

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOCOMPUESTOS
HÍBRIDOS BASADOS EN ZNO E HIDROXIAPATITA EN
SISTEMAS CON ARQUITECTURAS 3D, 2D Y 0D.

TRABAJO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
FÍSICO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

JOHN ANDERSON TIPAZ CHINGAL

`john.tipaz@epn.edu.ec`

DIRECTOR: LUIS RODRIGO LASCANO LASCANO, Ph.D.

`luis.lascano@epn.edu.ec`

QUITO, JULIO 2018

DECLARACIÓN

Yo, JOHN ANDERSON TIPAZ CHINGAL, declaro bajo juramento que el trabajo aquí escrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mis derechos de propiedad intelectual, correspondientes a este trabajo, a la Escuela Politécnica Nacional, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

JOHN ANDERSON TIPAZ CHINGAL

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado por JOHN ANDERSON TIPAZ CHINGAL, bajo mi supervisión.

LUIS RODRIGO LASCANO LASCANO

Director del Proyecto

RECONOCIMIENTO

A la Dra. Gema González Vázquez, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por su asistencia científica permanente en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

JOHN ANDERSON TIPAZ CHINGAL

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a la Dra. Gema González, por haberme brindado su guía, enseñanzas y por todo el tiempo dedicado durante el desarrollo de este proyecto de investigación.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por su colaboración con materiales, microscopías (SEM-EDS, TEM) y difractogramas (DRX y SAED).

Al Centro de Investigaciones Aplicadas a Polímeros (CIAP), por facilitarme su laboratorio para la realización de este trabajo y por su ayuda con las espectroscopías IR.

Al Dr. César Costa, por facilitarme los equipos del laboratorio de Espectroscopía, y por sus enseñanzas y consejos durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Luis Borrero, por su colaboración en la medición de las propiedades ópticas, y sus ideas y aportes para este trabajo.

A la Ing. Fernanda Narváez y a Sara, por su ayuda en la medición de las propiedades eléctricas.

Al Dr. Luis Lascano, por su ayuda y tiempo dedicado para la revisión de este trabajo.

A Gaby, por haberme acompañado y ayudado en todas las etapas de este proyecto.

A mi familia y amigos, por haberme brindado su apoyo durante todo este tiempo.

DEDICATORIA

A mis padres Luis y Mery, a mis hermanos Luis y Diana, a mis abuelos y todos quienes han sido un apoyo constante para alcanzar esta meta.

Índice general

Lista de Tablas	XI
Lista de Figuras	XII
Resumen	XV
Abstract	XVI
1. Introducción	1
1.1. Objetivo General	3
1.2. Objetivos Específicos	3
2. Marco Teórico	5
2.1. Biomateriales: características y aplicaciones	5
2.2. Óxido de Zinc: estructura y propiedades	7
2.2.1. Estructura cristalina	8
2.2.2. Estructura electrónica de bandas	8
2.2.3. El ZnO como biomaterial	9
2.3. Hidroxiapatita: estructura y propiedades	10
2.3.1. Estructura cristalina	11
2.3.2. Propiedades eléctricas	11
2.3.3. La hidroxiapatita como biomaterial	13
2.3.4. Formación de hidroxiapatita en presencia de un campo eléctrico usando un fluido corporal simulado (SBF)	14

2.4.	Quitosano: estructura y propiedades	15
2.4.1.	Estructura	15
2.4.2.	Propiedades eléctricas	16
2.5.	Luminiscencia	16
2.5.1.	Fotoluminiscencia del ZnO	17
2.5.2.	Fotoluminiscencia de la hidroxiapatita	18
2.5.3.	Fotoluminiscencia del quitosano	18
2.6.	Técnicas de caracterización	19
2.6.1.	Espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR)	19
2.6.2.	Difracción de Rayos X (DRX)	21
2.6.3.	Microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS)	21
2.6.4.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	23
2.6.5.	Difracción de área seleccionada (SAED)	23
2.6.6.	Espectroscopía de fotoluminiscencia	24
2.6.7.	Espectroscopía de impedancia compleja (EIS)	25
3.	Procedimiento Experimental y Técnicas de Caracterización	27
3.1.	Síntesis de Estructuras	27
3.1.1.	Síntesis de Estructuras 2D de Quitosano	27
3.1.2.	Síntesis de Estructuras 2D de Quitosano-ZnO	29
3.1.3.	Síntesis de Estructuras 3D de Quitosano	30
3.1.4.	Síntesis de Estructuras 3D de Quitosano-ZnO, Quitosano-Hidroxiapatita y Quitosano-ZnO-Hidroxiapatita	32
3.1.5.	Preparación de las soluciones para el Fluido Corporal Simulado (SBF)	33
3.1.6.	Deposición de hidroxiapatita en las estructuras 2D y 3D de quitosano asistida por un campo eléctrico	34

3.1.7.	Síntesis de Estructuras 0D (nanopartículas)	36
3.2.	Caracterización estructural y microestructural de las muestras	37
3.2.1.	Microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS)	37
3.2.2.	Espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR)	38
3.2.3.	Difracción de Rayos X (DRX)	39
3.2.4.	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	39
3.3.	Caracterización Óptica	40
3.4.	Caracterización Eléctrica	41
4.	Resultados y Análisis	43
4.1.	Caracterización estructural y microestructural	43
4.1.1.	Estructuras 2D	43
4.1.2.	Estructuras 3D	49
4.1.3.	Estructuras 0D	55
4.2.	Caracterización óptica	59
4.2.1.	Estructuras 2D	60
4.2.2.	Estructuras 3D	62
4.2.3.	Estructuras 0D	64
4.2.4.	Efectos de la arquitectura	65
4.3.	Caracterización eléctrica	66
4.3.1.	Estructuras 2D	67
4.3.2.	Estructuras 3D	70
4.3.3.	Estructuras 0D	74
4.4.	Análisis comparativo de las estructuras	75
5.	Conclusiones y Recomendaciones	78
5.1.	Conclusiones	78

5.2. Recomendaciones	79
Bibliografía	80
Appendices	86
A. Curvas de ajuste para los espectros de fotoluminiscencia de las es- tructuras 2D	87

Índice de Tablas

3.1. Reactivos usados para las soluciones SBF.	33
A.1. Área total integrada de las curvas de ajuste para los espectros de fotoluminiscencia en estructuras 2D.	88
A.2. Parámetros de la curva de ajuste: membrana de quitosano.	89
A.3. Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-ZnO. . .	90
A.4. Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-HAp (7V).	91
A.5. Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-HAp (14V).	92
A.6. Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-ZnO-HAp (7V).	93
A.7. Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-ZnO-HAp (14V).	94

Índice de figuras

2.1. Estructuras cristalinas del ZnO.	8
2.2. Estructura electrónica de bandas del ZnO.	9
2.3. Estructura cristalina de la hidroxiapatita.	12
2.4. Estructura del quitosano.	16
2.5. Principio básico de la fotoluminiscencia.	17
2.6. Difractogramas DRX de un polímero en fases: cristalina, semicristalina y amorfa.	22
2.7. Difractogramas SAED de una muestra cristalina, semicristalina y amorfa.	24
3.1. Diagrama del proceso para la síntesis de estructuras 2D.	28
3.2. Diagrama del proceso para la síntesis de estructuras 3D.	31
3.3. Esquema experimental del sistema de deposición de hidroxiapatita asis- tido por campo eléctrico.	35
3.4. Esquema del montaje experimental usado para la obtención de estruc- turas 0D.	37
3.5. Esquema del montaje experimental para las mediciones de luminiscencia.	40
4.1. Caracterización estructural de membranas de quitosano y quitosano- ZnO.	44
4.2. Caracterización estructural de membranas de quitosano-hidroxiapatita.	46
4.3. Caracterización estructural de membranas de quitosano-ZnO-hidroxiapatita.	48

4.4. Esquema de los cortes analizados mediante SEM de andamios tridimensionales.	49
4.5. Caracterización estructural de andamios 3D de quitosano y quitosano-ZnO.	50
4.6. Caracterización estructural de andamios 3D de quitosano-ZnO-hidroxiapatita con deposición de HAp en campos de 7V y 14V.	52
4.7. Caracterización estructural de andamios 3D de quitosano-hidroxiapatita y quitosano-ZnO-hidroxiapatita con HAp pre-sintetizada.	54
4.8. Caracterización de las estructuras 0D mediante TEM y EDS.	57
4.9. Caracterización de las estructuras 0D mediante FTIR y DRX.	58
4.10. Espectros de luminiscencia de estructuras 2D.	60
4.11. Espectros de luminiscencia normalizados de estructuras 3D.	63
4.12. Espectros de luminiscencia de estructuras 0D.	65
4.13. Gráfica de la impedancia y conductividad para las estructuras 2D.	66
4.14. Gráfica de la capacitancia y constante dieléctrica relativa para las estructuras 2D.	69
4.15. Gráfica de la impedancia y conductividad para las estructuras 3D.	71
4.16. Gráfica de la capacitancia y constante dieléctrica relativa para las estructuras 3D.	72
4.17. Gráfica de la impedancia y conductividad para las estructuras 0D.	74
4.18. Gráfica de la capacitancia y constante dieléctrica para las estructuras 0D.	75
A.1. Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano.	89
A.2. Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-ZnO.	90

A.3. Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-HAp (7V).	91
A.4. Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-HAp (14V).	92
A.5. Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-ZnO-HAp (7V).	93
A.6. Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-ZnO-HAp (14V).	94

Resumen

Los biomateriales son sustancias que no producen reacciones adversas en el organismo, y son usados para diferentes aplicaciones en el campo de la biomedicina. El presente trabajo tiene como objetivo sintetizar y caracterizar sistemas formados por quitosano, ZnO e hidroxiapatita en arquitecturas 3D, 2D y 0D, y determinar cómo afecta la estructura en las propiedades ópticas y eléctricas de estos sistemas. La particularidad de estos compuestos es que son considerados como biomateriales. Se realizó una caracterización estructural y microestructural mediante diferentes técnicas para determinar la morfología, composición, tamaño de partículas y fase cristalina de las muestras. La caracterización óptica se realizó mediante espectroscopía de fotoluminiscencia y se encontró una mejora importante en la intensidad de emisión de los sistemas bidimensionales que contienen una mezcla de ZnO/hidroxiapatita en su estructura, mientras que en los sistemas 3D y 0D estas propiedades no fueron tan relevantes debido a la estructura porosa de los andamios y una capa externa de carbón que se formó durante la síntesis de las nanopartículas. Sin embargo, las propiedades de luminiscencia de las membranas podrían tener potenciales aplicaciones en el campo de la fotónica y biofotónica. Las propiedades eléctricas fueron caracterizadas mediante la técnica de espectroscopía de impedancia compleja. Se encontró que estas propiedades dependen en gran medida de la arquitectura de los sistemas, y los valores medidos están dentro del rango de los reportados en la literatura, para ciertas muestras. Estos sistemas podrían tener aplicaciones en la fabricación de biosensores.

Abstract

Biomaterials are substances that do not produce adverse reactions in the organism, and these are used for different applications in the field of biomedicine. The objective of this work is to synthesize and characterize systems formed by chitosan, ZnO and hydroxyapatite in 3D, 2D and 0D architectures, and to determine how the structure affects the optical and electrical properties of these systems. The particularity of these compounds is that they are considered as biomaterials. A structural and microstructural characterization was carried out using different techniques to determine the morphology, composition, particle size and crystalline phase of the samples. Optical characterization was performed by photoluminescence spectroscopy and a significant improvement was found in the emission intensity of two-dimensional systems containing a mixture of ZnO / hydroxyapatite in its structure, whereas in 3D and 0D systems these properties were not as relevant due to the porous structure of the scaffolds and an outer layer of carbon that was formed during the synthesis of the nanoparticles. Nevertheless, the luminescence properties of the membranes could have potential applications in the field of photonics and biophotonics. The electrical properties were characterized by complex impedance spectroscopy technique. It was found that these properties depend to a great extent on the architecture of the systems, and the measured values are within the range of those reported in the literature, for certain samples. These systems could have applications in the manufacture of biosensors.

Capítulo 1

Introducción

Se define como biomateriales a las sustancias naturales o sintéticas que puedan usarse para reemplazar un órgano o tejido del cuerpo humano, o como dispositivos médicos, sin provocar reacciones adversas en el organismo [1]. En búsqueda de nuevos materiales para diferentes áreas de aplicaciones biomédicas, se ha considerado preparar nanocompuestos basados en ZnO e hidroxiapatita, en sistemas de diferentes dimensiones: andamios tridimensionales porosos (3D), membranas (2D) y nanopartículas (0D), formados a partir de matrices de quitosano, aprovechando las propiedades de ambos materiales con el fin de obtener un efecto sinérgico entre ellos y estudiar el efecto de la dimensión en las propiedades.

El quitosano es un polisacárido extraído del exoesqueleto de crustáceos e insectos, cuya alta biocompatibilidad y propiedades antibacteriales lo hacen ideal para aplicaciones en biomedicina [2].

El ZnO es un compuesto semiconductor ampliamente estudiado en diversos campos de la ciencia y la tecnología, debido a sus prometedoras propiedades para aplicaciones en fotónica y electrónica. Por su brecha de energía (3.37 eV) es atractivo

para dispositivos que emiten luz y para sensores. Y, al ser biocompatible y tener propiedades antibacteriales, el ZnO es especialmente interesante para su aplicación en biosensores [3,4] y, en general, en aplicaciones biomédicas.

La hidroxiapatita (HAp) es un fosfato de calcio que se encuentra presente en los tejidos duros del cuerpo humano, como huesos y dientes, siendo el compuesto inorgánico encargado de darles su rigidez característica. Se lo considera un material bioactivo, puesto que ayuda a la regeneración ósea cuando es usado junto a otros materiales en la fabricación de implantes [5]. Además, se ha comprobado que posee características de luminiscencia, que lo hacen un material atractivo para dispositivos de bioimagen [6].

