio de microdureza de 432 HV para las muestras tratadas a 500°C. Estos valores son característicos de materiales cerámicos [142-144], lo cual concuerda con lo esperado, pues pasamos de un material suave a un material duro. Aunque cabe aclarar que se hubiera esperado un valor promedio similar al TiO₂, en función de que esta fase es la mayoritaria en las muestras biosintetizadas, sin embargo, el tamaño de partícula también tiene un efecto en esta propiedad, pues al tener un tamaño de partícula en nanoescala se tendría una mayor dureza del material [140-142].

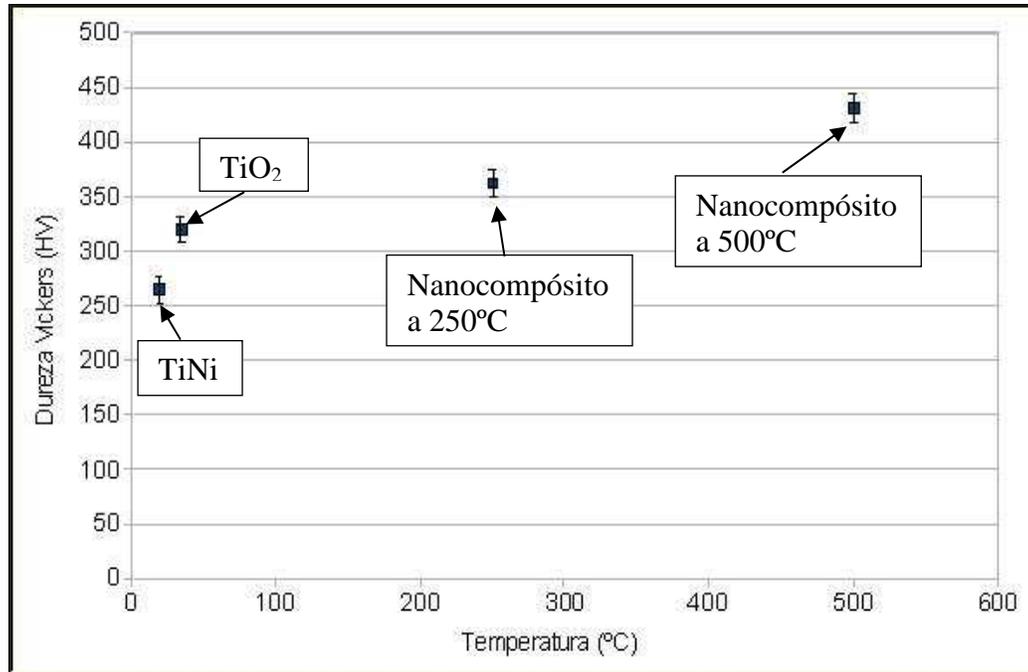


Figura 21. Gráficas de microdureza Vickers para el material obtenido por biosíntesis tratadas térmicamente a 250°C y 500°C, también se muestran microdurezas para TiNi [88] y TiO₂ [145] sinterizados.

4.3.8 Análisis de Bioestabilidad

Las muestras sinterizadas fueron sometidas a análisis de bioestabilidad para determinar su potencial aplicación como biomaterial, con el fin de inferir acerca de los cambios estructurales que sufre el compuesto después de haber sido expuesto a suero fisiológico. La Figura 22 muestra los resultados del análisis por FTIR de las muestras sinterizadas.

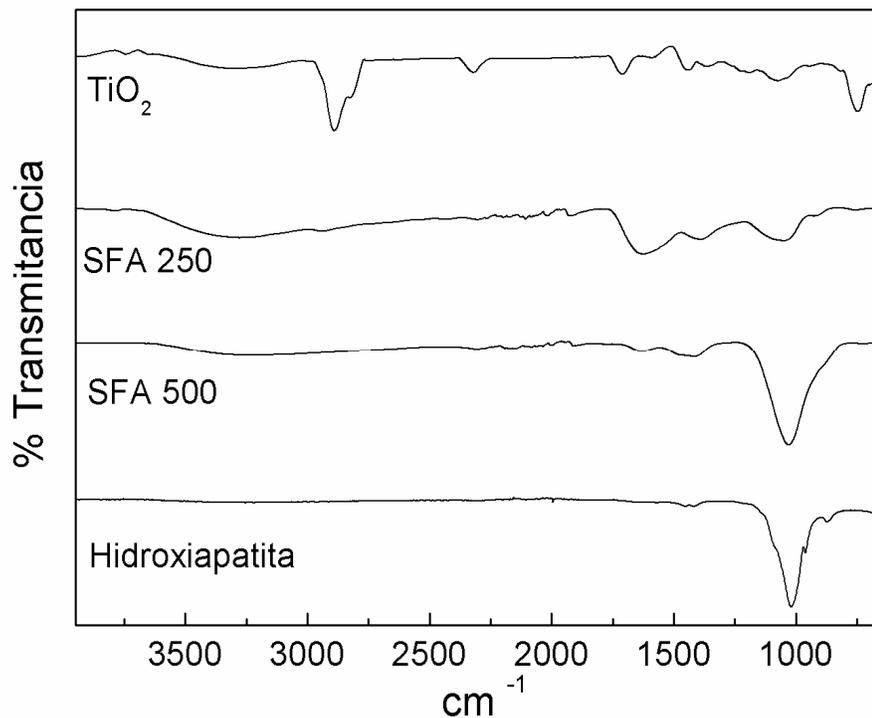


Figura 22. Espectros de FTIR para muestras del compósito sinterizado a 250°C (SFA 250) y 500°C (SFA 500) después del contacto con el suero fisiológico, TiO₂ e hidroxiapatita.

El análisis se realizó sobre muestras del compósito sinterizado a 500°C y 250°C, identificados como SFA 500 y SFA 250 respectivamente, después de estar en contacto con el suero fisiológico durante 7 días, siguiendo con el procedimiento reportado en literatura por De Aza y cols [89-90] y propuesto en la sección 3.8.9 del capítulo 3 de esta tesis. Además, se agregaron en la Figura 22 los espectros para TiO₂ e hidroxiapatita. Para la hidroxiapatita, los datos para el espectro se obtuvieron de la base de datos del equipo. En el caso del TiO₂, se realizó un análisis para TiO₂ comercial marca DEGUSA el cual es una mezcla 70:30 anatasa – rutilo.

Para su análisis y la clarificación del espectro se realizó un suavizado de la curva de acuerdo al método Savitzky – Golay con regresión de segundo orden y ventana de 101 puntos.

Se pueden obtener evidentes diferencias de estos espectros. En primer lugar, se observa que la muestra SFA 500, la cual corresponde al compósito sinterizado a 500 °C, presenta señales características a la hidroxiapatita, lo cual se evidencia por la señal que se presenta cerca de los 1000 cm⁻¹. Además, se pueden observar señales entre los 1300 -1800 cm⁻¹ las cuales concuerdan con señales del TiO₂, éstas presentan bajo porcentaje de transmitancia. Lo anterior indica, que tal y como lo reportado en literatura [90], la muestra al estar en contacto con el suero fisiológico presenta una reacción de oxidación que permite la aparición de la hidroxiapatita sobre la superficie expuesta. Por lo que el compósito sinterizado a 500 °C es deseable para su aplicación médica, ya que permite la formación de compuestos con alta compatibilidad en ambientes semejantes a los presentes en organismos vivos [89-90].

En el caso de las muestras sinterizadas a 250 °C se pueden observar en su mayoría señales que corresponden al espectro del TiO₂, con una señal de baja intensidad para la hidroxiapatita. Lo anterior, se puede traducir en un grado de conversión menor para esta muestra comparándola con su similar sinterizada a 500 °C. Esto pudiera deberse a que estas muestras presentan aún contenidos de compuestos orgánicos provenientes del proceso de biosíntesis, por lo que el proceso de oxidación al que fue sometido permite primeramente el ataque y eliminación de dichos compuestos, para la posterior transformación de la superficie del compósito.

Además, como se mencionó anteriormente, el espectro de TiO_2 fue realizado para una muestra comercial que contenía una mezcla 70:30 anatasa – rutilo. El espectro de la muestra SFA 250 presenta señales similares a las del espectro para TiO_2 , por lo que se puede inferir que en la muestra identificada como SFA 250 existe también una mezcla de fases aun después del calentamiento a 250 °C. En el caso de la muestra SFA 500, se pueden observar solamente algunas señales correspondientes a TiO_2 , lo cual puede manifestar una menor cantidad de fases cristalográficas presentes. Esto indica que el tratamiento térmico transforma la anatasa presente en el sistema a rutilo.

Para corroborar los resultados obtenidos por FTIR, se realizaron análisis por Difracción de Rayos X y microscopía electrónica de barrido, para las muestras sinterizadas a 250°C y 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.

En la Figura 23 se muestra el patrón de difracción de la muestra sinterizada a 500 °C después de estar en contacto con el suero fisiológico, en donde se observan además de las reflexiones del TiO_2 y del TiNi en sus diferentes arreglos cristalográficos, las reflexiones características de la Hidroxiapatita.

La presencia de esta última fase, comprueba que el compósito sinterizado a 500°C es un material altamente inerte y con gran resistencia a la corrosión lo que lo hace ser un material biofuncional, pues permite inducir la formación de compuestos como la Hidroxiapatita que lo hace ser un material potencialmente biocompatible, por lo tanto puede ser utilizado en el área médica, para reemplazar tejidos duros que han sido severamente dañados.

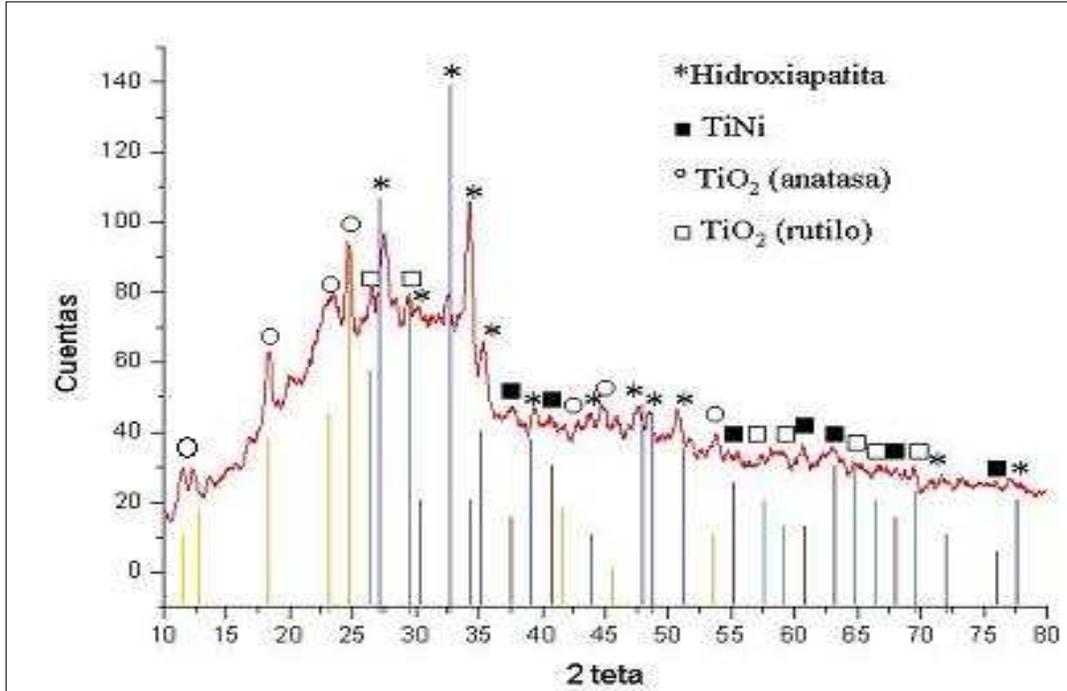


Figura 23. Espectro de difracción de Rayos X para el nanocompósito en presencia del suero fisiológico. TiO_2 (JCPDS 21-1272 y JCPDS 21-1276), TiNi (JCPDS 035-1281), hidroxiapatita (JCPDS 001-1008).