Actualmente, existen estudios de compuestos ZnO-hidroxiapatita sintetizados como estructuras compactas para aplicaciones enfocadas en prótesis y cementos, en donde se caracterizan sus propiedades estructurales, mecánicas y bioactivas [7–10]. Hay muy pocos estudios de películas de quitosano con ZnO para aplicaciones enfocadas en biosensores [11]. Y en cuanto a las propiedades de luminiscencia, se han realizado algunos trabajos con los materiales por separado, tanto para el ZnO [4, 12–14] como para la hidroxiapatita [15–18]. Pero no existen estudios profundos de compuestos ZnO-hidroxiapatita en los que se caractericen sus propiedades eléctricas, de luminiscencia, así como los efectos de la arquitectura (3D, 2D y 0D) en las propiedades de los sistemas.

En este trabajo se han sintetizado compuestos de quitosano-ZnO-hidroxiapatita en sistemas con arquitecturas 3D, 2D y 0D. Se estudiaron las propiedades eléctricas y de luminiscencia para su posible utilización como dispositivos de bioimagen y en prótesis bioactivas.

El trabajo consta de 5 capítulos organizados de la siguiente manera: en primer lugar se realiza una breve introducción en donde se hace el planteamiento del problema, la motivación de su estudio y se detallan los objetivos; en el Capítulo 2 se describen las propiedades y características de los compuestos que se usaron y los principios de funcionamiento de las técnicas de caracterización; en el Capítulo 3 se detalla la metodología usada para la síntesis de las estructuras y los equipos y preparación de las muestras para su caracterización; en el Capítulo 4 se discuten los resultados obtenidos de la caracterización estructural, microestructural, óptica y eléctrica de los sistemas y se hace un análisis de la influencia de la arquitectura en sus propiedades; finalmente, en el Capítulo 5 se escriben las conclusiones y recomendaciones para trabajos futuros. Adicionalmente se incluye la bibliografía utilizada en el desarrollo del trabajo, y un capítulo de Anexos en donde se detallan las curvas de ajuste usadas para el análisis de las propiedades ópticas.

1.1. Objetivo General

Sintetizar y caracterizar nanocompuestos híbridos basados en quitosano, ZnO e hidroxiapatita en sistemas con arquitecturas 3D, 2D y 0D, y determinar la relación entre la estructura y sus propiedades.

1.2. Objetivos Específicos

- Diseñar estructuras tridimensionales (3D) y bidimensionales (2D) de quitosano/ZnO y quitosano/ZnO/hidroxiapatita.
- Sintetizar nanoestructuras 0D tipo core-shell de ZnO e hidroxiapatita.
- Caracterizar estructural y microestructuralmente los sistemas formados.

- Determinar las propiedades eléctricas y ópticas (luminiscencia) de los sistemas formados.
- Analizar los efectos de la arquitectura de los sistemas en sus propiedades.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Biomateriales: características y aplicaciones

Dentro de los diversos tipos de materiales, aquellos que al interactuar con el cuerpo humano no provocan reacciones adversas en el organismo se conocen como biomateriales. Más específicamente, para que un material sea considerado como biomaterial debe cumplir con ciertas características como: ser biocompatible (no inducir procesos inflamatorios, tóxicos o alérgicos), bioactivo, bioinerte y biofuncional. Los biomateriales pueden ser de origen natural, provenientes de plantas y animales, o pueden ser sintetizados en un laboratorio [19].

Un material se considera bioactivo, cuando además de ser biocompatible, promueve un enlace químico en la interfase entre el material inerte y el material biológico con el que interactúa. Son materiales que favorecen la regeneración celular. Entre los principales tenemos a la hidroxiapatita, junto con otros fosfatos de calcio como el fosfato tricálcico (TCP), fosfato octacálcico (OCP), fosfato de calcio amorfo (ACP) [19].

Cuando no existe una reacción química entre el material biocompatible y el tejido vivo, se dice que el material es bioinerte. Entre los más conocidos están la alúmina, zirconio, titanio, aleaciones de titanio y carbono. Son frecuentemente usados en prótesis e implantes permanentes, donde la carga soportada y la fricción son altas, y en la fabricación de instrumental quirúrgico [19].

La biofuncionalidad es la capacidad que tiene el material para cumplir la tarea para la cual fue diseñado, sin degradarse o perder efectividad antes de su tiempo de vida útil [19].

Actualmente, la ingeniería de tejidos es uno de los campos que más se ha desarrollado, y cuyo objetivo es diseñar nuevos biomateriales para reemplazar y reconstruir tejidos y órganos del cuerpo humano, con las propiedades específicas que se requieren en cada aplicación. Cada tejido y órgano está compuesto por distintos tipos de células, cuyas características físicas y químicas difieren enormemente entre sí [2, 20], sin embargo, la investigación en este campo continúa progresando día a día.

Otra de las aplicaciones importantes de los biomateriales es la fabricación de dispositivos biomédicos, conocidos también como instrumentación médica o quirúrgica, la cual comprende agujas hipodérmicas, cemento quirúrgico, bisturís, marcapasos cardíacos, vendas de yeso, entre otros. Es decir, aquellos dispositivos que van a estar en contacto con el organismo externa o internamente con fines médicos. Además, tienen aplicaciones en dispositivos de bioimagen, como marcadores luminiscentes, “cell targeting” e imagenología [2, 8, 21].

Recientes investigaciones han demostrado que cierto tipo de biomateriales se pueden usar para la entrega controlada de fármacos sobre tejidos o células específicas del

cuerpo, siendo potencialmente útiles para tratamientos contra el cáncer, puesto que se aumentaría la efectividad del tratamiento, reduciendo los efectos secundarios al atacar con el fármaco únicamente las células tumorales sin dañar las células sanas [20,22–24].

Dentro de los biomateriales tenemos al quitosano, ZnO e hidroxiapatita, los cuales han sido objeto de numerosas investigaciones por sus prometedoras aplicaciones. Han sido estudiados por separado y como sistemas combinados: quitosano/ZnO, quitosano/hidroxiapatita y ZnO/hidroxiapatita en arquitecturas 0D, 2D y 3D, pero se ha encontrado muy pocos estudios sobre sistemas quitosano/ZnO/hidroxiapatita en la literatura, y están enfocados en las propiedades mecánicas, antibacteriales, toxicológicas y bioactivas de los sistemas [25,26].

Khan et al. reportan la fabricación de biosensores de colesterol usando membranas de quitosano/ZnO [11], Li et al. hacen un estudio sobre las propiedades mecánicas y antibacteriales de estos sistemas [27]. Dhivya et al. y Thein-Han et al. estudiaron sistemas 3D de quitosano/hidroxiapatita para aplicaciones en ingeniería de tejidos [28,29]. Gunduz et al., Zhou et al. y Moldovan et al. han trabajado en sistemas 0D de hidroxiapatita/ZnO para diferentes aplicaciones biomédicas [7,21,30].

2.2. Óxido de Zinc: estructura y propiedades

El ZnO es un compuesto semiconductor ampliamente utilizado en la industria durante el proceso de fabricación de cauchos, plásticos, cerámicas, pinturas, adhesivos, comida, entre otros. Como mineral se encuentra presente en la cincita, constituyendo aproximadamente el 80 % de éste, y también puede ser sintetizado artificialmente. Puesto que es un semiconductor, tiene aplicaciones importantes tanto en la electrónica como en la fotónica. Y, al ser biocompatible, son de especial interés sus aplicaciones como biomaterial [3,12].

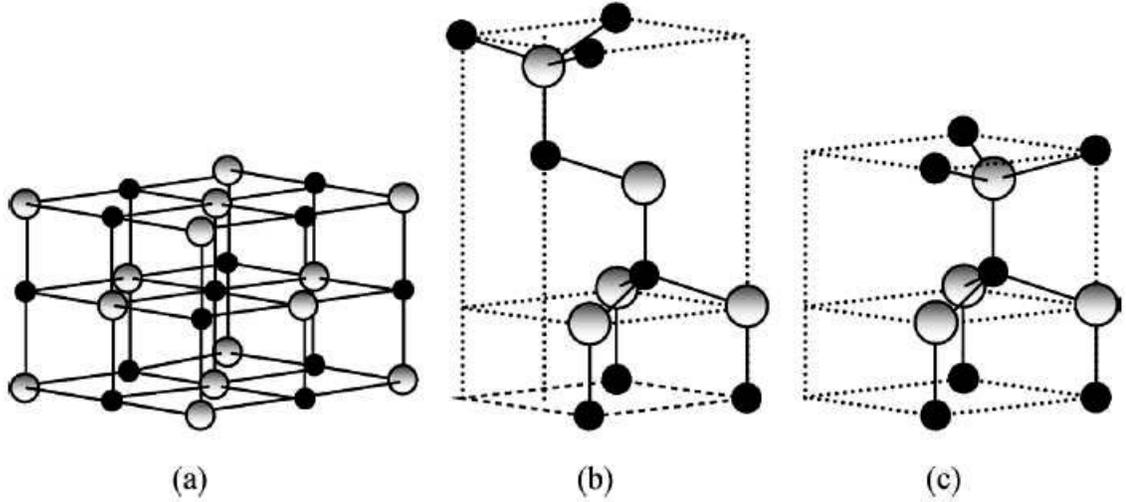


Figura 2.1: Estructuras cristalinas del ZnO: a) sal de roca cúbica, b) blenda de zinc cúbica, y c) wurtzita hexagonal. Las esferas grises y negras representan a los átomos de Zn y O, respectivamente. Imagen tomada de [3].

2.2.1. Estructura cristalina

El óxido de zinc cristaliza en tres estructuras: sal de roca, blenda de zinc cúbica y wurtzita hexagonal (Wz). Siendo ésta última la fase más estable bajo condiciones normales de presión y temperatura [3].

La estructura wurtzita del ZnO (Fig. 2.1) tiene una celda unitaria hexagonal, pertenece al grupo espacial C_{6v}^4 , y sus parámetros de red \mathbf{a} y \mathbf{c} están en la relación de $a/c = \sqrt{8/3} = 1,633$. Cada anión está rodeado por 4 cationes en las esquinas de un tetraedro y viceversa. Mediante técnicas experimentales como HR-XRD y cálculos teóricos, se ha determinado que el valor del parámetro \mathbf{a} está entre 3.2475\AA y 3.2501\AA , y el parámetro \mathbf{c} entre 5.2042\AA y 5.2075\AA [3, 12].

2.2.2. Estructura electrónica de bandas

Determinar la estructura de bandas es de mucha importancia para aplicaciones tanto electrónicas como fotónicas del material, por esta razón se han hecho innu-

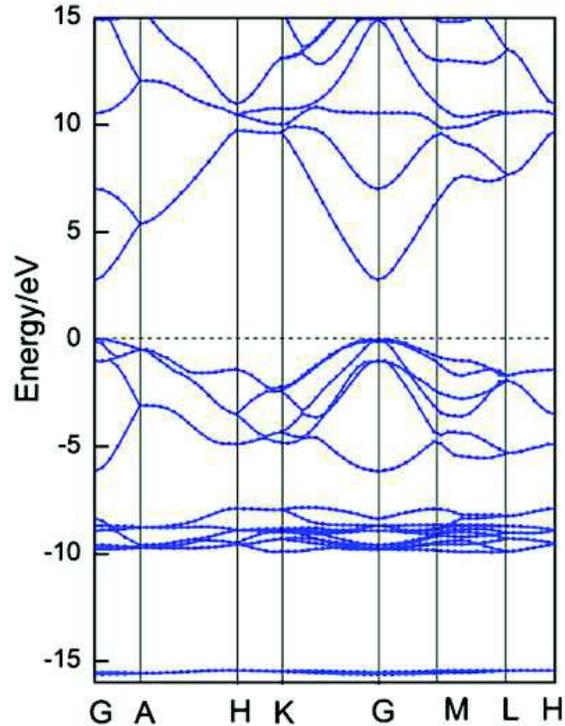


Figura 2.2: Estructura electrónica de bandas del ZnO, tomada de [3].

merables modelos y aproximaciones teóricas para las tres estructuras cristalinas del ZnO. Sin embargo, la mayor información experimental que se encuentra recopilada es sobre la estructura wuritza hexagonal (Wz) [3].

El ZnO en fase Wz es un semiconductor con banda prohibida directa (Fig. 2.2) de $3,37eV$ a temperatura ambiente y $3,44eV$ a bajas temperaturas. Lo cual lo hace ideal para aplicaciones optoelectrónicas en los rangos UV y azul del espectro, como diodos láser, diodos emisores de luz, fotodetectores [3,4,31].

2.2.3. El ZnO como biomaterial

El Zn y otros compuestos que lo contienen han sido usados con fines médicos desde la antigüedad por imperios como el persa, romano e hindú. Específicamente el ZnO era usado para sanar heridas y dolor en los ojos, así como para tratar ciertas

enfermedades como conjuntivitis y tracoma [32].

Hoy en día se sabe que el ZnO es un mineral presente en cantidades traza en el cuerpo humano que cumple funciones vitales relacionadas principalmente con el sistema inmunológico. Por ello se lo incorpora como suplemento en diferentes alimentos y fórmulas nutricionales. Además, se lo usa como parte de protectores solares y cremas cicatrizantes.

Recientes estudios han demostrado su efectividad como antibacterial, especialmente contra el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, que es el causante de infecciones en hospitales y que se ha convertido en un problema de sanidad a nivel mundial [32].

Otra de sus importantes aplicaciones está en el campo de los implantes óseos y dentales, como un material de andamio, debido a su alta biocompatibilidad y osteoconductividad [32]. La combinación de ZnO con la hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio biocompatibles, como el TCP, han demostrado excelentes resultados en la regeneración ósea, haciendo que existan cada vez más estudios al respecto [8–10, 30].

Aprovechando su biocompatibilidad, se lo ha utilizado también en la fabricación de sensores de glucosa y colesterol [11, 33].

2.3. Hidroxiapatita: estructura y propiedades

La hidroxiapatita es un mineral, el más estable de los fosfatos de calcio, que conforma la mayor parte de los tejidos duros del cuerpo humano [5]. Se puede extraer de fuentes orgánicas como huesos de animales, estrellas de mar y algunos tipos de corales, pero también puede ser sintetizada a través de diferentes métodos como deposición química, deposición biomimética, electrodeposición, sol-gel, entre otros. Debido a su altísima biocompatibilidad ha sido usada en implantes óseos y dentales, prótesis bioactivas, recubrimientos en prótesis metálicas, liberación controlada de fármacos y

gracias a sus propiedades de luminiscencia es interesante también su aplicación en dispositivos de bioimagen [5, 34].