En la Figura 24 se muestra una imagen de microscopía electrónica de barrido para una muestra identificada como SFA 500. En ésta se aprecia claramente un efecto de sinterización, además de mostrar fases con morfología de agujas, característico de la hidroxiapatita [146-147].

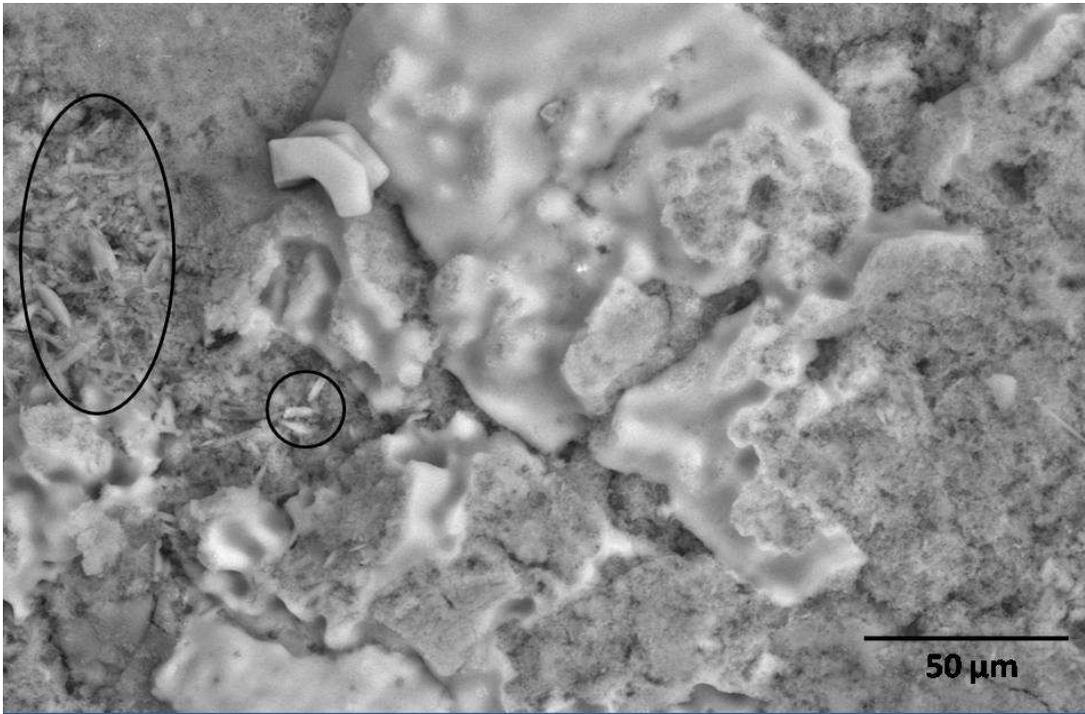


Figura 24. Micrografía de FESEM para la muestra SFA 500, nanocompósito calcinado a 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.

Para corroborar esto se realizó un microanálisis por EDS sobre esta muestra, cuyo espectro se muestra en la Figura 25, en éste es posible identificar como elementos mayoritarios al fósforo y calcio, los cuales conforman el compuesto químico de hidroxiapatita, también se denotan las reflexiones para los elementos metálicos de Ti y Ni.

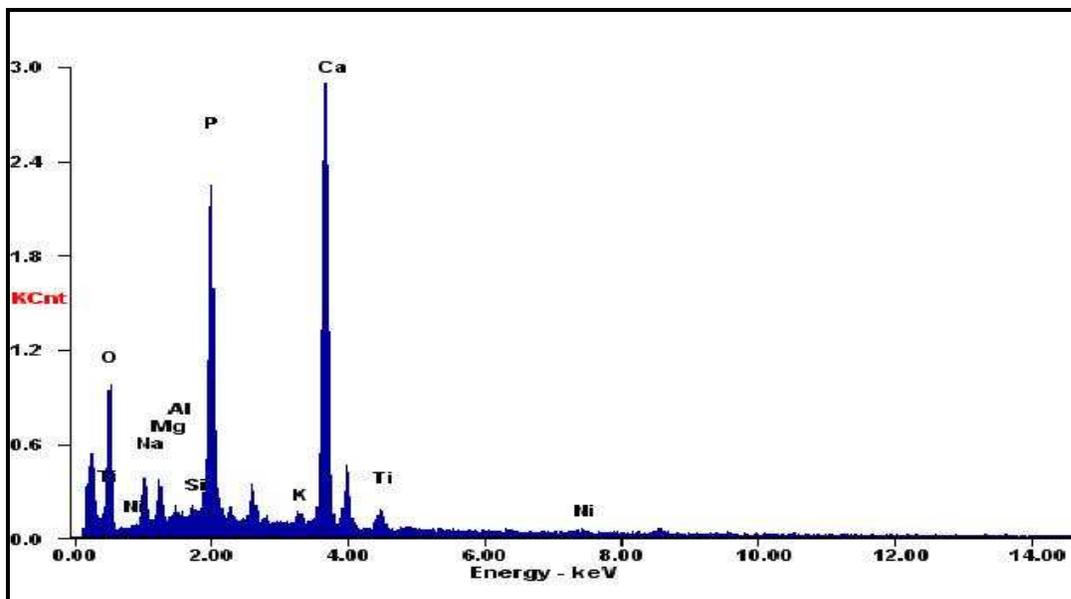


Figura 25. EDS para la muestra SFA500, nanocompósito calcinado a 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.

Estos resultados complementan lo analizado y discutido para estas muestras por FTIR y DRX. Además de los análisis anteriormente mencionados, también se realizó el análisis de la distribución de los metales Ti y Ni para comprobar la formación del compuesto de $\text{TiO}_2\text{-TiNi}$.

En la figura 26 se muestra la distribución de Ti y Ni en el material obtenido a 500°C, en ésta se aprecia a los metales en el material sintetizado y sinterizado, lo que nos permite concluir de nueva cuenta que el compuesto de $\text{TiO}_2\text{-TiNi}$ fue obtenido y es estable bajo condiciones de potencial aplicación como biomaterial.

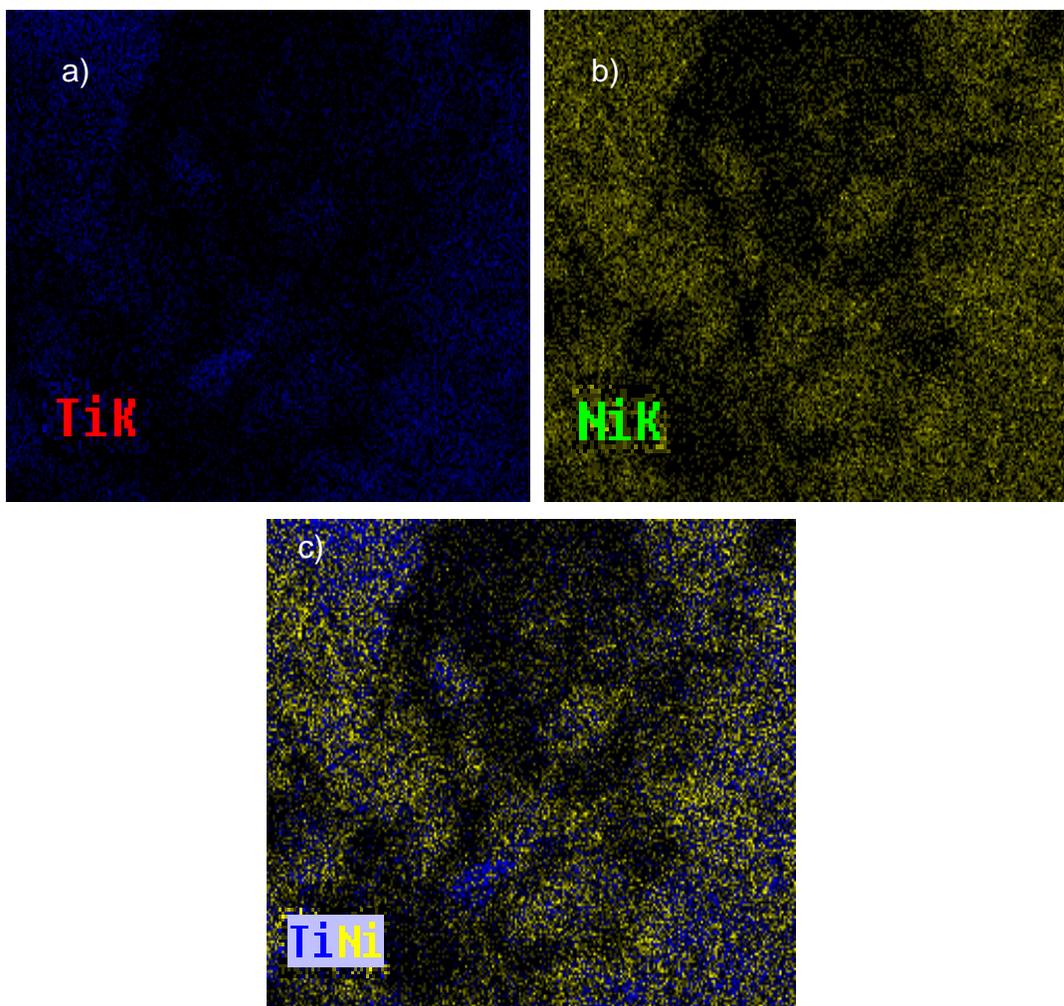


Figura 26. Imágenes de la distribución de los metales Ti y Ni para la muestra SFA 500, nanocompósito sinterizado a 500°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.

En la Figura 27 se presenta un espectro de difracción de rayos X para una muestra sinterizada a 250 °C después de estar en contacto con el suero fisiológico. En éste se aprecian las reflexiones tanto del TiO_2 y TiNi , encontrándose que hay una mayor proporción de TiO_2 en su fase anatasa, así también se puede apreciar la aparición de algunas reflexiones de la Hidroxiapatita. Una característica importante de este espectro es la obtención de picos más anchos lo que nos permite inferir que todavía se encuentran presentes compuestos orgánicos provenientes del suero fisiológico.

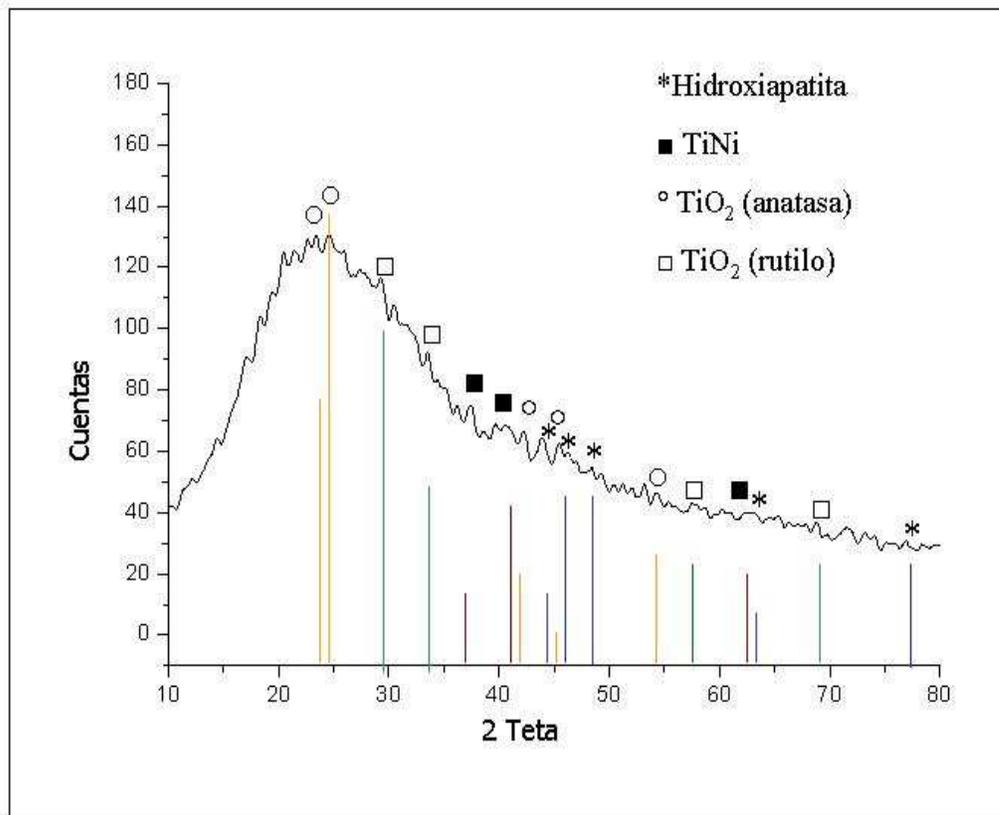


Figura 27. Espectro de difracción de Rayos X para el nanocompósito en presencia del suero fisiológico. TiO_2 (JCPDS 21-1272 y JCPDS 21-1276), TiNi (JCPDS 035-1281), hidroxiapatita (JCPDS 001-1008).

En la Figura 28 se muestra una imagen de FESEM sobre una muestra tipo SFA 250. En ésta se aprecia una superficie más difusa, con algunas estructuras tipo esféricas, otras de tipo poligonal y en general se aprecia la conformación de diversas fases. Con la finalidad de identificar las fases presentes se realizó un microanálisis elemental, en la Figura 29 se muestra este espectro. En éste se observa que existe una mayor proporción del TiO_2 en comparación con la Hidroxiapatita, por lo que se corroboró lo obtenido por DRX y FTIR, evidenciando la presencia de una gran cantidad de nanocompósito y una pequeña proporción de la Hidroxiapatita.

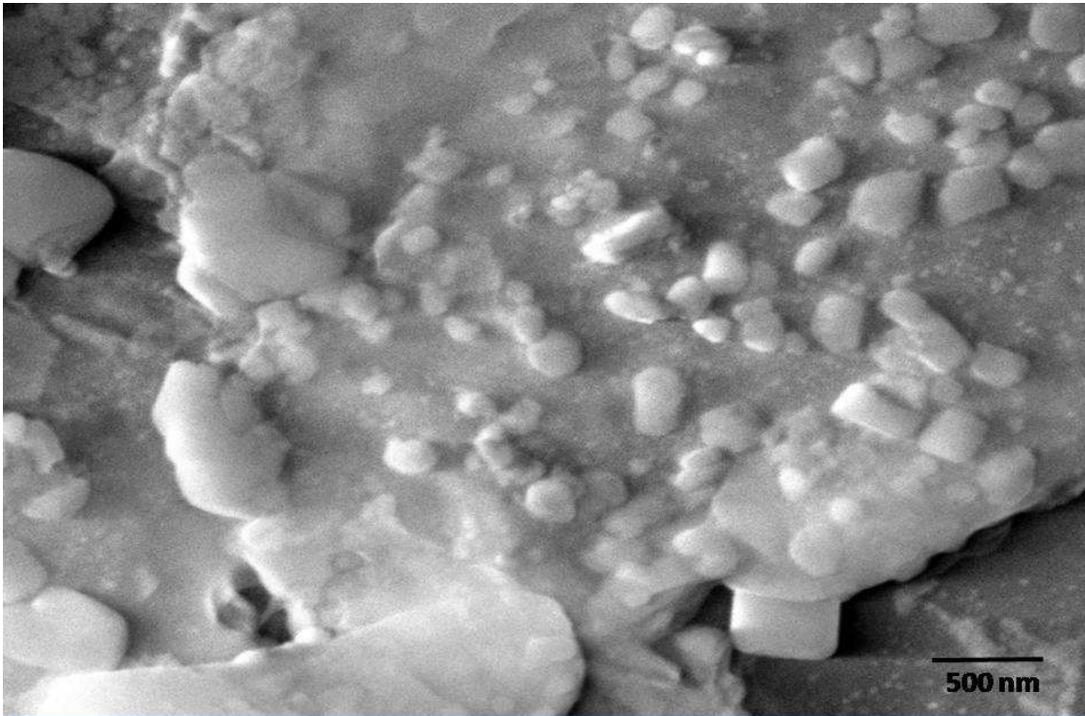


Figura 28. Micrografía de FESEM para una muestra tipo SFA250 después de estar en contacto con el suero fisiológico.

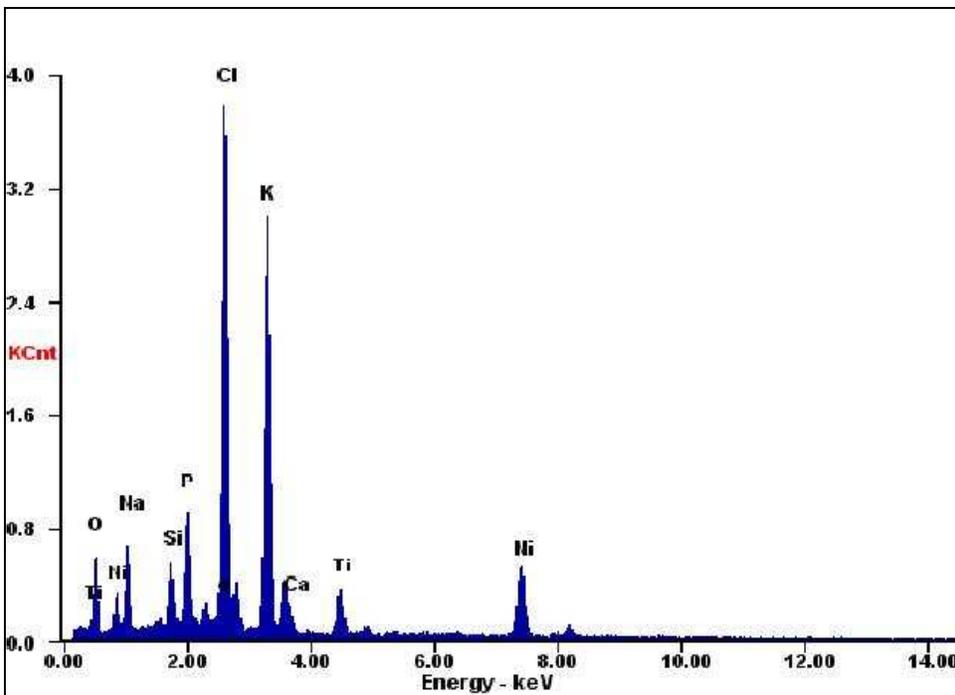


Figura 29. EDS para una muestra tipo SFA 250 después de estar en contacto con el suero fisiológico.

Así mismo, en la Figura 30 se muestra el análisis de la distribución de los compuestos presentes en el material obtenido a 250°C. En ésta se aprecia mayoritariamente la presencia de Ti a comparación de la distribución del Ni, lo que nos indica que a esta temperatura se obtiene mayoritariamente las fases del compuesto de interés y en menor proporción la composición de los metales que conforman la Hidroxiapatita. Todo lo anterior, nos indica que el material sinterizado a 500°C es el que presentó una mayor cantidad de Hidroxiapatita, por lo que es el material con mayor potencial para ser utilizado como un biomaterial.

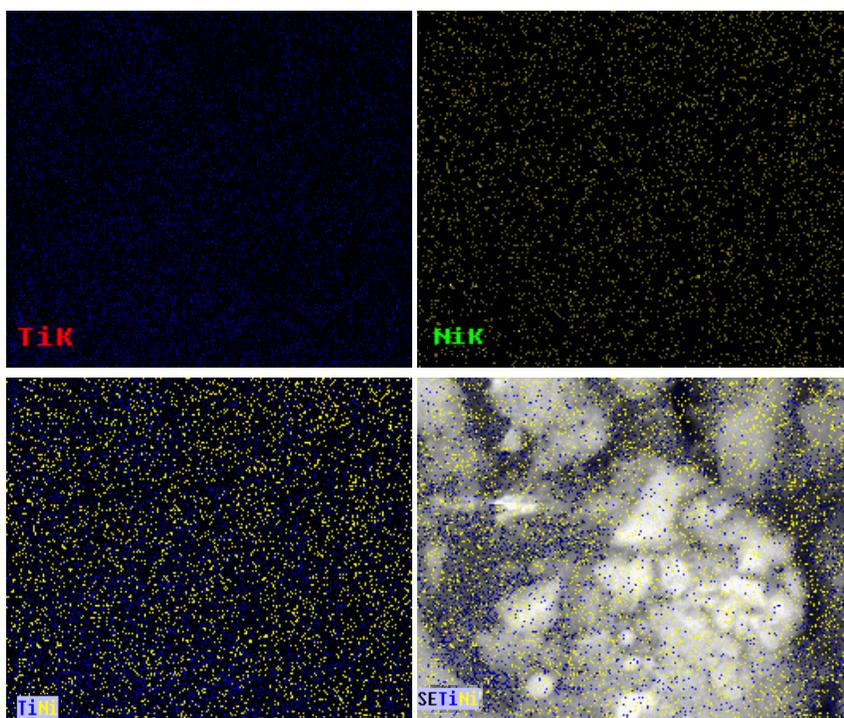


Figura 30. Imágenes de la distribución de los metales Ti y Ni para la muestra SFA 250, nanocompuesto sinterizado a 250°C después de estar en contacto con el suero fisiológico.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Se obtuvieron las fases de TiO_2 y TiNi a partir de un proceso de biosíntesis por medio de *Penicillium* sp.