2.3.1. Estructura cristalina

La fórmula química de la hidroxiapatita es $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. Puede cristalizar en dos polimorfos estequiométricos: uno con simetría monoclinica y otro con simetría hexagonal. [35, 36]

Su estructura más común (Fig. 2.3) tiene una celda unitaria hexagonal y pertenece al grupo espacial $P6_3/m$. Sus parámetros de red son $a = b = 9,432\text{Å}$ y $c = 6,881\text{Å}$. Los 10 iones Ca^{2+} ocupan dos sitios de simetría cristalográficamente diferentes, $4f$ y $6h$. Cuatro iones Ca^{2+} ($4f$) están ubicados en columnas a lo largo de los ejes de tres pliegues en $1/3, 2/3, 0$ y $2/3, 1/3, 0$ separados aproximadamente por la mitad del eje c . Estos se conocen comúnmente como $Ca1$ (o columna Ca). $Ca1$ está coordinado a nueve átomos de O , con seis enlaces más cortos que definen un prisma trigonal aproximado y tres enlaces más largos que cubren las caras del prisma. Los poliedros $Ca - O_9$ comparten las caras trigonales para formar cadenas paralelas al eje c . Los seis iones Ca^{2+} restantes (sitios de $6h$, conocidos como $Ca2$ o Ca triangular) forman dos conjuntos triangulares en $z = 1/4$ y $3/4$ en los planos del espejo. Los iones $Ca2$ están siete-coordinados, con seis átomos de O y un ion OH^- . Los seis iones PO_4^{3-} ocupan $6h$ posiciones similares a los iones de $Ca2$, en posiciones triangulares expandidas. Los poliedros $Ca1$ y $Ca2$ adyacentes están unidos a través de átomos de oxígeno del tetraedro PO_4^{3-} [36].

2.3.2. Propiedades eléctricas

Las propiedades eléctricas de la hidroxiapatita han sido objeto de estudio debido a sus potenciales aplicaciones en electrónica para la fabricación de sensores, recu-

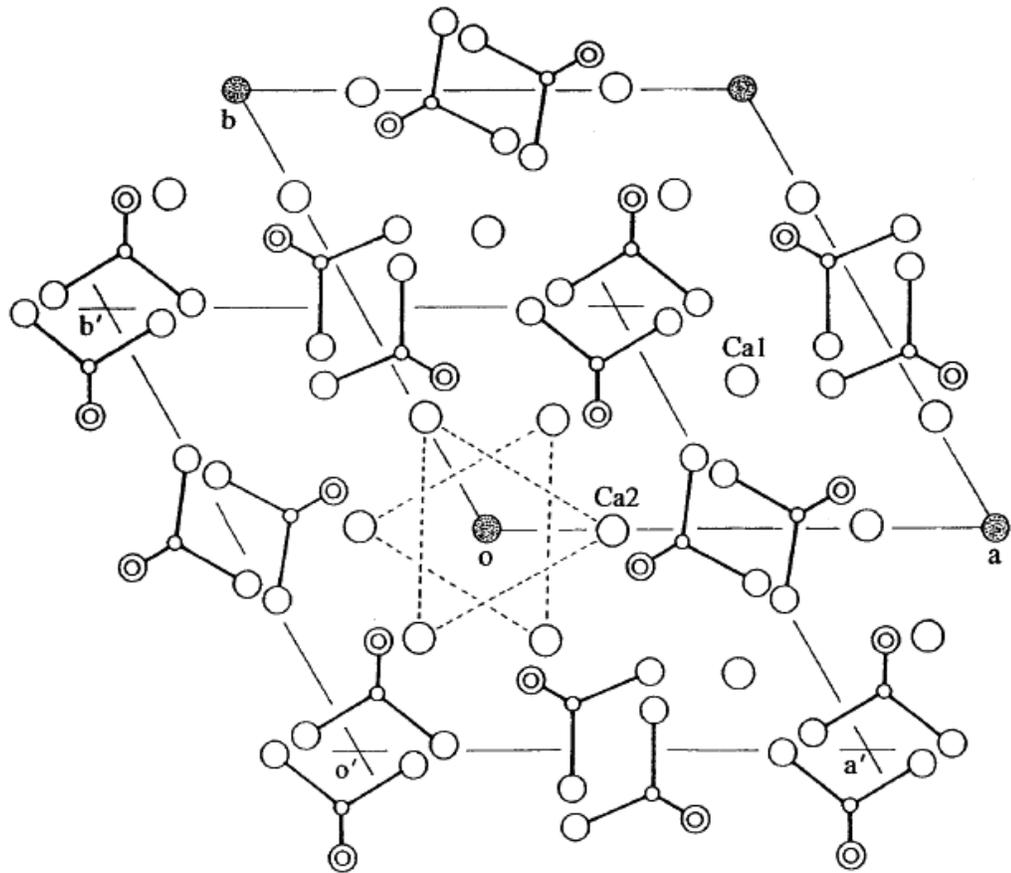
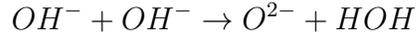


Figura 2.3: Estructura cristalina de la hidroxiapatita proyectada sobre el eje c, tomada de [36].

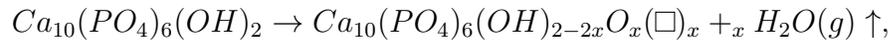
brimientos dieléctricos y en ingeniería de tejidos, especialmente en la regeneración ósea, puesto que numerosos estudios han encontrado que una estimulación eléctrica favorece y acelera la osteogénesis, lo cual es muy importante en las prótesis e implantes [15, 34, 35].

El mecanismo de conducción aún no está totalmente claro, pero se han hecho varias propuestas. Entre las más aceptadas están la conducción iónica y conducción protónica. En el caso de la conducción iónica se han considerado dos tipos de portadores de carga: OH^- y O^{2-} . Los iones de calcio y fosfato (Ca^{2+} y PO_4^{3-}) no contribuyen a la conductividad [37].

De acuerdo con Khalil et al. [38], la conducción eléctrica se da por la migración de iones OH^- en el centro de los triángulos de Ca^{2+} a lo largo del eje c . Laghizil et al. [39] propone que la conducción protónica se da entre iones vecinos OH^- a través de la reacción:



Si la hidroxiapatita que se tiene es no estequiométrica, la conducción podría estar ligada a las vacantes en el sitio del hidroxilo (\square), siguiendo la reacción [37]:



donde $x < 1$.

El comportamiento de la conductividad en campos eléctricos AC en función de la frecuencia está determinado por la ley de potencia “universal” de Jonscher [37]:

$$\sigma_{ac} = \sigma_0 + A\omega^n$$

Donde σ_{ac} es la conductividad en AC, σ_0 es la conductividad en el límite de frecuencia 0, A es una constante, ω es la frecuencia angular y n es una constante entre 0 y 1.

2.3.3. La hidroxiapatita como biomaterial

La hidroxiapatita presenta una biocompatibilidad muy alta y su uso ha sido enfocado principalmente en la fabricación de implantes, prótesis bioactivas, rellenos dentales y en oftalmología. Dependiendo de su origen tiene diferentes aplicaciones, por ejemplo, la proveniente de huesos bovinos se usa en reparaciones óseas, pero no da buenos resultados como rellenos dentales, mientras que la proveniente de corales es muy usada en odontología [34].

En el caso de la hidroxiapatita sintetizada a través de precursores químicos no se

obtiene los mismos resultados que la proveniente de fuentes orgánicas, aunque sí se mantiene la biocompatibilidad. Diferentes investigaciones se han realizado para descubrir los mecanismos óptimos de síntesis, así como la mejora de sus propiedades al combinarla con otros elementos [7, 10, 30, 34, 40, 41].

Las propiedades de luminiscencia que presenta la hacen un potencial candidato para usarse como marcadores luminiscentes y en dispositivos de bioimagen [17, 18, 42, 43].

2.3.4. Formación de hidroxiapatita en presencia de un campo eléctrico usando un fluido corporal simulado (SBF)

El fluido corporal simulado (SBF) es una solución que imita la parte inorgánica del plasma sanguíneo. Como parte de su composición tiene iones de calcio y fosfato, que al combinarse forman diferentes tipos de fosfatos de calcio, siendo la hidroxiapatita el más estable de ellos [44]. Por lo general, a través de este método se obtiene una hidroxiapatita no estequiométrica, con morfología y tamaño bastante regular en comparación a otros métodos. En su estructura se tendrán diferentes iones como F, Cl, Mg, etc., que la harán pobremente cristalina [5, 44]. La ventaja que se tiene con este método es la distribución uniforme de material que se consigue sobre la superficie o estructura requerida, así como el recubrimiento a partículas produciendo estructuras tipo “core-shell”, importantes para sistemas de liberación controlada de fármacos [44]. La formación de hidroxiapatita por este método es lenta, y puede tomar incluso varios días. Para acelerar este proceso se puede utilizar un campo eléctrico, el cual promueve la migración rápida de iones hacia la estructura de deposición, haciendo que los procesos de nucleación y crecimiento sean más rápidos [22, 24, 42, 45].

2.4. Quitosano: estructura y propiedades

La quitina es un polisacárido que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos e insectos. Cuando ésta se somete a un proceso de desacetilación se produce el quitosano [1, 2].

El quitosano es un polisacárido ampliamente usado en diferentes industrias como la agrícola, vinícola y biomédica. Su alta biocompatibilidad y osteoconductividad lo hacen ideal para aplicaciones en ingeniería de tejidos, prótesis bioactivas, implantes dentales, entre otras. Estudios recientes han demostrado que es un buen candidato como matriz para sistemas de liberación controlada de fármacos [1, 2].

Se lo puede combinar con otros compuestos y diseñar con él diferentes arquitecturas dependiendo de la aplicación que se requiera como esponjas o andamios 3D, membranas, tabletas, geles, etc. [1, 20, 23, 46–48]

2.4.1. Estructura

La estructura del quitosano (Fig. 2.4) está compuesta por cadenas de β -(1-4) D-glucosamina (unidad desacetilada) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). Su fórmula molecular es $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$ [2]. Posee una pequeña carga positiva debido al grupo amino, lo cual lo hace soluble en medios ácidos [2].

Los grupos amina e hidroxilos presentes en su estructura son los que hacen posible las funciones biológicas y permiten la modificación de sus propiedades físicas y mecánicas [1, 2].

El quitosano es un biopolímero, y por lo tanto presenta una mezcla de fases amorfa y cristalina.

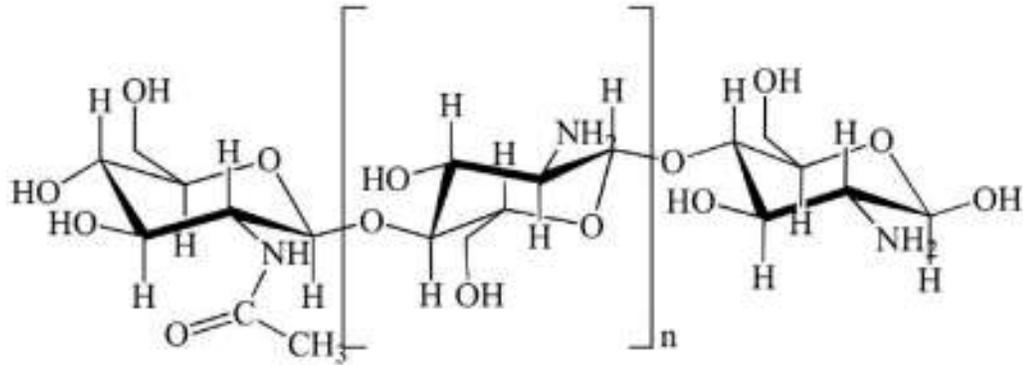


Figura 2.4: Estructura del quitosano, tomada de [2].

2.4.2. Propiedades eléctricas

Al ser un biopolímero, la conductividad eléctrica está ligada a la presencia de iones enlazados químicamente en la macromolécula. Aunque el mecanismo de conducción eléctrica está aún siendo investigado, se piensa que en este caso los portadores de carga son los iones OH^- . Típicamente el comportamiento que presenta en un campo eléctrico AC es el de un material dieléctrico, siguiendo la ley de potencia “universal” de Jonscher. Su conductancia aumenta con el aumento de frecuencia, y su constante dieléctrica disminuye hasta alcanzar un valor constante [46, 47].

Los grupos funcionales OH y NH_2 sirven como sitios de conjunción y permiten al quitosano ligarse con otros materiales, especialmente metálicos, mejorando sus propiedades de conductividad [49].

2.5. Luminiscencia

La luminiscencia es un fenómeno en el que ciertos materiales emiten luz luego de haber sido estimulados por una fuente. Dependiendo de esta fuente se tienen diferentes tipos de luminiscencia como electroluminiscencia, quimioluminiscencia, mecanoluminiscencia, termoluminiscencia y fotoluminiscencia.

La fotoluminiscencia es la emisión de luz luego de absorber energía en forma de foto-

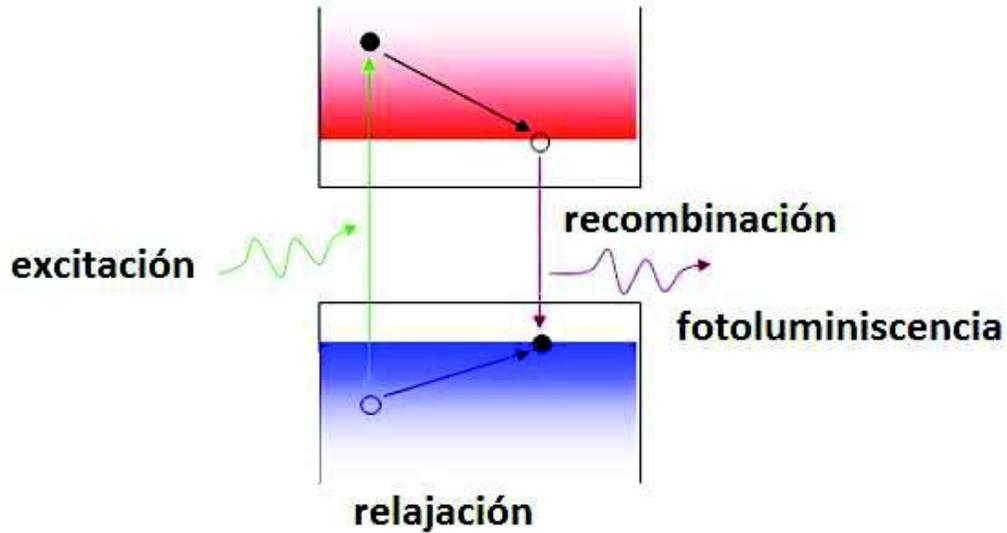


Figura 2.5: Principio básico de la fotoluminiscencia.

nes. El mecanismo varía dependiendo del material estudiado, pero de manera general sucede lo siguiente: la energía de los fotones incidentes es absorbida por el material y lleva a los electrones a un estado excitado, cuando estos regresan a su estado base liberan el exceso de energía en forma de fotones con una longitud de onda mayor que la de los fotones de la fuente (Fig. 2.5).

2.5.1. Fotoluminiscencia del ZnO

El ZnO como se había mencionado es un semiconductor con banda prohibida directa de 3.37 eV y una energía de enlace de excitón cercana a 60 meV a temperatura ambiente, lo cual lo hace un material prometedor para aplicaciones optoelectrónicas en la región del UV [4, 50].

Típicamente presenta dos bandas de emisión: una en la región UV centrada en aproximadamente 380[nm], y otra en la región visible entre los 450[nm] y 700[nm]. La banda en la región del UV cercano se atribuye a la recombinación radiativa de excitones libres, mientras que el origen de la emisión en la región visible aún no está

del todo claro [4, 14].

La explicación más aceptada actualmente propone que la emisión visible del ZnO es causada por defectos superficiales. La emisión centrada en el verde se atribuye a vacantes de oxígeno V_o , sitios intersticiales de zinc (Zn_i) o una combinación de los dos efectos. La emisión centrada en el amarillo (550[nm]) se atribuye a una recombinación de electrones con huecos profundamente atrapados en sitios intersticiales del oxígeno (O_i) [14, 50–52].

2.5.2. Fotoluminiscencia de la hidroxiapatita

La hidroxiapatita no es un material fotoluminiscente como tal, pero bajo ciertas condiciones de síntesis, tratamientos térmicos y dopajes se ha conseguido activar esta propiedad. Su gran flexibilidad cristalina le permite aceptar en su estructura diferentes iones y elementos, sin modificar su estructura, formando defectos estructurales que neutralizan la carga añadida [53, 54].

Considerando la hidroxiapatita pura (sin dopajes), puesto que los iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-} no son luminiscentes, la emisión es atribuida a ciertas impurezas y/o defectos en su estructura [17, 42, 53, 54]. Las vacantes OH y los grupos carbonatos CO_3^{2-} pueden ser responsables de este efecto al generar nuevos niveles de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción, mejorando los procesos de recombinación radiativa de los excitones [53, 54].

2.5.3. Fotoluminiscencia del quitosano

El quitosano es un material fotoluminiscente pero su intensidad de emisión es muy débil, razón por la cual esta propiedad no ha sido muy estudiada. A pesar de no tener una aplicación práctica como material puro, su alta biocompatibilidad lo

hace ideal como matriz o recubrimiento de partículas luminiscentes para aplicaciones biomédicas [55–59].

Existen pocas investigaciones acerca de los procesos involucrados en la fotoluminiscencia del quitosano. Se ha reportado una banda de emisión en el espectro visible, aproximadamente en 420[nm] atribuida a los grupos amina del biopolímero [57], a las micelas que forma si está en un medio acuoso [58] o a los residuos de proteína remanentes de la desacetilación de quitina [60]. Oliveira et al. [59] reportan una emisión ancha centrada en $\lambda = 365[nm]$ en membranas de quitosano atribuido a las transiciones propias del material.

2.6. Técnicas de caracterización

Se emplearon diferentes técnicas para la caracterización estructural y microestructural de las muestras aquí estudiadas, tales como: espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS), microscopía electrónica de transmisión y difracción de área seleccionada (SAED). Para la caracterización de las propiedades ópticas y eléctricas se emplearon las técnicas de espectroscopía de fotoluminiscencia y espectroscopía de impedancia compleja (EIS) respectivamente.

2.6.1. Espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica importante en el análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos, que permite obtener información cuantitativa y cualitativa de la muestra estudiada, acerca de los grupos funcionales, impurezas, enlaces químicos, entre otros. Mediante esta técnica se puede determinar los compo-

nentes de la muestra y estimar la cantidad presente de los mismos.

La identificación de los componentes en la muestra se realiza a través de los modos de vibración de las moléculas en el sólido. El principio físico de la técnica consiste en radiar la muestra con luz infrarroja haciendo un barrido de frecuencias, de tal manera que al coincidir una de estas frecuencias con el modo de vibración de una molécula se produce un cambio en el momento dipolar eléctrico de la misma afectando la intensidad de luz absorbida o transmitida por la muestra, lo cual va a ser detectado por el espectrómetro. Se utiliza luz infrarroja porque es la frecuencia en la que vibran las moléculas en un sólido [61].

La técnica FTIR se llama así porque luego de la recolección de datos utiliza la transformada de Fourier para procesarlos y presentar el espectro de la muestra. Este espectro, según la técnica usada, es un gráfico de la absorbancia o transmitancia (en porcentaje) en función del número de onda.

Cada banda del espectro obtenido representa a un grupo funcional, y el conjunto de éstos es como una huella dactilar que permite identificar el o los compuestos presentes en la muestra. Mientras que la intensidad de las bandas brinda información cuantitativa que ayuda a estimar la cantidad de cada compuesto presente.

En este trabajo se usó esta técnica principalmente para determinar los grupos funcionales, y a través de éstos identificar los compuestos y los posibles mecanismos de enlace entre los materiales.

2.6.2. Difracción de Rayos X (DRX)

La difracción de rayos X es una técnica que, mediante radiación electromagnética, permite determinar la estructura cristalina, fase y composición de una muestra.

El principio físico de la técnica consiste en hacer incidir sobre la muestra un haz de rayos X, el cual será difractado al interactuar con la estructura cristalina, siguiendo la ley de Bragg [61]:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen}(\theta)$$

Donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de la radiación incidente, d es el espacio entre planos de la red cristalina y θ es el ángulo de difracción.

El difractograma que se obtiene es un gráfico de la intensidad (en unidades arbitrarias) en función del ángulo de difracción 2θ (Fig. 2.6). La forma del espectro, así como el ancho de los picos dan información sobre la fase del material: cristalino, semicristalino o amorfo. La posición e intensidad de los picos dan información sobre la estructura y el o los elementos que componen la muestra.

En este trabajo se usó la técnica para determinar la fase del material y los elementos que lo componen.

2.6.3. Microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS)

Es una técnica que permite, a través de un haz de electrones, obtener imágenes de la superficie de una muestra. Su aumento es mucho mayor que el de un microscopio óptico, y su resolución está en el orden de los nanómetros. A través de las micrografías se puede visualizar características de un material como su textura, morfología,

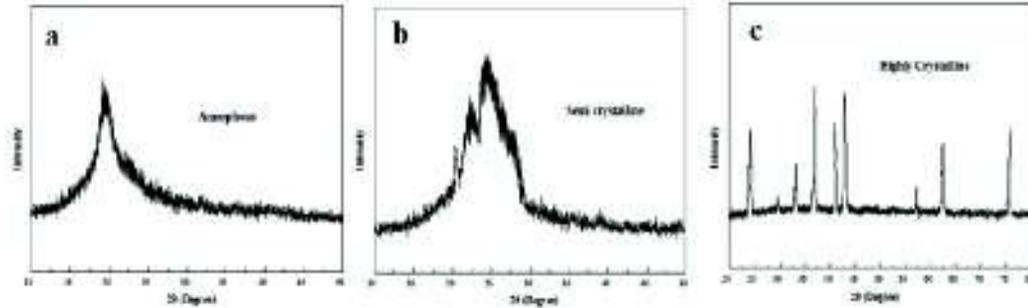


Figura 2.6: Difractogramas DRX de un polímero en fases: a) amorfa, b) semicristalina y c) cristalina. Imagen tomada de [62].

tamaño y defectos superficiales.

El principio de funcionamiento de la técnica consiste en acelerar un haz de electrones mediante un campo eléctrico, hacerlo pasar por lentes (condensadoras y objetivo) para enfocar el haz, el cual incidirá sobre la muestra, barriéndola punto por punto, produciendo diferentes efectos al interactuar con esta. Entre estos efectos están: choques elásticos (electrones retrodispersados) y producción de electrones secundarios (que pueden generar rayos X o electrones Auger), los cuales son recolectados para formar las imágenes [61].

El equipo puede incorporar un detector de fluorescencia de rayos X para obtener información sobre la composición elemental de la muestra, la técnica se conoce como espectroscopía de dispersión en energía o EDS.

En este trabajo se utilizó la técnica SEM para analizar la morfología de las estructuras, la distribución del material depositado y el tamaño de las partículas para el caso de las estructuras 2D y 3D. Además, se usó la técnica EDS para determinar la composición elemental de las muestras y verificar la uniformidad en la distribución de los compuestos.

2.6.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Es una técnica que permite obtener imágenes de estructuras mucho más pequeñas que con el microscopio electrónico de barrido, y brinda información sobre la estructura cristalina de una muestra en polvo. Su resolución está en el orden de los ángstroms, haciendo posible en algunos casos observar estructuras atómicas. La limitación que tiene la técnica es que solo se puede analizar muestras lo suficientemente finas como para que los electrones puedan atravesarlas.

El principio de funcionamiento consiste en utilizar un haz de electrones acelerados para aprovechar el comportamiento ondulatorio de estos. El haz se enfoca al pasar por lentes magnéticas e incide sobre la muestra interaccionando con la misma. En este caso lo que se detecta son los electrones que logran atravesar la muestra, mediante una pantalla fluorescente colocada en la parte posterior de esta, donde se genera la imagen [61].

En este trabajo se utilizó la técnica para determinar la morfología, el tamaño de las partículas y la formación de estructuras tipo “core-shell” en las estructuras 0D.

2.6.5. Difracción de área seleccionada (SAED)

Es una técnica cristalográfica que se usa en conjunto con la microscopía TEM. En este caso se emplean los electrones que al interaccionar con los átomos de la muestra son difractados en diferentes ángulos. Esto da como resultado un patrón de difracción, que provee información acerca de la fase, composición y estructura cristalina del material. Es decir, es una técnica similar a la difracción de rayos X en cuanto a la información que se puede obtener, pero usando electrones en lugar de

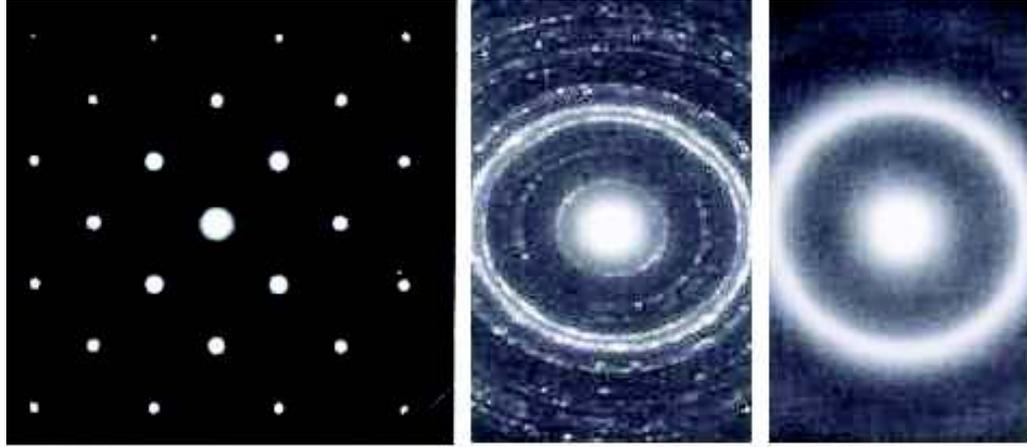


Figura 2.7: Difractogramas SAED de una muestra: a) cristalina, b) semicristalina y c) amorfa. Imagen tomada de [63].

radiación electromagnética [61].

Los difractogramas que se obtienen son imágenes en blanco y negro que están formados por puntos o anillos dependiendo de la estructura del material (Fig. 2.7). La intensidad y el tamaño de estos dan información sobre los elementos y compuestos presentes, así como los planos de difracción.

2.6.6. Espectroscopía de fotoluminiscencia

Es una técnica espectroscópica no destructiva y no invasiva que permite obtener información acerca de la estructura electrónica, la energía relativa de los estados excitados y estado base, las concentraciones de las especies emisoras y los mecanismos de relajación que siguen los sistemas luego de ser excitados [64].

El principio de la técnica consiste en hacer incidir luz sobre la muestra que, al absorber energía en forma de fotones, lleva a los electrones a un estado excitado. Cuando estos electrones regresan al estado base, en ciertos materiales, el exceso de energía se libera en forma de fotones de una longitud de onda menor a los de la fuente de

excitación. Esta luz es recolectada por medio de una fibra óptica y llevada hacia el espectroscopio para ser finalmente procesada y almacenada en una computadora.

Por lo general se utiliza como fuente de excitación luz ultravioleta, debido a que los fotones son lo suficientemente energéticos para llevar a los electrones a un estado excitado y activar la fotoluminiscencia.

Los espectros de emisión que se obtienen son curvas de intensidad en unidades arbitrarias (u.a.) en función de la longitud de onda.

2.6.7. Espectroscopía de impedancia compleja (EIS)

Es una técnica principalmente usada para caracterizar las propiedades dieléctricas de materiales sólidos [65]. Su funcionamiento consiste en la aplicación de una señal eléctrica alterna (AC) de excitación barriendo un rango de frecuencias, y se obtienen medidas de la impedancia en su parte real y compleja, capacitancia, entre otras, dependiendo del equipo. Esta información nos permite determinar propiedades del material como los procesos de conducción eléctrica, las contribuciones de las fases presentes en la muestra, la constante dieléctrica y su evolución con la frecuencia.