El análisis de espectros de infrarrojo sobre la biomasa utilizada no muestra ninguna variación antes y después de la síntesis lo que indica que no existe evidencia de algún proceso alterno durante la síntesis, además de ser un proceso extracelular.

El análisis por UV-Vis muestra corrimiento en bandas de absorción hacia longitudes de onda menores, características de la fase TiO_2 en escala nanométrica.

El análisis por difracción de rayos X muestra la obtención de fases de TiO_2 , TiNi , NiO , Ti y Ni en las muestras realizadas con K_2TIF_6 y $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$.

El análisis por difracción de rayos X para las muestras obtenidas bajo condiciones de K_2TiF_6 y $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ muestra las reflexiones características para el TiNi encontrándose una mayor proporción la fase martensita, teniéndose un tamaño promedio de partícula de 14.2 nm y de TiO_2 de 21.15 nm.

El nanocompósito obtenido presentó microdurezas de 363 HV y 432 HV a temperaturas de 250 y 500°C respectivamente característico de materiales cerámicos.

Las micrografías de Fuerza Atómica comprueban la producción del nanocompósito con morfología esférica y tamaño de partícula de 80 - 120 nm.

Las micrografías de FESEM corroboran que la síntesis del nanocompósito se llevo a cado satisfactoriamente, mostrando que se tienen morfologías octaédricas en el caso de TiO₂ y esféricas para el TiNi.

Los análisis de DRX, FESEM y EDS realizados con el aminoácido L-Cisteína corroboran que el microorganismo biosintetizó satisfactoriamente el nanocompósito de TiNi-TiO₂ por medio de un proceso enzimático extracelular.

Los ensayos de bioestabilidad demuestran que el nanocompuesto calcinado a 250°C sintetiza en mayor cantidad la Hidroxiapatita la cual lo hace ser biocompatible y apto para ser utilizado en el área de la medicina.

Se determinó que el hongo *Penicillium* sp es capaz de biosintetizar nanopartículas de TiNi y TiO₂ bajo las condiciones utilizadas en este trabajo siendo este una alternativa sustentable para la síntesis de nanocompuestos.

CAPITULO 6

RECOMENDACIONES

Llevar a cabo la optimización del proceso de biosíntesis evaluando factores como la concentración del metal, temperatura, tiempo de reacción mediante el método Taguchi (2)³.

Realizar una voltamperometría cíclica para evaluar los procesos oxidativos de los compuestos orgánicos presentes en el microorganismo.

Efectuar estudios de biocompatibilidad de las partículas obtenidas en seres vivos a fin de utilizarlas como un biomaterial en el campo de la medicina.

REFERENCIAS

1. Abraham, G.; González, M.F.; Cuadrado, T.R.; **Hacia nuevos biomateriales: Aportes desde el campo de la Química Macromolecular.** *Anales de la Real Sociedad Española de Química.* 2001 pp 1-11.
2. Hench, L.L.; Splinter, R.J.; Allen, W.C.; Greenlee, T.K.; **Bonding Mechanism at the interface of ceramic prosthetic materials.** *J. Biomed. Mat. Res. Symp.* 1971. Vol. 2 No. 1 pp 117-141.
3. Vallet-Regís, M.; **Biomateriales para sustitución y reparación de tejidos.** *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2001. Vol. 2 pp 97-102.
4. Climent-Montouli, F.; **BIOMATERIALES I. Clasificación de los Materiales.** *Rev. R. Acad. Med. Catalunya.* 2006. Vol. 8 No. 3 pp 139-151.
5. Valdes, B.; Schorr, M.; Valdes, E.; Carballido, M.; **BIOMATERIALES para la rehabilitación del cuerpo humano.** *Ciencia y Desarrollo.* 2005.pp 1-10.
6. Vallet-Regís, M.; **Ceramics for medical applications.** *J. Chem. Soc. Dalton.* 2001. pp 97-108.

7. Arcos, D.; del Real, R.P.; Vallet-Regís, M.; **A Novel Bioactive and Magnetic Biphasic Material.** *Biomaterials*. 2002. Vol. 23 pp 2151-2158.
8. Messeguer-Olmo, L.; Ros-Nicolás, M.J.; Clavel-Sainz, M.; Ortega, V.; Alcaraz, M.; Lax-Pérez, A.; Arcos, D.; Rangel, C.V.; **Biocompatibility and in vivo Gentamicin Release from Bioactive Sol-Gel Glass implants.** *J. Biomed. Mat. Res.* 2002 pp 458-465.
9. *Davis, J.R.; Handbook of Materials for medical Devices, ASM Publications 2003.*
10. Méndez, J.N.; **Biomateriales: por un mayor promedio de vida.** *Ciencia y Desarrollo* 2004.
11. Park, J., **Biomaterials science and engineering.** *New York: Plenum Press.* 1994.
12. Boretos, J.W.; Eden, M.; **Contemporary biomaterials: Materials and host response, clinical applications, new technology and legal aspects.** *New Jersey: Noyes.* 1984.
13. Moreno, B.; Carballo, M.; Jurado, J.R.; Chinarro, E.; **Una revisión del uso del TiO₂ en terapias e ingeniería tisular.** *Bol. Soc. Ceram. V.* 2009. No.6 pp 321-328.

14. Sandoval, E. P.; Quiñones, A. D.; Tirado, J. M.; Hernández, H. J.; Prieto, D. G.; Santos, G. R.; **Application of HAP-200® coralline porous hydroxyapatite with antibiotics in tibia osteomyelitis.** *Revista Cubana de Ortopedia y Traumatología.* 2010, Vol. 24 Issue 1, p 1-11.
15. Bannister, M; Shercliff, H.; Bao, G.; Zok, F.; Ashby, M. F.; **Toughening in brittle systems by ductile bridging ligaments.** *Acta Metallurgica et Materialia.* 1992 Vol. 40, pp 1531-1538 .
16. Knepper, M.; Moricca, S.; Milthorpe, B.K.; **Stability of hydroxyapatite while processing short fibre reinforced hydroxyapatite ceramics.** *Biomaterials.* 1997.
17. Krstic, V.D.; **On the fracture of brittle-matrix/ductile-particle composites** *Philosophical Magazine A,* 1983 Vol. 48, pp 695-708.
18. Fernández-Aragón J.; **Desarrollo y Caracterización de un Biomaterial capaz de sustituir el Tejido Óseo y liberar Cefalexina simultáneamente.** *Revista CENIC Ciencias Químicas.* 2008, Vol. 39 Issue 2, p94-95.
19. Ryhänen, J.; **Biocompatibility evaluation of nickel-titanium shape memory metal alloy.** *Thesis of Master, University of Oulu, Finland.* 1999.

20. Anyango, J. O.; Duneas, N.; Taylor, J. R. N. and Taylor, J.; **Physicochemical Modification of Kafirin Microparticles and Their Ability To Bind Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2), for Application as a Biomaterial.** *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (34), pp 8419–8426.
21. Schorrer, M.; Valdes, B.; **Alloys repair the human body.** *Stainless Steel World.* 1999.
22. Valdes, B.; **Corrosion of Koper contraceptive intrauterine implants.** *Corrosion Reviews 2003 Vol. 21 pp 2-3.*
23. Been, J.; Grauman, J. S.; **Titanium and titanium alloys.** *Uhlig's Corrosion Handbook 2nd ed. R.W. Revie Ed, Jhon Wiley and Sons Inc 2000.*
24. Van Kooten, T.G.; Klein, C.L.; Kirkpatrick, C.J.; Williams, D.F.; Eloy, R.; **Citotoxicity to biocompatibility testing in vitro.** *J. of Mat. Sci. : Matrerials in Medicine.* 1997 Vol. 8 pp 835-841.
25. Gil, F.J.; Ginebra, M.P. Planell, J.A.; **Metales y aleaciones para la substitución de tejidos duros.** *Biomecánica,* 1999 Vol. 13 pp 73-78.
26. Constantz, B.; Ison, I.; Fulner, M.; **Skeletal Repair by in Situ Formation of the Mineral Phase of Bone.** *Science* 1995 Vol. 267 pp 1796-1799.

27. Thamaraiselvi, T.V.; Rajeswari, S.; **Biological Evaluation of Bioceramic Materials. A review.** *Trends Biomater.* 2004 Vol. 18 pp 9-17.
28. Avivi-Arber, L.; Zarb, G.A.; **Clinical effectiveness of implant-supported single-tooth replacement: The Toronto study.** *Int J. Oral. Maxillofac Impl.* 1996 Vol 11 pp 311-321.
29. Martínez, H. R.; Abdala, H. M.; Treviño, E, Garza, G.; Pozas, A.; Rivera, G.; **Application of nanotechnology in dentistry: Nano-Dentistry.** *CES Odontología.* 2011, Vol. 24 Issue 2, p87-91.
30. Brown, S.A.; Lemons, J.E.; Mateo, N.B.; **New products and standards. In: Biomaterials science; an introduction to materials in medicine.** *Academic Press. San Diego* 1996 pp 457-466.
31. Michiardi, A.; **Nuevo Tratamiento de oxidación en aleaciones de TiNi para aplicaciones biomédicas. Caracterización superficial y respuesta biológica *in vitro*.** *Tesis de Doctorado, Universidad de Catalunya, 2005.*
32. Liu, X.;Chu, P.K.; Ding, C.; **Surface modification of titanium alloys, and related materials for medical applications.** *Materials Sciences and Engineering.* 2004. Vol.4 pp 49-121.

33. Mihálcz, I.; *Fundamental Characteristics and Design Method for Nickel-Titanium shape memory alloy*. *Periodica Polytechnica Ser. Mech. Eng.* 2001. Vol. 45 No.1 pp 75-86.
34. Ozeki, K.; Yutha, T.; Aoki, H.; Asaoka, T.; Daisaku, T.; Fukui, Y.; *Deterioration in the superelasticity of Ti sputter coated on NiTi orthodontic wire*. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 2003. 13, pp 355-362.
35. Kang, S.B.; Yoon, K.S.; Nam, T.H.; Kim, J.S.; Gjunter, V.E.; *Fracture Treatment Using TiNi Shape Memory Alloy Bone Fixater (BRM-SH System)*. *Materials Transactions*. 2002. Vol. 43, No. 5 pp 1049-1051.
36. Khodorenko, V.N.; Gyunter, V.É.; Monogenov, A.N. Yasenchuk, Y.F.; *Exothermal an Endothermal Effects in Porous Titanium-Nickel Alloys*. *Technical Physics Letters*. 2001. Vol. 27, No. 11. pp 80-85.
37. Buehler, W.J., Wang, F.E.; *A summary of recent research on the Nitinol alloys and their potential application in ocean engineering*. *Ocean Eng* 1968 .1: 105-120.
38. Funakubo H.; *Shape memory alloys*. *Gordon and Breach Science Publishers, New York*, 1987.

39. Kumar SA, Ayoobul AA, Absar A, Khan MI; *Extracellular biosynthesis of CdSe quantum dots by the fungus, Fusarium oxysporum. J. Biomed. Nanotechnol.* 2007b. 3 190–194.
40. Otsuka, K.; Wayman, C.M.; *Mechanism of shape memory effect and superelasticity. In: Otsuka K & Wayman CM (eds) Shape memory materials, Cambridge University Press, Cambridge, 1998n p 27-48.*
41. Andreasen, G.F.; Fahl, J.L.; *Alloys, Shape Memory. In: Webster JG (ed.) Encyclopedia of medical devices and instrumentation, Wiley, New York 1987 Volume 2 p 15-20.*
42. Gil, F.J., Planell, J.A.; *In vitro thermomechanical ageing of Ni-Ti alloys. J. Biomater. Appl.* 1998 Vol. 12 pp 237-248.
43. Moneim, M.S.; Firoozbakhsh, K.; Mustapha, A.A.; Larsen, K.; Shahinpoor, M.; **Flexor tendon repair using shape memory alloy suture: a biomechanical evaluation.** *Clin Orthop* 2002 Vol. 402 pp 51-259.
44. Shabalovskaya S.A.; *On the nature of the biocompatibility and on medical applications of NiTi shape memory and superelastic alloys. Biomed. Mater. Eng.* 1996 Vol. 6 pp 267-289.

45. Otsuka, K.; Ren X.; **Martensitic Transformations in non ferrous shape memory alloys.** *Material Science and Engineering.* 1999 pp 89-105.
46. Melton, K.N.; **Ni-Ti based shape memory alloys.** *Metallurgy of shape Memory Materials* 1983 pp 21-35.
47. Nagarajan R. and Chattopadhyay K.; **Intermetallic Ti₂Ni/TiNi nanocomposite by rapid solidification.** *Acta Materialia* 1994 Vol. 42, 947-958.
48. Morawiec, H.; Stróz, D.; Goryczka, T.; Chrobak, D.; **Two-stage martensítica transformation in a deformed and annealed NiTi alloy.** *Scripta Materialia.* 1996 Vol. 35 pp 485-490.
49. Nishiyama, Z.; **Martensitic Transformation.** Academic Press 1978.
50. Nishida, M.; Wayman, C.M.; Honma, T.; **Precipitation processes in near equiatomic TiNi shape memory alloys.** *Metallurgical Transactions.* 1986 Vol. 17 pp 1505-1515.
51. McCormick P.G.; Liu Y.; **Thermodynamic analysis of the martensitic transformation in NiTi. -II. Effect of transformation cycling.** *Acta Metallurgica et Materialia* 1994 Vol. 42, pp 2407-2413.
52. Sandrock, G.D.; Perkins A.J.; Hehemann R.F.; **The premartensitic instability in near-equiatomic TiNi.** *Metallurgical Transactions* 1971 Vol. 2, pp 2769-2781 .

53. Hara, T.; Ohba, T.; Otsuka, K.; *Structural study of the R-phase in Ti-Ni alloy by the Rietveld method. Journal de Physique* . 1995 **IV-C2**, pp 641-645.
54. Miyazaki, S.; Otsuka, K.; *Deformation and transition behavior associated with the R-phase in Ti-Ni alloys. Metallurgical Transactions* 1986 **Vol. 17A**, pp 53-63.
55. Liu Y., Chen X. and McCormick P.G.; *Effect of low temperature ageing on the transformation behaviour of near-equiatomic NiTi. Journal of Materials Science* 1997, **Vol. 32**, 5979-5984.
56. Saburi T.; *Ti-Ni shape memory alloys and martensitic transformations. Proceedings of ICOMAT-92, Monterey Institute for Advanced Studies, Monterey-California (USA), 1993* pp 857-868 .
57. Moberly W.J. and Melton K.N.; *Ni-Ti-Cu shape memory alloys en Engineering aspects of shape memory alloys, Ed. T.W. Duerig, K.N. Melton, D. Stöckel y C.M. Wayman, Butterworth-Heinemann Ltd., 1990. pp 46-57*
58. Prokoshkin, S.D.; Brailovskii, V.; Khmelevskaya, I.Y.; Dobatkin, S.V.; Inaekyan, K.É.; Turilina, V.Y.; Demers, V.; Tat'yanin, E.V.; *Creation of substructure and nanostructure in thermomechanical treatment and control of functional properties of Ti-Ni alloys with shape memory effect. Metal Science and Heat Treatment. 2005. Vol. 47, Nos. 5-6 pp 182-187.*

59. Pfeiffer KM, Brennwald J, Buchler U, Hanel D, Jupiter J, Lowka K, Mark J & Staehlin P
Implants of pure titanium for internal fixation of the peripheral skeleton. *Injury* (1994)
Vol.25, pp 87-89.
60. Diebold, U.; **The surface science of titanium dioxide.***Surf. Sci. Rep* 2003 Vol.48 pp 53-
229.
61. Kleiman, A.; Vera. M.L.; Márquez, A.; Litter, M.; **Estudio de la actividad fotocatalítica
de películas de dióxido de titanio en fase Anatasa.** *Suplemento de la Revista
Latinoamericana de Metalurgia y Materiales.* 2009 SI VOL. 3 pp 1017-1021.
62. Branemark, P.J.; Adell, R.; Albrektsson, T.; Lekholm, U.; Lundkvist, S.; Rockler, B.;
Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials*
1983 Vol. 4 pp 25.
63. Mendoza-Anaya, D.; Salas, P.; Ángeles-Chávez, C.; Pérez-Hernández, R.; Castaño,
V.M.; **Caracterización microestructural y morfología de TiO₂ para aplicaciones
termoluminiscentes.** *Revista Mexicana de Física* 50 Suplemento 1 2004 pp 12-16.
64. Tang, H.; Prasad, K.; Sanjinés, R.; Schmid, P.E.; Lévy, F.; **Electrical and optical
properties of TiO₂ anatase thin films.** *J. Appl. Phys.* 1994 Vol. 75 pp 2042.

65. *Mardare, D.; Stancu, A.; On the optical constants of TiO₂ thin films. Ellipsometric studies. Mat. Res. Bull. 2000 Vol. 35 pp 2017*
66. *Mardare, D.; Optical constants of heat-treated TiO₂ thin films. Mat. Sci. Eng. B 2002 Vol. 95 pp 83.*
67. *Moret, M.P.; Zallen, R.; Vijay, D.P.; Desu, S.B.; Brookite-rich titania films made by pulsed laser deposition. Thin Solid Films. 2000 Vol. 366 pp 8.*
68. *Ha, H.K.; Yoshimoto, M.; Koinuma, H.; Moon, B.K.; Ishiwara, H.; Open air plasma chemical vapor deposition of highly dielectric amorphous TiO₂ films. Appl. Phys. Lett. 1996 Vol. 68 pp 2965.*
69. *Ma, W.; Lu, Z.; Zhang, M.; Investigation of structural transformations in nanophase titanium dioxide by Raman spectroscopy. Appl. Phys. A 1998 Vol. 66 pp 621.*
70. *Shannon, R.D.; Pask, J.A.; Kinetics of the anatasa-rutile transformation. J. Am. Cer. Soc. 1965 Vol. 68 pp 391.*
71. *Won, D.J.; Wang, C.H.; Jang, H.K.; Choi, D.J.; Effects of thermally induced anatasa-to-rutile phase transition in MOCVD-grown TiO₂ films on structural and optical properties. Appl. Phys. A 2001 Vol. 73 pp 595.*

72. Tilley, R.J.D.; **Colour and the Optical Properties of Materials.** John Wiley and Sons Ltd. Chichester, 2000.
73. McLeod, H.A.; **Thin-Film Optical Filters.** Adam Hilger Ltd. London 1969.
74. Miyayama, M.; Koumoto, K.; Yanagida, H.; **Engineering Materials Handbook 4.** ASM-International, USA. 1991 pp 748.
75. Ha, H.K.; Yoshimoto, M.; Koinuma, H.; Moon, B.K.; Ishiwara, H.; **Open air plasma chemical vapor deposition of highly dielectric amorphous TiO₂ films.** *Appl. Phys. Lett.* 1996 Vol. 68 pp 2965.
76. Samara, G.A.; Percy, P.S.; **Pressure and temperature dependence of the static dielectric constants and Raman spectra of TiO₂ (rutile).** *Phys. Rev. B* 1973 Vol. 7 pp 1131.
77. Chambers, S.A.; Droubay, T.; Wang, C.M.; Lea, A.S.; Farrow, R.F.C.; Folks, L.; Deline, V.; Anders, S.; **Clusters and magnetism in epitaxial Co-doped TiO₂ anatase.** *Appl. Phys. Lett.* 2003 Vol. 82 pp 1257.
78. Cantao, M.P.; Cisneros, J.I.; Torresi, R.M.; **Electrochromic behaviour of sputtered titanium oxide TiNi films.** *Thin Solid Films.* 1995 Vol. 259 pp 70.

79. Yoshimura, K.; Miki, T.; Tanemura, S.; **TiO₂ electrochromic TiNi films by reactive direct current magnetron sputtering.** *J. Vac. Technol. A* 1997 Vol.15 pp 2673.
80. Peng, L.; Eltgroth, M.L.; LaTempa, T.J.;Grimes, C.A.; Desai, T.A.; **The effect of TiO₂ nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation.** *Biomaterials*. 2009. Vol. 7 No. 30 pp 1268-1272.
81. Facchini, G.; Carturan, G.; **Sol-Gel Synthesis and Characterisation of TiO₂-Anatase Powders Containing Nanometric Platinum Particles Employed as Catalysts for 4-Nitrophenol Photodegradation.** *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 2000. Vol. 18 pp 29-59.
82. Gao, Y.; Li, M.K.; **Sol-Gel Template Synthesis and Photocatalytic Activity of TiO₂ Nanofibrils Loaded on Al₂O₃ Template.** *Chinese Chemical Letters* 2002 Vol. 13, No. 11, pp 1115 – 1118.
83. Hafizah, N.; Sopyan, I.; **Nanosized TiO₂ Photocatalyst Powder via Sol-Gel Method: Effect of Hydrolysis Degree on Powder Properties.** *International Journal of Photoenergy*. 2009 pp 1-9.
84. Hwan-Han, C. Lee, H.S.; Han, S.D.; **Synthesis of Nanocrystalline TiO₂ by Sol-Gel Combustion Hybrid Method and Its Application to Dye Solar Cells.** *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008, Vol. 29, No. 8 1495-1500.