En este trabajo se usó la técnica para determinar cómo afectaban en las propiedades eléctricas, la adición de ZnO e hidroxiapatita, así como la arquitectura de las estructuras, especialmente en lo que se refiere a su capacitancia y constante dieléctrica.

Para el cálculo de la conductividad AC se utilizó la siguiente ecuación [66]:

$$\sigma_{ac} = \frac{Z'}{Z'^2 + Z''^2} \cdot \frac{d}{A}$$

Donde Z' y Z'' son la parte real e imaginaria de la impedancia, respectivamente, d es el espesor de la muestra y A es la superficie de la muestra en contacto con los

electrodos.

La constante dieléctrica se calculó usando la ecuación [66]:

$$\epsilon = \frac{C}{\epsilon_0} \cdot \frac{d}{A}$$

Donde C es la capacitancia, ϵ_0 es la permitividad en el vacío, d es el espesor y A es la superficie de la muestra.

Capítulo 3

Procedimiento Experimental y Técnicas de Caracterización

3.1. Síntesis de Estructuras

En el presente trabajo se han sintetizado estructuras con tres diferentes arquitecturas, usando como matriz al quitosano. Estas fueron: andamios tridimensionales (3D), membranas (2D) y nanopartículas (0D).

3.1.1. Síntesis de Estructuras 2D de Quitosano

Para la síntesis de las membranas se utilizó:

- Quitosano de la marca Aldrich con una pureza del 99%.
- Ácido acético.
- Hidróxido de amonio 28-30% de la marca Mallinckrodt.

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- Agitador magnético.

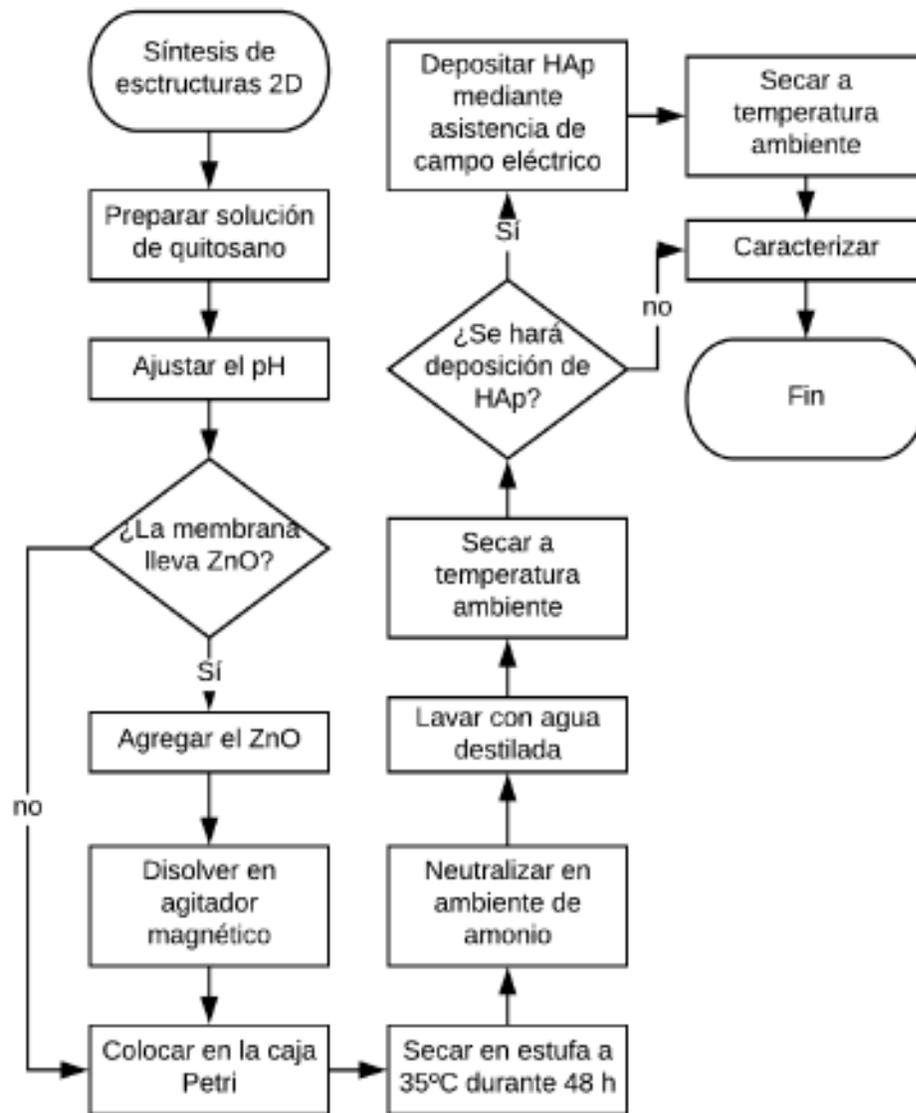


Figura 3.1: Diagrama del proceso para la síntesis de estructuras 2D.

- Estufa.
- Medidor de pH de la marca HANNA modelo HI2223
- Desecador

Se prepararon 100ml de quitosano (Fig. 3.1) en solución mediante el siguiente procedimiento: en un vaso de precipitación se colocó 99,5ml de agua destilada y

0,5ml de ácido acético y se agitó durante 5 minutos para obtener una solución estable al 0.5% en peso. A la solución se le agregó 1,5g de quitosano (equivalente al 1.5% en peso de la solución) y se dejó en agitación durante 4 horas hasta que el quitosano se disolvió completamente. Se obtuvo un líquido viscoso de un color ligeramente amarillento. Para alcanzar un pH de 4.5 se agregó ácido acético gota a gota (0,05ml/gota) cada 30 segundos. El valor del pH se escogió de acuerdo con lo reportado por Li et al. [27].

En cajas Petri plásticas, utilizando una jeringa, se colocó 12ml del quitosano en solución y se las llevó a una estufa durante 48 horas a una temperatura de 35°C. Lo que se obtiene son membranas delgadas y flexibles de una tonalidad amarillenta clara.

Las membranas fueron sometidas a un proceso de neutralización para fortalecer su estructura, puesto que se desintegraban al entrar en contacto con el agua. El proceso fue el siguiente: se colocó 30ml de hidróxido de amonio en un vaso de precipitación y se lo ubicó en el interior de un desecador para crear una atmósfera de amonio. Las membranas se colocaron dentro del desecador durante 18 horas y posteriormente fueron sacadas y lavadas con agua destilada para quitar el amonio de la superficie.

Finalmente, se dejaron secar a temperatura ambiente, y lo que se obtienen son membranas delgadas con una tonalidad amarillenta.

3.1.2. Síntesis de Estructuras 2D de Quitosano-ZnO

A demás de los materiales usados anteriormente, se utilizó:

- ZnO de la marca JT Baker con una pureza del 99,8%.

El procedimiento experimental seguido es el mismo del punto anterior (Fig. 3.1), hasta la obtención del quitosano en solución con un pH de 4.5. A partir de aquí se

hizo lo siguiente: en un vaso de precipitación se colocó 3ml de agua destilada y se le agregó $0,12\text{g}$ de ZnO (equivalente al 1% en peso), se dejó en agitación lenta durante 2 minutos y a continuación, usando una jeringa, se le agregó 12ml de la solución de quitosano y se dejó en agitación durante 30 minutos hasta que el ZnO se disolvió completamente. La solución resultante, un líquido viscoso de color amarillento, se colocó en una caja Petri plástica y se la llevó a la estufa a una temperatura de 35°C durante 48 horas.

Para recuperar el ZnO disuelto se hizo un proceso de neutralización en un ambiente de amonio siguiendo el mismo procedimiento anterior. Finalmente se obtiene una membrana delgada y flexible de color blanco, lo cual nos indica que se recuperó el ZnO disuelto mediante la neutralización.

3.1.3. Síntesis de Estructuras 3D de Quitosano

Los materiales y el procedimiento para la síntesis son los mismos que en el punto 3.1.1, salvo que en este caso se disolvió 2g de quitosano (equivalente al 2% en peso de la solución) en lugar de $1,5\text{g}$. Puesto que la concentración de quitosano es mayor, el tiempo en disolverse completamente fue de 6 horas. La solución obtenida es un líquido viscoso de un color amarillo oscuro, el cual se colocó en pozos de cultivo en una cantidad de 6ml por cada pozo, utilizando una jeringa y procurando que no se formen burbujas en el interior (Fig. 3.2).

Los pozos de cultivo se sometieron a un proceso de neutralización en una atmósfera de amonio durante 18 horas. Una vez finalizado el proceso, se retiraron las muestras del desecador obteniéndose estructuras con una consistencia de gel, las cuales fueron lavadas con agua destilada para retirar el amonio y se congelaron para ser sometidas posteriormente a un proceso de liofilización durante 24 horas a una temperatura de

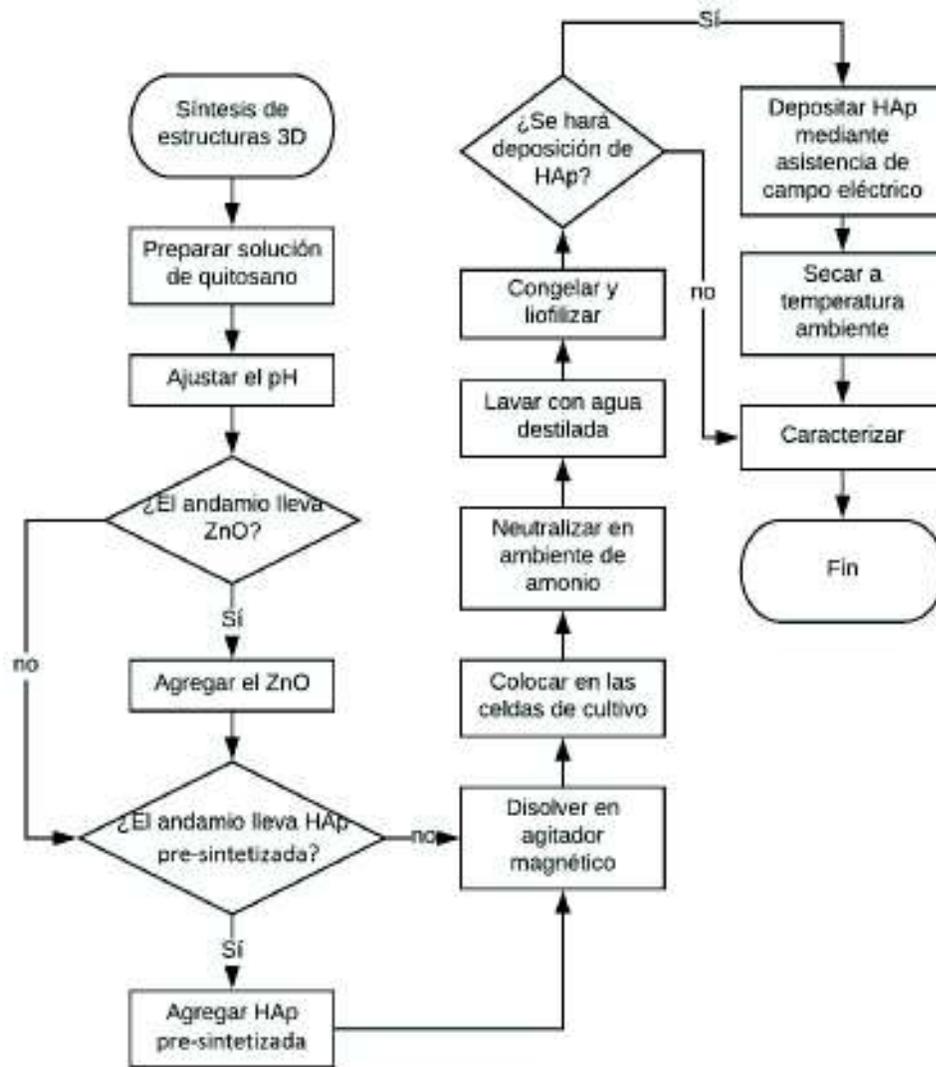


Figura 3.2: Diagrama del proceso para la síntesis de estructuras 3D.

40°C con el fin extraer toda el agua de la estructura.

Finalmente se obtuvieron andamios tridimensionales cilíndricos, porosos, de un color amarillento y fácilmente deformables.

3.1.4. Síntesis de Estructuras 3D de Quitosano-ZnO, Quitosano-Hidroxiapatita y Quitosano-ZnO-Hidroxiapatita

La hidroxiapatita utilizada en este proceso fue sintetizada en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) y tiene una pureza del 99%.

Para las estructuras que contienen ZnO el procedimiento experimental seguido es el mismo que en el punto anterior hasta obtener el quitosano en solución. Lo que se hizo a continuación fue colocar 0,12g de ZnO en 3ml de agua destilada y dejar durante 2 minutos en agitación lenta, luego con una jeringa se colocó 12ml de quitosano en solución y se dejó en agitación durante 30 minutos hasta que el ZnO se disolvió totalmente. La solución resultante, un líquido viscoso de color amarillento, se llevó a los pozos de cultivo, colocando 6ml por cada pozo.

El mismo proceso anterior se usó para la síntesis de los andamios de quitosano-hidroxiapatita.

Para los andamios con ZnO-hidroxiapatita el proceso es similar, considerando que en lugar de agregar 0,12g de ZnO o hidroxiapatita, en este caso se agregó 0,06g de ZnO y 0,06g de hidroxiapatita. La solución resultante es un líquido viscoso de color blanco.

En los tres casos las muestras fueron sometidas a un proceso de neutralización y liofilización bajo las mismas condiciones de las muestras anteriores.

Se obtuvieron andamios tridimensionales cilíndricos, porosos, de un color amarillento para los que contienen ZnO, y de color blanco para los que contienen hidroxiapatita y ZnO-hidroxiapatita.

3.1.5. Preparación de las soluciones para el Fluido Corporal Simulado (SBF)

Se siguió el protocolo propuesto por Bohner y Lemaitre [67] para la preparación de un fluido corporal simulado. Los reactivos y cantidades para preparar 1000mL de solución se encuentran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Reactivos usados para las soluciones SBF, siguiendo el protocolo [67].