85. Karami, A.; *Synthesis of TiO₂ Nano Powder by the Sol-Gel Method and Its Use as a Photocatalyst*. *J. Iran. Chem. Soc.*, 2010. Vol. 7, pp. 154-160.
86. Layton, E.; *Fabrication and characterization of porous NiTi shape memory alloy by elevated pressure sintering*. *Thesis of Master Science*. University of Texas, USA 2002.
87. Gyunter, V.É.; Khodorenko, V.N.; Monogenov, A.N.; Yasenchuk, Y.F.; *Effect of Deformation on the Permeability of Porous Titanium-Nickel Alloys*. *Technical Physics Letters*. 2000. Vol. 26, No. 4 pp 320-322.
88. Da Silva, M.M.; Da Silva, N.J.; Gomes, A.A.; Reis, R.P.B.C.; de Araujo, C.J.; Dos Santos, M.A.; *Aplicação de uma liga base TiNi com memoria de forma visando aplicações em conexoes de tubulações na industria do petroleo e gás*. *Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciencias dos Materiais*, 2006. Foz do Iguaçu, PR, Brasil.
89. De Aza, P.N.; Luklinska, Z.B.; *Efecto de la microestructura sobre la bioactividad de dos vitrocerámicos del sistema CaSiO₃-ZrO₂*. *Bol. Soc. Esp. Cerám. Vidrio* 2003. No.2 pp 101-106.
90. De Aza, P.N.; De Aza A.H.; De Aza, S.; **Crystalline bioceramic materials**. *Bol. Soc. Esp. Ceram. V*. 2005. Vol. 44 No. 3 pp 135-145.

91. Schubert, U.; Hüsing, N.; **Synthesis of Inorganic Materials.** WILEY-VCH Verlag GmbH Weimburg 2005 pp 104-108
92. Ahmad, A.; Mandal, D.; Senapati, S.; Khan, I.; Kumar, R.; Sastry, M.; **Extracellular Biosynthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles by a Novel Extremophilic Actinomycete, *Thermomonospora* sp.** *Langmuir*. 2003. 19 pp 3550-3553.
93. Ahmad, A.; Senapati, S.; Khan, I.; Kumar, R.; Sstry, M.; **Extra-/Intracellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles by an Alkalotolerant Fungus *Trichothecium* sp.** *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005. 1 pp 47-53.
94. Bai, H.J.; Zhang, Z.M.; **Biological synthesis of semiconductor zinc sulfide nanoparticles by immobilized *Rhodobacter sphaeroides*.** *Biotechnol. Lett.* 2006. 28 pp 1135-1139.
95. Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar SR, Khan MI, Ramani R, Parischa R, Kumar PAV, Alam M, Sastry M, Kumar R; **Bioreduction of AuCl_4^- ions by the fungus, *Verticillium* sp. and surface trapping of the gold nanoparticles formed.** *Angew Chem Int Ed.* 2001a. 40 pp 3585–3588.
96. Sastry, M; Ahmad, A; Khan, M.I; Kumar, R; **Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete.** *Current Science.* 2003 85 (2) pp 162-170.

97. Senapati, S.; Ahmad, A.; Khan, M.I.; Kumar, R.; Ramami, R.; Srinivas, V.; Sastry, M.; **Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, *Rhodococcus species*.** *Nanotechnol.* 2003. 14 pp 824-828.
98. Shankar, S.S.; Ahmad, A.; Sastry, M.; **Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles.** *Biotechnol. Prog.* 2003. 19 pp 1627-1631.
99. Ankamwar, B.; Chinmay, D.; Ahmad, A., Sastry, M.; **Biosynthesis of gold and silver nanoparticles using *Emblica Officinalis* Fruit Extract, Their Phase Transfer and Transmetallation in Organic Solution.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* 2005. 5 (10) pp 1665-1671
100. Chandran, S.P.; Chaudhary, M.; Pasricha, R.; Ahmad, A.; Sastry, M.; **Synthesis of gold nanotriangles and silver nanoparticles using Aloe vera extract.** *Biotechnology Progress.* 2006. 22 (2) pp 577-583.
101. Dameron, C.T.; Reese, R.N.; Mehra, R.K.; Kortan, A.R.; Carroll, P.J.; Steigerwald, M.L.; Brus, L.E.; Winge, D.R.; **Biosynthesis of cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites.** *Nature.* 1989. 338 pp 596-597.
102. Gericke, M.; Pinches, A.; **Biological synthesis of metal nanoparticles.** *Hydrometallurgy.* 2006. Vol. 83 pp 132-140.

103. Gericke, M.; Pinches, A.; **Microbial Production of Gold Nanoparticles.** *Gold Bulletin.* 2006. Vol. 39 No. 1 pp 22-28.
104. Huang, J.; Li, Q.; Sun, D.; Lu, D.; Su, Y.; Yang, X.; Wang, H.; Wang, Y.; Shao, W.; He, N.; Hong, J.; Chen, C.; **Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried Cinnamomum camphora leaf.** *Nanotechnology.* 2007. 18 pp 105104-105114
105. Mandal, D.; Bolander, M.E.; Mukhopadhyay, D.; Sarkar, G.; Mukherjee, P.; **The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. 69 pp 485-492.
106. Mehra, R.K.; Winge, D.R.; **Metal ions resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression.** *J. Cell. Biochem.* 1991. 45 pp 30-40.
107. Stephen, J.R.; Macnaughton, S.J.; **Developments in terrestrial bacterial remediation of metals.** *Curr. Opin. Biotechnol.* 1999. 10 pp 230-233.
108. Beveridge, T.J.; Fortin, D.; **Biomineralization. From Biology to Biotechnology and Medical Applications (ed. Baeuerien, E).** Wiley-VCH, Weinheim. 2000. pp 7.
109. Klaus, T.; Joerger, R.; Granqvist, C.G.; **Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. 96 pp 13611-13614.

110. Kowshik, M.; Ashtaputre, S.; Kharrazi, S.; Vogel, W.; Urban, J.; Kulkarni, S.K.; Paknikar, K.M.; **Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3.** *Nanotechnol.* 2003. 14 pp 95-100.
111. Reese, R.N.; Winge, D.R.; **Sulfide stabilization of the cadmium- γ -glutamyl peptide complex of *Schizosaccharomyces pombe*.** *J. Biol. Chem.* 1988. 263 pp 12832-12835.
112. Kowshik, M.; Deshmukh, N.; Vogel, W.; Urban, J.; Kulkarni, S.K.; Paknikar, K.M.; **Microbial synthesis of semiconductor CdS nanoparticles, their characterization, and their use in the fabrication of an ideal diode.** *Biotechnol. Bioeng.* 2002. 78 pp 583-588.
113. Bhainsa KC, D'Souza SF; **Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigatus*.** *Colloids Surf B: Biointerf.* 2006 47:160–164.
114. Bansal V, Poddar P, Ahmad A, Sastry M; **Room-temperature biosynthesis of ferroelectric barium titanate nanoparticles.** *J Am Chem Soc.* 2006 128:11958–11963.
115. Schabes-Retchkiman, P.S.; Canizal, G.; Herrera-Becerra, R.; Zorrilla, C.; Liu, H.B.; Ascencio, J.A.; **Biosynthesis and characterization of Ti/Ni bimetallic nanoparticles.** *Optical Materials.* 2006. 29 pp 95-99.
116. Holt, J.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.; Staley, T.; Williams, T.; **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Williams and Wilkins.** *Baltimore, Maryland.* 2004.

117. Moreno, C., Cabello, P., Martínez, M., Blasco, R., Castillo, F.; **Prokaryotic and Eukaryotic Nitrate Reduction: Molecular Properties and Functional Distinction.** *J. Bacteriol.* 1999 Vol. 181, pp 6573-6584.
118. Garza, González, M. T., **Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de remover y tolerar Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II).** Tesis de Doctorado, 2005 La Habana Cuba.
119. Pradhan, S.; Ghosh, D.; Chen, S.; **Nanostructures Base don Au-TiO₂ Heterodimers and their Photocatalytic Activity in the Oxidation of Methanol.** *Applied Materials and Interface.* 2009 Vol. 1 No. 9 pp 2060-2065.
120. Zhao, Y.; Zhang, Y.; Zhu, H.; Hadjipanayis, G.C.; and Xiao, J.Q.; **Low-Temperature Synthesis of Hexagonal (Wurzite) ZnS Nanocrystals.** *Am. Chem. Soc.*, 2004, Vol. 126 No. 22, pp 6874–6875.
121. Tuesta, E.G., Gutarra, A.; **Aplicaciones electrocrómicas y fotocatalíticas del dióxido de titanio.** *REVCUNI.* 2004, Vol. 8 pp 21-45.
122. Agostiano, A.; **Synthesis and Characterization of CdS Nanoclusters in a Quaternary Microemulsion: The Role of the Cosurfactant.** *J. Phys. Chem. B.* 2000 Vol. 104 pp 8931-8937.

123. Shabalovskaya, Svetlana, R. Gianni, U. Andreas, A. James, B. Thomas, R. Markus; The electrochemical characteristics of native Nitinol surfaces; biomaterials (*elsevier*); 2009; Vol. 30; p-3662-3671.
124. Bing-Yu, L.; Rong, L. J.; Li, Y.Y.; **Fabrication of cellular NiTi intermetallic compounds.** *J. Mater. Res.* 2000 Vol. 15 No.1 pp 10-13.
125. Ling, H.C.; Kaplow, R.; **Phase transition and Shape Memory in NiTi.** *Metallurgical Transactions* 1980 Vol. 11A pp 77-83.
126. Lekston, Z.; Lagiewka, E.; **X-ray diffraction studies of NiTi shape memory alloys.** *Archives of Materials Science and Engineering.* 2007 Vol. 28 pp 665-672.
127. He, S.; Guo, Z.; Zhang, Y.; Zhang, S.; Wang, J.; Gu, N.; **Biosynthesis of gold nanoparticles using the bacteria Rhodopseudomonas capsulata.** *Materials Letters* 2007 Vol. 61 pp 3984-3987.
128. Potocki, S.; Rowinska-Zyrek, M.; Valensin, D.; Krzywoszynska, K.; Witkowska, D.; Luczkowski, M. and Kozlowski, H; **Metal binding ability of cysteine –rich peptide domain of ZIP12 Zn⁺² ions transporter.** *Inorg Chem.*2011, Vol. 50, 6135-45.
129. Desrochers, P. J.; Duong, D. S.; Marshall, A. S.; Lelievre, S. A.; Hong, B.; Brown, J. R.; Tarkka, R. M.; Manion, J. M.; Holman, G.; Merkert J. W. and Vicic, D. A.; **Nickel-**

- cysteine binding supported by phosphine chelates.** *Inorg Chem*, 2007, Vol. 46, 9221-9233.
130. L. K. D. Hynek, J. Sochor, N. Cernei, J. Kynicky, V. Adam, L. Trnkova, J. Hubalek, R. Vrba and R. Kizek; **Study of Interactions between Cysteine and Cadmium(II) Ions using Automatic Pipetting System off-line Coupled with Electrochemical Analyser Dedicated United Nation Environment Program: Lead and Cadmium Initiatives**, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2012, Vol.7, 1734 – 2709.
131. Bonnie. O. Leng. Farideh Jalilehvand, Maryam Izadifard, and Emiliana Damian; **Mercury(II) Cysteine Complex in Alkaline Aqueous Solution**. *Inorganic Chemistry* 2006 45, 66–73.
132. Maryam Ranjbar, Nasrin Shahsavan¹ and Mohammad Yousefi; **Synthesis and Characterization of Nano Structured Zinc(II) Cysteine Complex under Ultrasound Irradiation**. *American Chemical Science Journal*, 2012, Vol. 2, 111-121.
133. R. N. Patel, N. Singh, R. P. Shrivastava, K. K. Shukla and P. K. Singh,; **Potentiometric and spectrometric study: copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes with potentially tridentate and monodentate ligands**. *J Chem Sci*, 2002, 114, 115-124.
134. Shabab, M.; Vaibhav, M.; Santosh, K.; Mohammad, K.; B. Siddharth, B.; **Isolation and Phylogenetic analysis of marine fungus Penicillium sp. SDBF1 and partial characterization of its cysteine protease inhibitor**. *International Journal of advanced biotechnology and research*; 2011; Vol. 2, pp 135-142.

135. Prakash, M.; Arnold, D.; ***Impaired penicillin production in lysine regulatory mutants of penicillium chrysogenum***; Antimicrobial agents and chemotherapy; 1974; p: 366-368.
136. Ganapathi, K.; **The biosynthesis of penicillin**; Journal of Cellular and Molecular Life Sciences; 1957; Vol. 13; p 172-176]
137. N. Resnina, S.; Belyaev.; **Multi-stage martensitic transformations induced by repeated thermal cycling of equiatomic TiNi alloy.** *Journal of Alloys and Compounds* 2009 Vol. 486 pp 304–308.
138. Zheng, Y.; Li, J.; Cui, L.; **Repeatable temperature memory effect of TiNi shape memory alloys.** *Materials Letters.* 2009 Vol. 63 pp 304-308.
139. Li, Y.; Cui, L.; Zheng, Y.; Yang, D.; **DSC study of the reverse martensitic transformation in prestrained TiNi shape memory alloy in different composite.** *Materials Letters.* 2001 Vol. 51 pp 73-77.
140. Lutjering, G.; Williams, J.C.; **Titanium. Engineering Materials.** Springer 2003 pp 340.
141. Fernandez, S.; **Estudio experimental de sistemas poliméricos para recubrimientos de metales en prótesis.** *Tesis Doctoral Madrid, España 2004.*

142. Millán, L.; Agurto, C.; Marín, J.; Olivares, L.; Martínez, V.; Ordañez, S.; **evaluación de la dureza en materiales compuestos SiC-Aleaciones base Cobre, obtenidos por infiltración reactiva.** *Jornadas SAM/CONAMET/SIMPOSIO MATERIA 2003 pp 11-17.*
143. Zárate-Medina, J.; Trejo-Arroyo, D.L.; Contreras-García, M.E.; Muñoz-Saldaña, J.; **Efecto del sembrado con α -Alúmina en la caracterización Mecánica de Aglomerados Esféricos de Alúmina.** *Suplemento de la Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales. 2009 Vol.1 pp 385-391.*
144. Castrillón, M.; García, C.; Paucar, C.; **Evaluación de la Influencia del Tamaño de Partícula y el Tiempo de Tratamiento sobre las Características Físico-Mecánicas de un compuesto de Alúmina sinterizada.** *Dyna 2007 Vol. 74 No. 152 pp 159-165.*
145. Du, H.; Chen, H.; Moom, B.K.; Shin, J.H.; Lee, S.W.; **Effect of Plasma Spraying Condition on Deposition Efficiency, Microstructure And Microhardness of TiO₂ Coating.** *Journal of Material Online. 2005 Vol. 1 pp 1-12.*
146. Vijayalakshmi, U.; Rajeswari, S.; **Preparation and Characterization of Microcrystalline Hydroxyapatite Using Sol Gel Method.** *Trends. Biomater. Artif. Organs. 2006 Vol. 19 No. 2 pp 57-62*
147. Pratihari, S.K.; Garg, M.; Mehra, S.; Bhattacharyya, S.; **Phase Evolution and Sintering Kinetics of Hydroxyapatite Synthesized by Solution Combustion Technique.** *Jornal of Material Science: Materials in Medicine. 2005 pp1-24.*

148. Skoog, D.A., Leary, J.J.; **Análisis Instrumental. (4^a Edición).** Editorial McGraw-Hill, Interamericana de España, S.A., Madrid 1994 pp 935.
149. Guoshong, Cao; **Nanostructures and nanomaterials.** Imperial College Press. 2004.
150. Podorov, S.G.; Föster, E.; **Theory of X-Ray Diffraction on Asymmetric Cut and Bent Crystal.** *Phys. Stat. Sol. (b).* 2000. 220 pp 829-836.
151. West, A.R.; **Basic Solid State Chemistry.** John Wiley & Sons Ltd. 1988. pp 120-157.
152. Guerra-Vela, C.; Zypman, F.R.; **Microscopio Educativo de Fuerza Atómica.** *Journal of Materials Education.* 2000. Vol. 22 No. 1-3 pp 34-38.
153. Ralston, J.; Larson, I.; Rutland, M.W.; Feiler, A.A.; Kleijn, M.; **Atomic Force Microscopy and Direct Surface Measurements.** *Pure Appl. Chem.* 2005. 77 (12) pp 2149-2170.
154. Goodhew, P.J.; Humphreys, F.J.; **Electron Microscopy and Analysis. 2a. Edición.** Taylor and Francis, London 1988 pp 232.
155. Yacamán, M.J.; Reyes, J.; **Microscopía Electrónica. Una visión del microcosmos.** Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 1995 pp 143.
156. Barnett, H.L.; Hunter, B.B.; **Illustrated Genera of Imperfect Fungi.** Four Edition. The American Phytopathological Society. 1990 Pp 130-150.

APÉNDICE A

TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y MORFOLÓGICA.

Existen diversas técnicas para la caracterización de materiales, que utilizan un haz incidente de electrones, iones o fotones, los cuales interactúan con la superficie excitándola, con la subsiguiente emisión de combinaciones de haces secundarios de electrones, iones o fotones, llevando consigo información estructural y química durante ese proceso.

A.1 Espectroscopía de Ultravioleta Visible

Los estudios en esta zona de la radiación electromagnética (700-200nm) se ayudan de las leyes ya estudiadas, como por ejemplo la Ley de Lambert-Beer, la cual relaciona la absorbancia A con la intensidad de la radiación de la siguiente forma:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (\text{Ec. 8})$$

donde I_0 e I son la intensidad inicial y final de la radiación electromagnética, antes y después de pasar a través de la muestra, respectivamente[148-149].

En algunos casos se requiere la información de la Transmitancia T de una especie en vez de su absorbancia. La relación entre estas dos cantidades físicas es la siguiente:

$$A = \log (T) \quad (\text{Ec. 9})$$

La obtención de un espectro de transmitancia (%T) en función de la longitud de onda (λ) es de utilidad para el caso de películas delgadas al proporcionar información sobre sus propiedades ópticas.

A. 2 Difracción de Rayos X

La Difracción de Rayos X se basa en la interacción de la estructura cristalina de un sólido con una fuente de rayos X, esta estructura cristalina está presente en muchos sólidos tanto naturales como artificiales y consiste en la repetición periódica de átomos o moléculas que forman el sólido en las tres direcciones del espacio [148-150] ver figura 31.

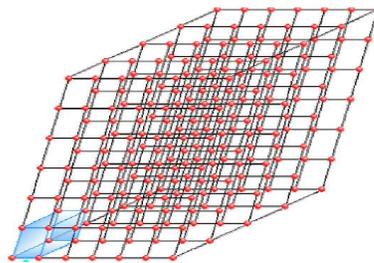


Figura 31. Estructura Cristalina de un Sólido.

Sobre esta estructura tridimensional se pueden trazar infinitos planos paralelos donde cada uno de los cuales pasará por una serie de puntos [148-151].

Si tomamos uno de estos planos, a una cierta distancia existirá otro plano donde la distribución de puntos que corta será la misma, a la distancia entre estos dos planos se llama distancia interplanar “d”, así tendremos infinitos planos paralelos a distancias múltiplos de “d”. Si va por estos planos de la estructura se hace incidir un haz de rayos X, se da el siguiente fenómeno [148-151]:

“Si el frente de ondas que se difracta por el primer plano lo hace con un ángulo θ , el frente de ondas del segundo plano también se va difractar con un ángulo θ , con esta nueva trayectoria que se describe si los dos frentes no están en fase ocurre una interferencia destructiva y se anula uno al otro, pero si los dos salen en fase, hay una interferencia constructiva y el haz difractado no se anula y es detectable [148-149]”.

Esto ocurre cuando la diferencia de recorrido entre los dos frentes es un múltiplo de la longitud de onda λ y matemáticamente: $2d \sin\theta = n\lambda$ (Ley de Bragg). Como cada familia de planos tiene una distancia d, vamos a detectar estos planos a diferentes ángulos, y los resultados serán diferentes según la estructura de lo que estemos midiendo, por lo que podemos caracterizar las fases que componen la muestra en base a los diferentes “picos” de detección que son en realidad las reflexiones de los planos de cada fase, para una rápida identificación se tienen tabulados los valores de las diferentes fases en fichas y se comparan con los resultados obtenidos [148-151].

La difracción de rayos X nos asistirá en la caracterización de las nanopartículas indicándonos la fase mineralógica de las nanopartículas, además de poder estimar el tamaño del cristal.

$$B = \frac{k\lambda}{D \cos \theta} \quad (\text{Ec. 10})$$

Esta técnica se utilizará en el método de polvos.

A.3 Microscopía de Fuerza Atómica

El microscopio de fuerza atómica (AFM) es un instrumento mecano-óptico que detecta fuerzas a nivel atómico a través de la medición óptica del movimiento sobre la superficie de un *cantilever* muy sensible terminado en una punta con un cristal de forma piramidal, usualmente duro [152]. La fuerza atómica, evidente cuando el cantilever está muy próximo a la superficie de la muestra, se detecta a través de la torsión de aquél.

La dirección del haz láser reflejado por la parte posterior del cantilever cambia con la torsión del mismo [152-153]. La longitud del cantilever es de $200\mu\text{m}$, y tiene una punta muy aguda en el extremo. La muestra es movida en el barrido en las tres direcciones, mientras el cantilever traza la superficie de la muestra en detalle. Todos los movimientos son controlados por una computadora [149-150]. En la figura 32 se muestra un esquema básico de la conformación de un equipo de MFA.

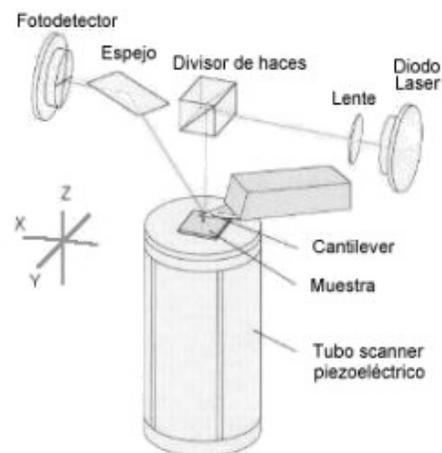


Figura 32. Equipo de MFA.

La resolución del instrumento es de menos de 1nm, y la pantalla de visualización permite distinguir detalles en la superficie de la muestra con una amplificación de varios millones de magnitud [152-153].