Solución A		
Reactivo	Pureza (%)	Cantidad (gr.)
<i>NaCl</i>	98	3.1540
<i>NaHCO₃</i>	90	3.2879
<i>KCl</i>	99	0.2260
<i>K₂HPO₄ · 3H₂O</i>	99	0.2321
<i>MgCl₂ · 6H₂O</i>	99.5	0.3114
<i>Na₂SO₄</i>	99	0.0724
<i>HCl (mL/L)</i>	98	15
Solución B		
Reactivo	Pureza (%)	Cantidad (gr.)
<i>NaCl</i>	98	3.1540
<i>CaCl₂ · 2H₂O</i>	99	0.2934
<i>HCl (mL/L)</i>	98	15

Se prepararon dos soluciones: una conteniendo iones de Ca^+ (solución A) y otra conteniendo iones de PO_4^- (solución B) de tal manera que al combinarse forman al SBF.

El procedimiento fue el siguiente: todos los recipientes a usarse fueron lavados en una solución de HCl al 1%, enjuagados con agua ultra pura (destilada y desionizada) y secados en la estufa a $50^{\circ}C$.

Para la solución A: en un vaso de precipitación de $1L$ se colocó $375mL$ de agua ultra pura y los reactivos se agregaron uno por uno bajo agitación magnética, siguiendo el orden de la tabla, esperando que se disuelva cada reactivo completamente antes de añadir el siguiente. Para la solución B se siguió el mismo procedimiento. Las soluciones obtenidas fueron líquidos completamente transparentes, a los cuales se les agregó agua ultra pura hasta completar $500mL$ de solución en cada vaso de precipitación. Se dejó en agitación durante 10 minutos. Posteriormente se midió el pH, y se obtuvo un pH de 9.27 para la solución A y 3.81 para la solución B. Para almacenar las soluciones se las colocó en recipientes plásticos previamente lavados, y se los llevó a una nevera para mantenerlos a una temperatura aproximada de $4^{\circ}C$.

3.1.6. Deposición de hidroxiapatita en las estructuras 2D y 3D de quitosano asistida por un campo eléctrico

Utilizando las soluciones para el SBF, se hizo una deposición de hidroxiapatita asistida por campo eléctrico en las estructuras 2D y 3D de quitosano.

Los materiales usados para la deposición de la hidroxiapatita fueron los siguientes:

- Dos celdas cúbicas de acrílico conectadas mediante una abertura en la parte central (Fig. 3.3).
- Soluciones SBF.
- Fuente de voltaje DC variable, 0-15V, 1.5A.

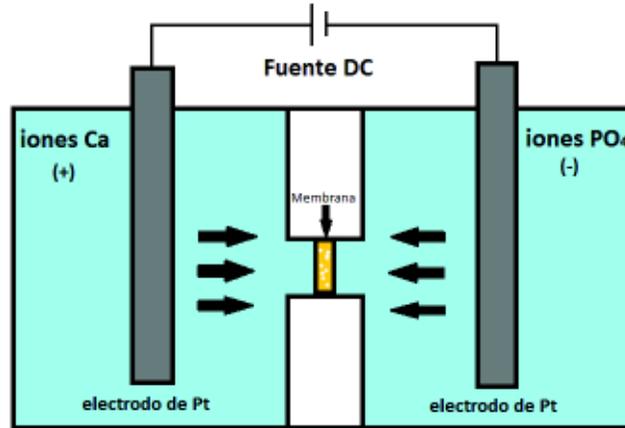


Figura 3.3: Esquema experimental del sistema de deposición de hidroxiapatita asistido por campo eléctrico.

- Electrodo de platino.
- Multímetro digital.

El procedimiento seguido para las estructuras 2D y 3D fue el siguiente: en la abertura central por donde se comunican las celdas se colocaron las membranas y andamios 3D. En cada lado de la celda se colocó 20mL de la solución A y B del SBF respectivamente. Se sumergieron los electrodos de platino en las soluciones y se aplicó un potencial eléctrico mediante la fuente de voltaje, conectando el polo positivo a la solución A (iones de Ca^{2+}) y el polo negativo a la solución B (iones de PO_4^{3-}), de tal manera que los iones migren hacia el centro de la celda donde está la estructura y se forme ahí la hidroxiapatita. Con ayuda del multímetro se midieron el voltaje y la corriente al iniciar la deposición, y la corriente al terminar el proceso.

Se consideraron diferentes voltajes entre 1V y 14V, y de acuerdo con los resultados, se escogieron 2 voltajes representativos, 7V y 14V, para obtener dos diferentes concentraciones de hidroxiapatita en las estructuras.

Para las membranas se aplicaron campos eléctricos de 7V y 14V durante 1 ho-

ra, mientras que para los andamios se aplicó durante 1 hora el de 7V y durante 30 minutos el de 14V; esto debido a que para tiempos más largos se observaba una desintegración de la estructura, atribuida al pH de la solución A.

Al terminar la deposición se observó la formación de una capa blanca sobre la superficie de las membranas y los andamios, siendo más notoria para las muestras donde se aplicó un potencial de 14V.

Finalmente, las muestras se colocaron en papel filtro durante 30 minutos a temperatura ambiente para secarlas completamente antes de caracterizarlas.

Se sometió a este proceso de deposición a las membranas de quitosano, membranas de quitosano-ZnO y andamios de quitosano-ZnO. No fue posible la deposición de hidroxiapatita en los andamios de quitosano mediante este método puesto que se desintegraban rápidamente al colocar las soluciones en las celdas.

3.1.7. Síntesis de Estructuras 0D (nanopartículas)

Para la síntesis de las nanopartículas se partió de las membranas ya sintetizadas. Se utilizaron las membranas de quitosano, quitosano-ZnO y quitosano-ZnO-hidroxiapatita. El equipo empleado fue un horno vertical con control de temperatura de la marca Eurotherm. Las muestras se colocaron en un crisol de alúmina y se sometieron a pirólisis en una atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 400°C durante 5 horas, a una tasa de calentamiento de 5°C por minuto y una tasa de enfriamiento de 10°C por minuto hasta llegar a temperatura ambiente. Para crear la atmósfera de nitrógeno se utilizaron globos llenos de N_2 y una manguera de silicona que conducía el gas hacia el interior del horno mediante una pequeña abertura (Fig. 3.4). Al finalizar

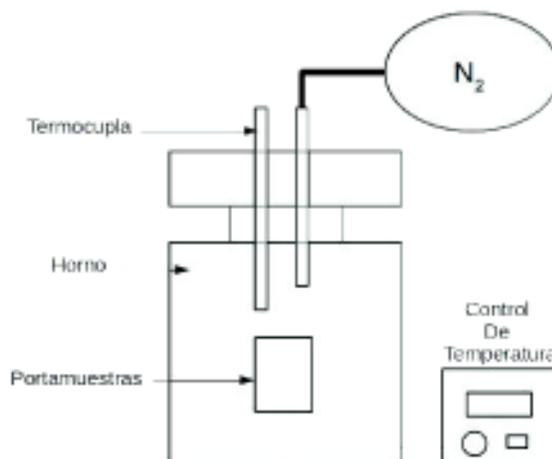


Figura 3.4: Esquema del montaje experimental usado para la obtención de estructuras 0D en un ambiente de nitrógeno.

el proceso se obtuvo un polvo grisáceo, con diferentes tonalidades dependiendo de las membranas pirolizadas.

3.2. Caracterización estructural y microestructural de las muestras

Las muestras obtenidas fueron analizadas estructuralmente mediante microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS), espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), y para las nanopartículas se hizo también microscopía electrónica de transmisión (TEM).

3.2.1. Microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS)

El equipo usado fue un microscopio FEI Inspect F50 con un voltaje de aceleración de 5-10keV, equipado con un detector EDAX 8500 para el análisis elemental.

A las muestras se las recubrió con una fina capa de carbono previo al análisis y se hizo la microscopía tanto a las membranas como a los andamios tridimensionales.

Se consideraron varias regiones de interés dentro cada estructura y se obtuvo tanto la micrografía como el análisis elemental (EDS) de cada región, esto para determinar la uniformidad de los compuestos ZnO e hidroxiapatita en la estructura, la morfología y la composición.

3.2.2. Espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR)

El equipo usado fue un Perkin Elmer Spectrum One, con un rango de medición de 450-4000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} .

Para los andamios tridimensionales se utilizó un trozo representativo de la estructura, de entre 0,5mg y 1mg, al cual se le agregó 100mg de *KBr* y se mezcló en un mortero. A la mezcla se la colocó en un troquel y se le aplicó una presión de 10000 psi para formar una pastilla, la que se usó para obtener los espectros.

Las membranas fueron analizadas mediante ATR-IR, puesto que no se pudieron moler para hacer pastillas con *KBr*. La desventaja al usar esta técnica es la reducción en el rango de medición (650-4000 cm^{-1}), lo cual no permite observar las bandas características del ZnO.

Esta técnica se usó principalmente para determinar los grupos funcionales pre-

sentas en las estructuras, que indican la presencia de un compuesto. En este caso son de interés el ZnO y la hidroxiapatita.

3.2.3. Difracción de Rayos X (DRX)

Se utilizó un difractómetro BRUKER-binary V2, con la radiación K_{α} del Cu ($\lambda = 1,54\text{\AA}$). Se trabajó con un voltaje de 40kV y una corriente de 30mA, barriendo ángulos 2θ desde 5° hasta 70° a una velocidad de $2^{\circ}/\text{min}$.

Mediante esta técnica se analizaron las membranas, andamios y nanopartículas, para determinar su estructura cristalina y la composición elemental de las muestras. No se requirió de ningún tipo de preparación de las muestras previo al análisis.

El programa usado para el análisis de los difractogramas fue el X'Pert HighScore Plus, con la base de datos ICDD PDF-2 Release 2002.

3.2.4. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Se utilizó un microscopio de la marca FEI TEM Spirit con un voltaje de aceleración de 120keV.

Las muestras fueron dispersadas en una solución agua/etanol y sonicadas durante 2 minutos. De esta dispersión se tomó una gota y se colocó en rejillas de Cu recubiertas con carbono.

Mediante esta técnica se analizaron las nanopartículas para determinar su morfología, tamaño y estructura cristalina.

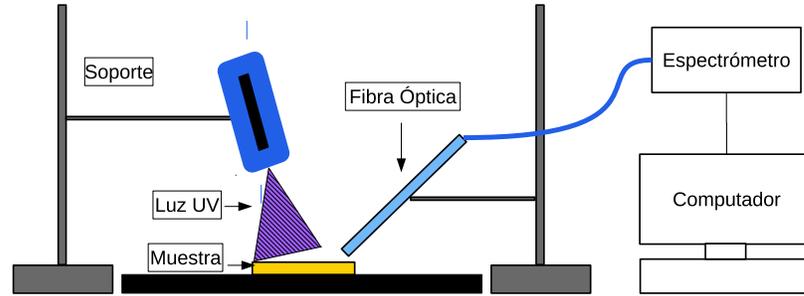


Figura 3.5: Esquema del montaje experimental para las mediciones de luminiscencia.

3.3. Caracterización Óptica

La propiedad óptica que se consideró medir es la luminiscencia, para lo cual se utilizó:

- Led UV de longitud de onda 385nm.
- Espectrómetro de la marca Ocean Optics modelo HR4000CG-UV-NIR.
- Fibra óptica de la marca Ocean Optics modelo P400-2-UV/VIS.
- Soportes.

Las muestras que se analizaron fueron las membranas, andamios tridimensionales y nanopartículas. No se realizó ningún tipo de preparación previo a las medidas a excepción de las nanopartículas, las cuales fueron compactadas en formas de discos (pastillas).

Se hizo un montaje experimental de acuerdo con la Fig. 3.5. Las muestras se colocaron sobre una superficie negra (para evitar el reflejo de luz) y fueron excitadas con el diodo led UV de tal manera que todo el haz quede dentro de la superficie de la muestra. Se mantuvo siempre una distancia constante entre la fuente de excitación, la muestra y la fibra óptica encargada de coleccionar la luz. Los datos fueron recolec-

tados en la computadora por medio del programa “Spectra Suite”. Se consideró un promedio de 5 medidas y un tiempo de integración de 5 segundos.

3.4. Caracterización Eléctrica

Para la caracterización eléctrica se usaron técnicas de impedancia. Las variables medidas fueron: impedancia y capacitancia. A partir de estos datos se calculó la conductividad y la constante dieléctrica.

El equipo usado fue un analizador de impedancias marca Hewlett-Packard, modelo 4294A, cuyo rango de frecuencias va de 40Hz hasta 110MHz y permite una medición continua en todo el rango.

Para las membranas se utilizaron dos contactos conductores a manera de electrodos, conectados al analizador de impedancias. Se colocaron las membranas entre los contactos y se sujetaron aplicando una presión constante utilizando una pinza. Las mediciones se hicieron en todo el rango de frecuencias, y se utilizó un nivel de oscilación de 500mV.

Para los andamios tridimensionales, debido a su tamaño y porosidad se decidió usar contactos adhesivos de grafito como electrodos, los cuales se colocaron en las dos superficies planas de la muestra, y a la vez se pegaron en los contactos conductores conectados al analizador de impedancias. Las mediciones se hicieron en todo el rango de frecuencias, y se utilizó un nivel de oscilación de 500mV.

Para medir las propiedades en las nanopartículas se las compactó en discos de 7[mm] de diámetro utilizando un troquel y aplicando una presión de 6000 psi con

una prensa hidráulica. Una vez obtenido el disco se le aplicó una capa conductora de plata a manera de electrodo en cada lado de la pastilla; para esto el procedimiento fue el siguiente: con un pincel se colocó una capa de pintura delgada de plata coloidal sobre una de las superficies de la pastilla cuidando de no pintar los bordes, se llevó a la estufa durante 10 minutos a 60°C , se colocó otra capa de pintura uniformizando la superficie y se la llevó a la estufa durante 15 minutos a 150°C para secar la plata, se repitió el procedimiento con la otra superficie de la pastilla. Una vez hecho esto se colocó la pastilla entre los contactos conductores conectados al analizador de impedancias, y se los sujetó con una pinza a una presión constante. Las mediciones se hicieron en todo el rango de frecuencias, y se utilizó un nivel de oscilación de 500mV.