Hay varios modos de trabajo en Microscopía de Fuerza Atómica: modo de contacto, de altura constante, sin contacto y modo dinámico.

Modo de Contacto:

Este modo de barrido provee retroalimentación, en tanto que la repulsión entre el cantilever y la muestra permanece constante. De la intensidad de la retro-alimentación se mide la altura. Este es el modo más común de análisis en MFA (Figura 33) [152-153].

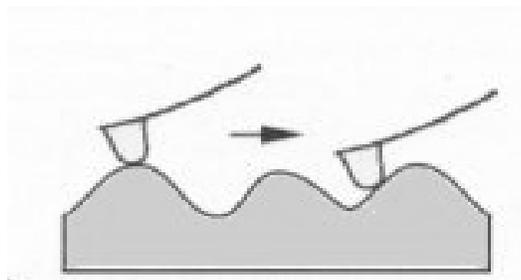


Figura 33. Modo de Contacto del Cantilever.

Modo de Altura Constante

En este modo de barrido la altura del cantilever se mantiene constante durante el barrido. Se mide la torsión del cantilever. Al no haber retroalimentación, es posible barrer a alta velocidad (Figura 34) [152-153].

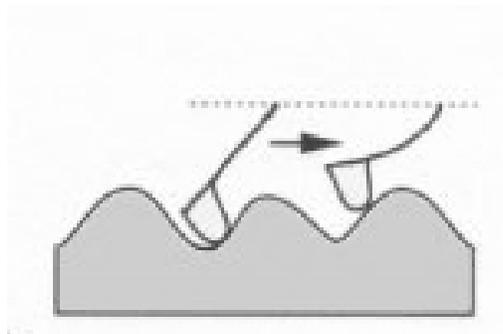


Figura 34. Modo de Altura Constante.

Modo Sin Contacto

Este modo de barrido provee retroalimentación, y la atracción entre la muestra y el cantilever (que vibra cerca del punto de resonancia) permanece constante. De la intensidad de la retro-alimentación se mide la altura. La resolución es un poco menor debido a la distancia entre el cantilever y la muestra (Figura 35) [152-153].

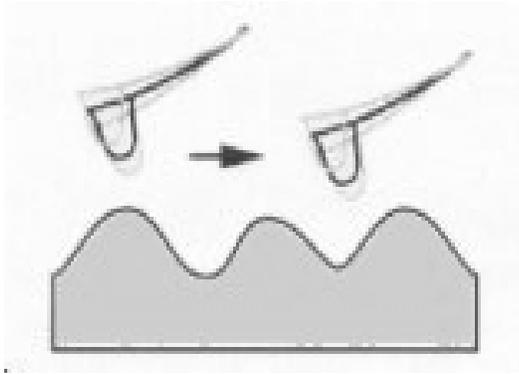


Figura 35. Modo Sin Contacto.

Modo Dinámico

Este modo provee retroalimentación, en tanto que la repulsión entre la muestra y el cantilever permanece constante. De la intensidad de la retroalimentación se mide la altura. Dado que hay poco "rozamiento" de la superficie, este modo es ideal para muestras que se mueven con facilidad (Figura 36) [152-153].

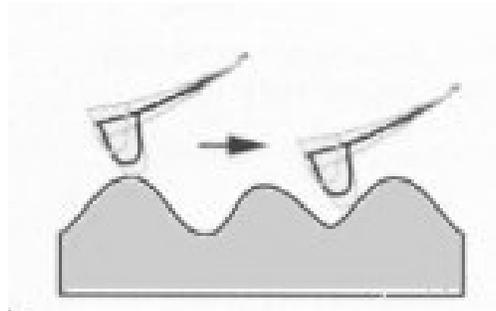


Figura 36. Modo Dinámico del Cantilever.

A.4 Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés correspondientes a *Scanning Electrón Microscopy*) es una técnica poderosa para el estudio microscópico de la superficie de una muestra sólida. Entre los detectores disponibles se encuentran de electrones Secundarios, que permite estudiar las características topográficas de muestras a través de recoger estos electrones de baja energía generados en o cerca de la superficie en cuestión.

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento diseñado para estudiar, en alta resolución la superficie de los sólidos, obtener imágenes de electrones secundarios, que dan topografía, además de detectar electrones reflejados o retrodispersados, los cuales contienen información química y otras numerosas señales. Este microscopio puede compararse con el microscopio óptico, donde primero posee una resolución y profundidad de focos mayores, debido a un mayor número de señales que provienen de la interacción de los electrones con los sólidos, y que permiten obtener mayor información sobre la orientación cristalina, la composición química, la estructura magnética o el potencial eléctrico del material en observación.

El funcionamiento del SEM está basado en el hecho de barrer la muestra con un haz electrónico de sección transversal pequeña y de alta energía (en un rastreo cuadrado) y generar una imagen punto a punto de ella, recogiendo diferentes señales generadas por la interacción electrón-muestra en cada punto. Este haz electrónico se produce por un filamento (comúnmente de tungsteno) cuyos electrones se producen por la excitación termoiónica y se aceleran a energías que oscilan entre 2 y 40 keV.

Estos electrones se coliman con lentes condensadores hasta un diámetro pequeño, de unos cuantos o decenas de nanómetros el diámetro al momento de incidir sobre la muestra [154-155].

Cuando los electrones del haz primario inciden sobre el espécimen, se emiten electrones secundarios, los cuales poseen una energía entre 0 y 20eV, se atraen a un detector que cuenta con el número de electrones de baja energía que se emiten de cada punto sobre la muestra. Los electrones provenientes de la muestra se envían a un centellador de pantalla de fósforo. La luz se transmite a un fotomultiplicador que convierte a los fotones en pulsos de electrones. Éstos inciden sobre la pantalla con un tubo de rayos catódicos que absorbe la energía cinética de los electrones, reemitiendo energía a una frecuencia del espectro visible [155].

Si se repite la operación varias veces barriendo la muestra con el haz, la imagen punto a punto representará las características topográficas de la superficie de la muestra. Por lo tanto, la imagen en la pantalla de televisión del microscopio electrónico de barrido es un mapa de las intensidades de los electrones emitidos por la superficie de la muestra en observación y que llegan al detector porque algunos son reasorbidos por las características topográficas de las muestras [155].

APÉNDICE B

Características del Hongo *Penicillium* sp.

APÉNDICE B

Características Morfológicas del Hongo *Penicillium* sp.

B.1 Características del *Penicillium* sp.

Este es un hongo filamentoso distribuido extensamente en el suelo, el aire y en la vegetación en putrefacción. En la Tabla 7 se muestra la clasificación taxonómica de dicho microorganismo.

Tabla 7

Clasificación Taxonómica

Reino	Fungi
División	Ascomycota
Clase	Eucomycetes
Orden	Eurotiales
Familia	Trichomaceae
Género	<i>Penicillium</i>

El género *Penicillium* tiene más de 100 especies, entre las más comunes se incluyen: *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium marneffeii* y *Penicillium purpurogenium* [156].

B.1.1 Características morfológicas.

Las colonias crecen rápidamente en agar Patata Dextrosa, la temperatura de crecimiento es de 25° C, éstas son lanosas, algodonosas, filamentosas, aterciopeladas o planas que se pueden separar figura 37. Son inicialmente blancas pero conforme transcurre el tiempo se hacen verde azulosas, verde oliva, amarillas o rosadas, el revés de la placa es generalmente amarillento.

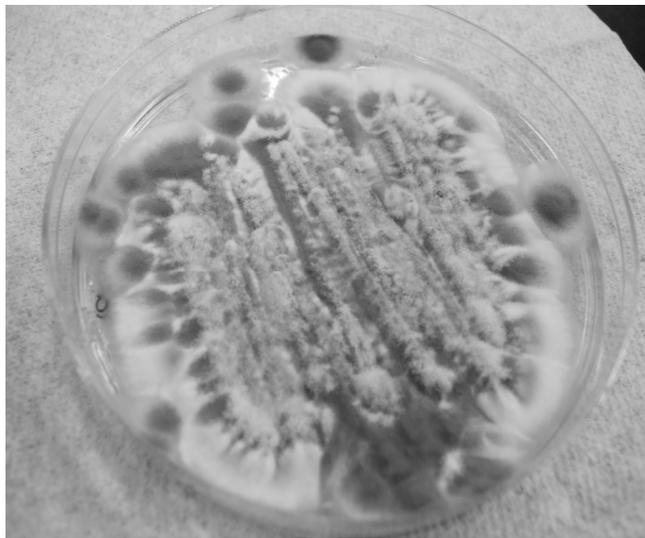


Figura 37. Observación Macroscópicas del hongo *Penicillium* sp

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células condiogenas fiálides, que son observados microscópicamente ver figura 38

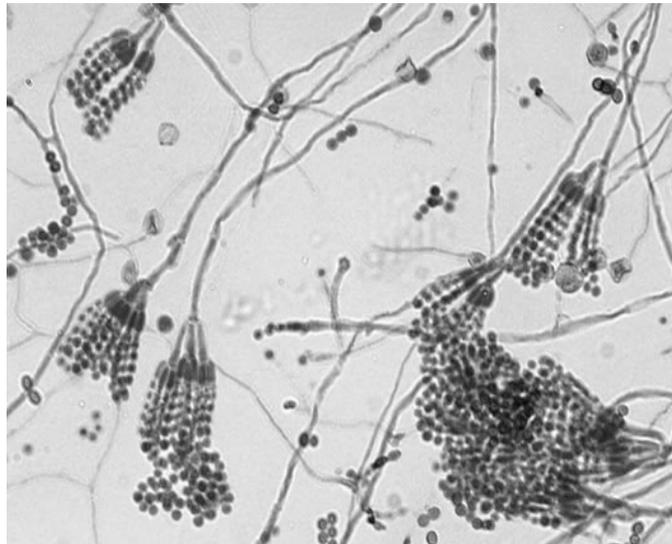


Figura 38. Observación Microscópicas del hongo *Penicillium* sp.

n este trabajo se estudiará una cepa de *Penicillium* sp. aislada de suelo contaminado con alta tolerancia a la presencia de metales pesados como posible fuente de producción de un nanocompósito cerámico-metal.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Luis Raúl Reyes Chávez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales.

Tesis: “Biosíntesis de Titanio-Níquel (TiNi) y Dióxido de Titanio (TiO₂) con perspectivas de aplicación en biomateriales”.

Campo de Estudio: Ciencias Químicas

Biografía: Nacido el 4 de Agosto de 1980 en Monterrey, Nuevo León, hijo de la señora María Luisa Chávez Domínguez y del señor Raúl Reyes Caballero (†).

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.), grados obtenidos: Licenciado en Química Industrial en 2003, Maestría en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales en 2007.

Experiencia Laboral: Profesor de Laboratorio de Física en la Facultad de Ciencias Químicas (U.A.N.L.), de Enero a Junio de 2007, Profesor de las Asignaturas de Química, Física y Matemáticas en la preparatoria No. 25 “Dr. Eduardo Aguirre Pequeño” de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde Agosto de 2008 hasta la fecha.