Los datos fueron obtenidos en una computadora a través de una hoja de cálculo en Excel provista por el fabricante del equipo.

Capítulo 4

Resultados y Análisis

4.1. Caracterización estructural y microestructural

Las muestras obtenidas fueron analizadas estructural y microestructuralmente mediante microscopía electrónica de barrido con análisis elemental (SEM-EDS), espectroscopía infrarroja por análisis de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), y para las nanopartículas se hizo también microscopía electrónica de transmisión (TEM). El tamaño de las partículas fue analizado con el programa “ImageJ”.

4.1.1. Estructuras 2D

Membranas de quitosano

En el análisis FTIR (Fig. 4.1) se identificaron las bandas 1549 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} y 1017 cm^{-1} que son características del quitosano y están determinadas por las vibraciones ($-C=O$) del grupo amida, $\delta(OH)$, ($C=O$) de la desacetilación del quitosano y ($C-O$) respectivamente [68–70]. La banda 1549 cm^{-1} puede atribuirse a la vibración ($-NH_3^+$) relacionada al acetato de quitosano [46].

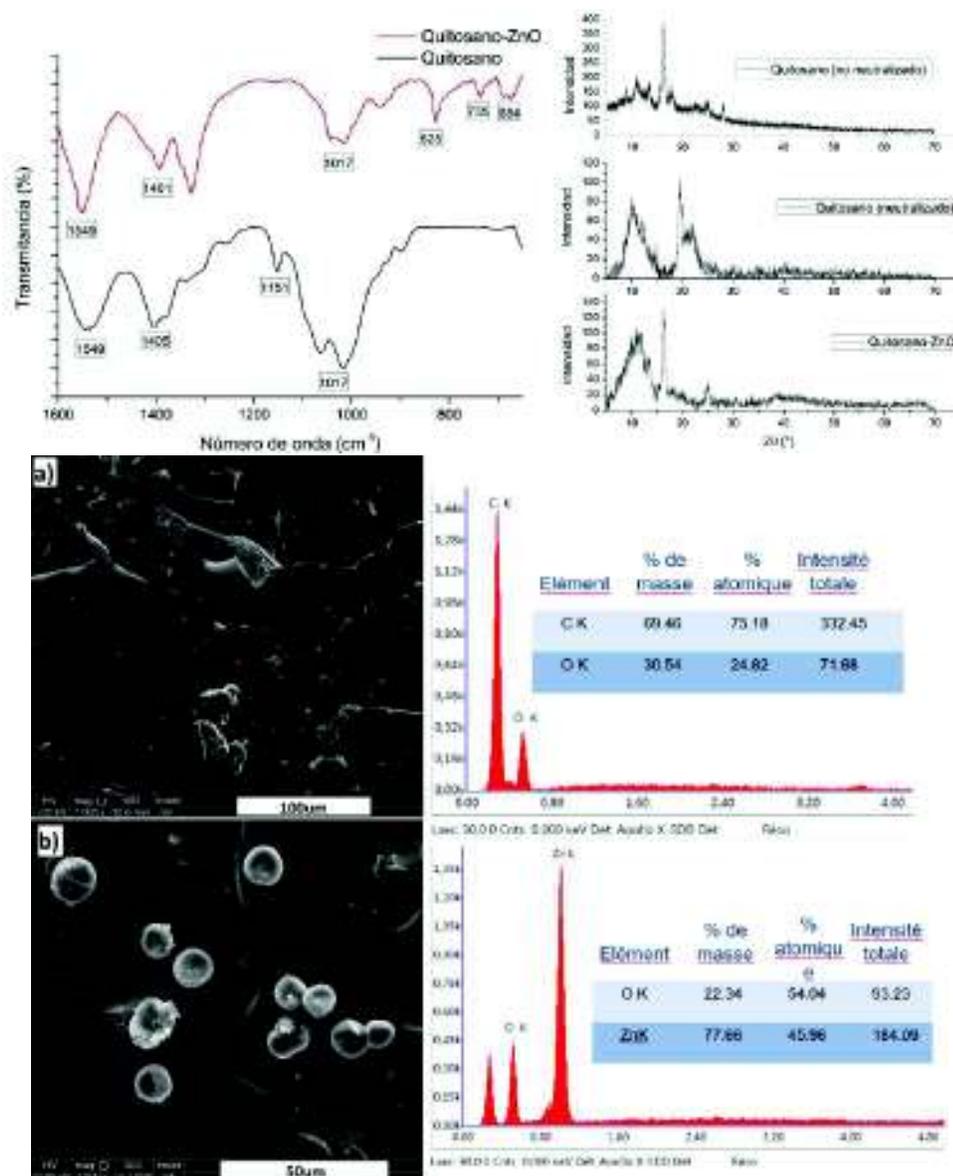


Figura 4.1: Caracterización estructural de membranas de: a) quitosano y b) quitosano-ZnO.

El difractograma de DRX (Fig. 4.1) tiene dos picos de difracción para ángulos $2\theta = 11^\circ$ y $2\theta = 22^\circ$, que corresponden al quitosano (PDF 00-039-1894) [68], e indican que el material es puro y además semicristalino, lo cual se evidencia en el ensanchamiento de los picos.

Las micrografías SEM de la membrana (Fig. 4.1) muestran una superficie irregular con bordes bien definidos, así como pequeñas aglomeraciones del material en ciertos

puntos. El análisis elemental por EDS (Fig. 4.1) indica que su composición posee C y O, correspondientes al quitosano.

Membranas de quitosano-ZnO

En el análisis FTIR (Fig. 4.1) se identifican las bandas correspondientes al quitosano, aún más definidas. Las bandas 1151 cm^{-1} y 1017 cm^{-1} reducen considerablemente su intensidad, indicando que el ZnO se ancla a la estructura por el grupo carbonilo ($C=O$) y el grupo ($C-O$). Además, aparece la banda 684 cm^{-1} atribuido a las vibraciones ($Zn-O$) del ZnO [52], y las bandas 825 cm^{-1} , 725 cm^{-1} que se atribuyen a una interacción del quitosano con el ZnO.

El difractograma de DRX (Fig. 4.1) tiene picos de difracción en ángulos $2\theta = 10^\circ$, 16° y 22° , correspondientes al quitosano (PDF 00-039-1894) [68]. Se observan picos muy pequeños en la región entre $2\theta = 35^\circ$ y $2\theta = 50^\circ$, asignados al ZnO hexagonal (PDF 00-001-1150) [3, 14].

Las micrografías SEM (Fig. 4.1) muestran una superficie irregular y porosa de las membranas, sobre la cual se adhieren las partículas de ZnO, cuya morfología es similar a una dona y su diámetro promedio es de $10.93\text{ }\mu\text{m}$ con una desviación estándar de $\sigma = 1.37\text{ }\mu\text{m}$. El análisis elemental EDS (Fig. 4.1) en las partículas indica que su composición es Zn y O, lo cual significa que mediante el proceso de neutralización se recuperó el ZnO.

Membranas de quitosano-hidroxiapatita

En el análisis FTIR (Fig. 4.2) se identifican las bandas 1151 cm^{-1} y 1398 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70]. Además, existe un corrimiento en la banda 1017 cm^{-1} , dando lugar a las bandas 1033 cm^{-1} y 1091 cm^{-1} , que corresponden a los grupos fosfatos (PO_4) y son características de la hidroxiapatita [6, 18, 53], siendo más notorias en las muestras sintetizadas con un campo eléctrico de 7V.

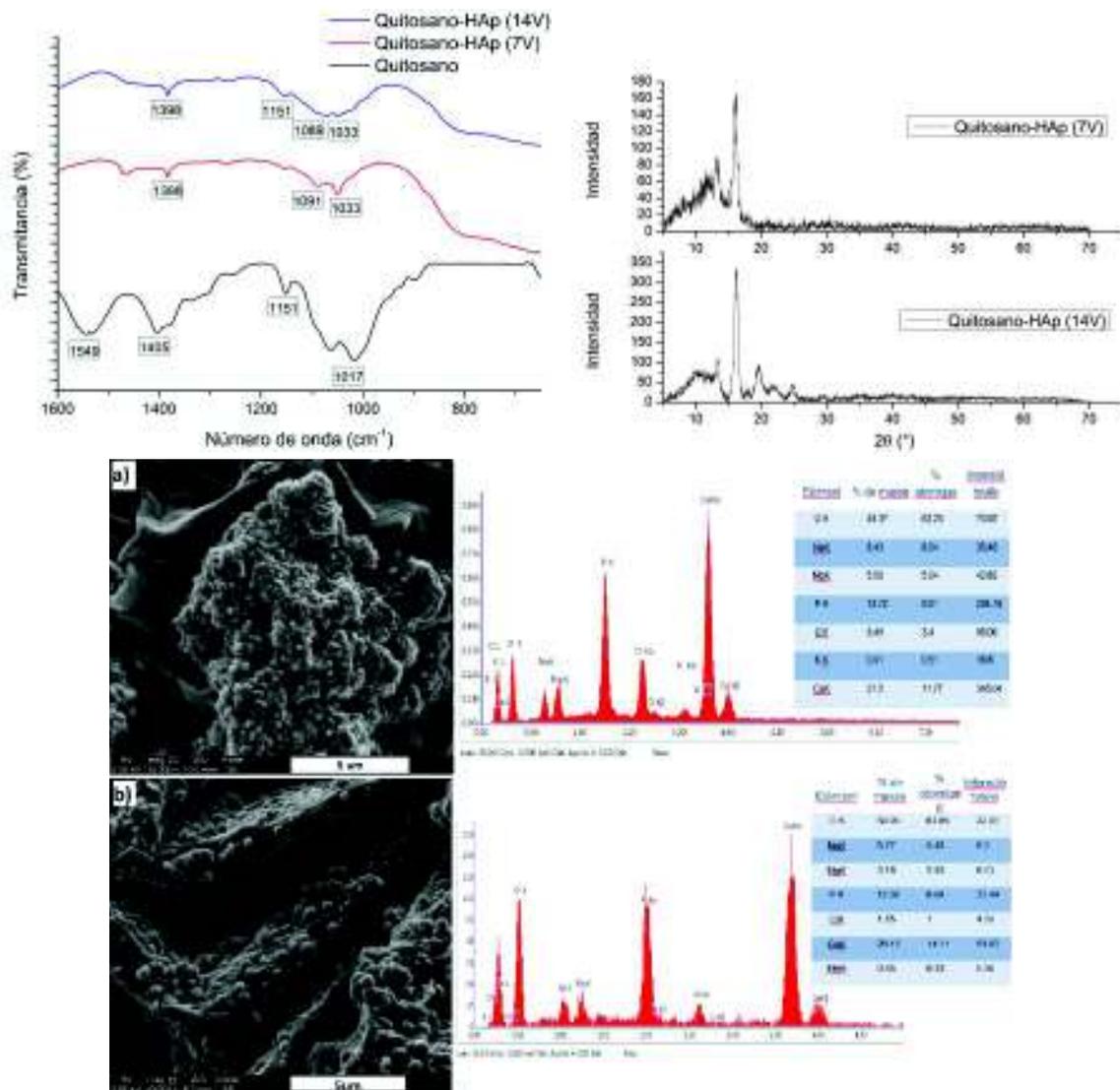


Figura 4.2: Caracterización estructural de membranas de quitosano-hidroxiapatita con deposición de HAp en campos de: a) 7V y b) 14V.

Los difractogramas de DRX (Fig. 4.2) muestran picos de difracción para ángulos $2\theta = 10^\circ, 16^\circ$ y 22° , correspondiente al quitosano (PDF 00-039-1894) [68], $2\theta = 13^\circ, 20^\circ, 22^\circ, 25^\circ$ correspondientes al fosfato de calcio hidratado (PDF 00-001-0471), siendo más definidos para el caso de la síntesis en un campo eléctrico de 14V.

Las micrografías SEM (Fig. 4.2) muestran para los dos casos una superficie irregular sobre la cual se adhieren partículas de forma esférica, distribuidas uniformemente en las muestras sintetizadas a 14V, y formando aglomeraciones en forma de ramillete

para las muestras sintetizadas a 7V. El diámetro promedio de las partículas es de 1.93 [μm] con una desviación de $\sigma = 0.53$ [μm], y 291.75 [nm] con $\sigma = 90$ [nm] para las muestras sintetizadas a 14V y 7V respectivamente. Los análisis EDS (Fig. 4.2) indican la presencia de Ca y P, en una proporción de Ca/P=1.31 y Ca/P=1.63 en los casos de síntesis en campos de 7V y 14V, respectivamente; además de otros elementos derivados de las soluciones SBF. Las proporciones Ca/P corresponden a un fosfato de calcio (precursor de la hidroxiapatita) e hidroxiapatita.

Membranas de quitosano-ZnO-hidroxiapatita

En el análisis FTIR (Fig. 4.3) se identifican las bandas 1549 cm^{-1} y 1401 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70], la banda 684 cm^{-1} de las vibraciones del ZnO [52], las bandas 825 cm^{-1} , 735 cm^{-1} correspondientes a interacciones del ZnO con el quitosano, y un corrimiento de la banda 1017 cm^{-1} , dando lugar a las bandas 1030 cm^{-1} y 1026 cm^{-1} correspondientes a los grupos fosfatos (PO_4) [6, 18, 53]. El espectro obtenido de las muestras sintetizadas a 14V tiene un perfil correspondiente con el de la hidroxiapatita nanométrica.

Las micrografías SEM (Fig. 4.3) muestran superficies totalmente cubiertas por partículas de forma esférica, cuya distribución es uniforme en muestras sintetizadas a 7V y 14V. Se puede observar que partículas pequeñas recubren a otras más grandes, posiblemente de ZnO. Los diámetros promedio de las partículas son 1.02 [μm] con una desviación de $\sigma = 0.35$ [μm], y 790.12 [nm] con $\sigma = 81$ [nm] en los casos de síntesis a 14V y 7V, respectivamente. El análisis elemental EDS (Fig. 4.3) indica la presencia de Zn, O, Ca, P, así como otros elementos derivados del SBF.

Efectos del campo eléctrico en la deposición de hidroxiapatita

Se encontró que el tamaño de las partículas de hidroxiapatita que se forman en las membranas depende del campo eléctrico aplicado. Se consiguió un tamaño ma-

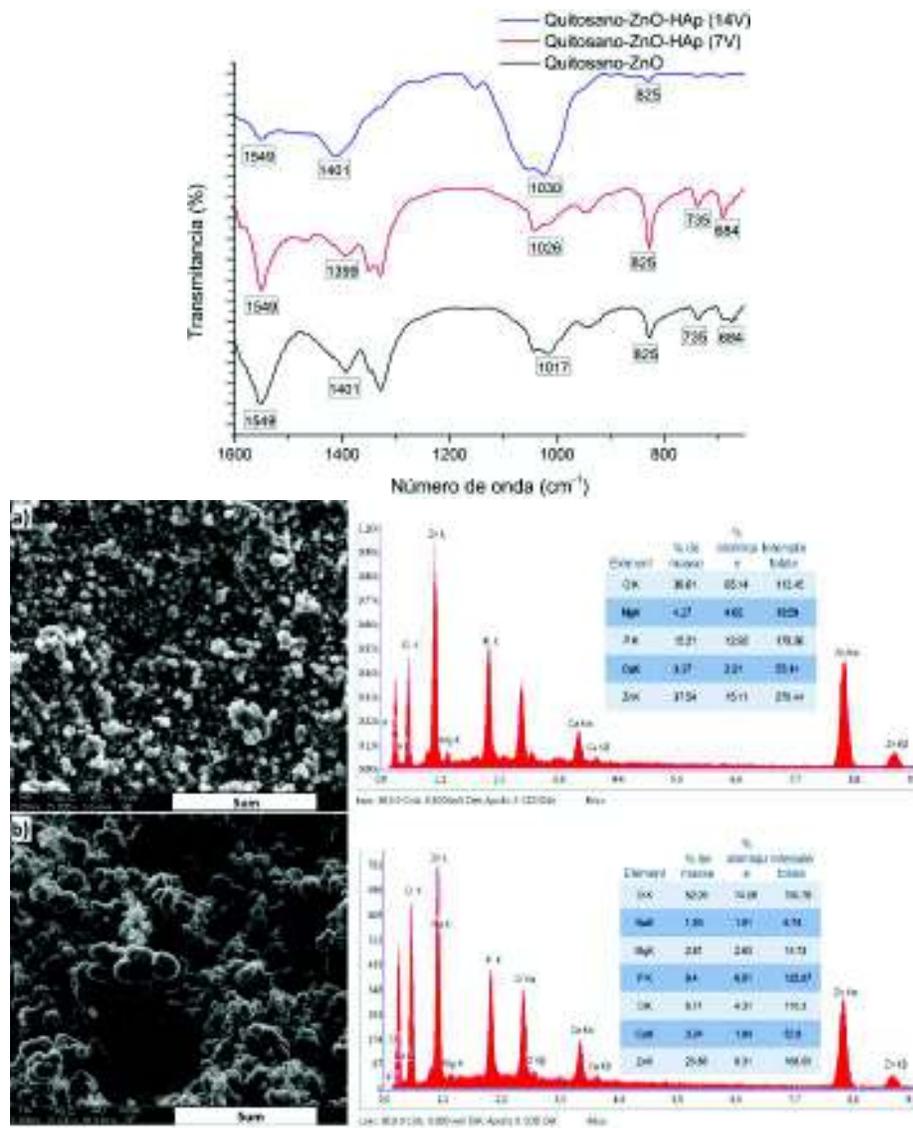


Figura 4.3: Caracterización estructural de membranas de quitosano-ZnO-hidroxiapatita con deposición de HAp en campos de: a) 7V y b) 14V.

yor para campos de 14V y menor para campos de 7V. Esto puede explicarse por la migración de iones más rápida en campos eléctricos mayores, lo cual favorece la formación de material (nucleación y crecimiento) de manera acelerada. En cuanto a la morfología, ésta no depende del campo eléctrico aplicado, puesto que siempre se consiguen partículas esféricas con una gran uniformidad.

Tanto los resultados del análisis elemental como las micrografías sugieren que la hidroxiapatita está envolviendo las partículas de ZnO en lugar de producirse únicamente

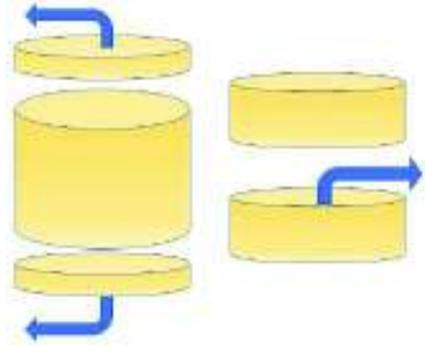


Figura 4.4: Esquema de los cortes analizados mediante SEM en andamios tridimensionales: extremos externos e internos (izquierda) y sección transversal (derecha).

una mezcla. En cada área y punto en que se hizo el análisis EDS se encontró que estaba presente Zn, O, Ca y P.

4.1.2. Estructuras 3D

El análisis por SEM fue realizado en el corte transversal y en los extremos externos e internos (tapas) de los andamios de acuerdo con el esquema (Fig. 4.4). Sin embargo, solo se muestran las micrografías correspondientes a las secciones transversales puesto que son las de mayor interés.

Andamios de quitosano

En el análisis FTIR (Fig. 4.5) se identifican las bandas 1405 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1017 cm^{-1} y 615 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70].

Las micrografías SEM (Fig. 4.5) del corte transversal de la estructura muestran porosidades macrométricas (entre 200 y 400 $[\mu\text{m}]$) de una forma hexagonal a lo largo de toda la muestra, y se identifican esferas nanométricas aisladas sobre toda la estructura. El análisis elemental EDS (Fig. 4.5) indica que la composición de la estructura y las esferas contiene C y O, lo que sugiere que una cierta cantidad de quitosano precipitó durante la síntesis de las estructuras.

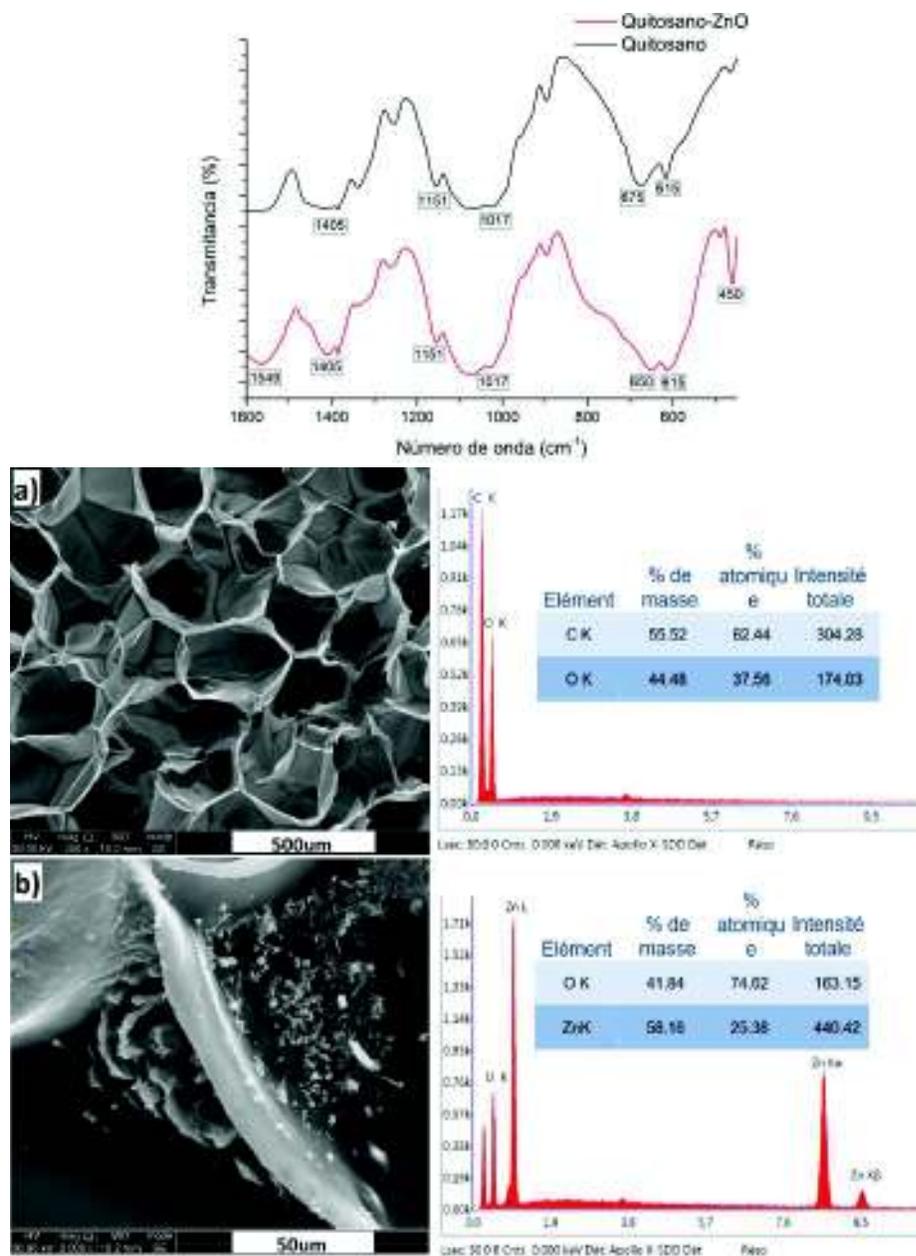


Figura 4.5: Caracterización estructural de andamios 3D de: a) quitosano y b) quitosano-ZnO.

Andamios de quitosano-ZnO

En el análisis FTIR (Fig. 4.5) se identifican las bandas 1549 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} , 1017 cm^{-1} y 615 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70], la banda 450 cm^{-1} que corresponde a las vibraciones $Zn - O$ [30, 52] y la banda 650 cm^{-1} debido a la interacción del ZnO con el quitosano.

Las micrografías SEM (Fig. 4.5) del corte transversal muestran macroporosidades sin una forma definida a lo largo de toda la estructura, y sobre ésta se observa un material adherido mayormente sobre los filos y esquinas, el cual no tiene una forma bien definida. El análisis elemental EDS (Fig. 4.5) indica la presencia de Zn, O y C sobre la estructura.

Andamios de quitosano-ZnO-HAp

En el análisis FTIR (Fig. 4.6) se identifican las bandas 1405 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} y 615 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70], la banda 1029 cm^{-1} correspondiente a los grupos fosfatos (PO_4) [6, 18, 53], y las bandas 452 cm^{-1} , 453 cm^{-1} y 675 cm^{-1} correspondientes al ZnO [30, 52].

Las micrografías SEM (Fig. 4.6) para muestras sintetizadas a 7 V muestran macroporosidades a lo largo de toda la muestra en el corte transversal, y se observan también partículas nanométricas esféricas aglomeradas y adheridas cubriendo gran parte de la estructura, con un diámetro promedio de 181.63 nm; en las micrografías de las tapas no se observa deposición de material. El análisis elemental EDS indica (Fig. 4.6) que en su composición las partículas tienen Zn, O, Ca y P. La proporción Ca/P es igual a 1.50, que corresponde a la hidroxiapatita (deficiente de calcio).

Las micrografías para muestras sintetizadas a 14V (Fig. 4.6) muestran en el corte transversal macroporosidades sin forma definida, y un material recubriendo pequeñas partes de la estructura; en las micrografías de las tapas se observa la formación de partículas esféricas nanométricas en ciertas regiones de la muestra. El análisis elemental por EDS (Fig. 4.6) indica la presencia de Zn, O, Ca y P. La proporción Ca/P es igual a 1.34, correspondiente a un fosfato de calcio.

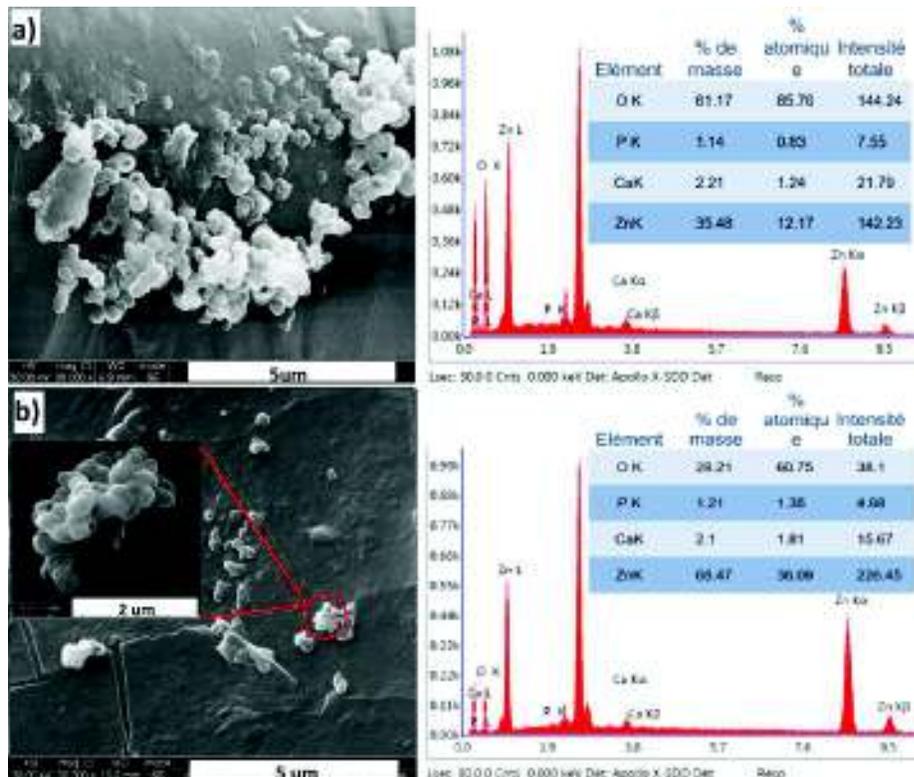
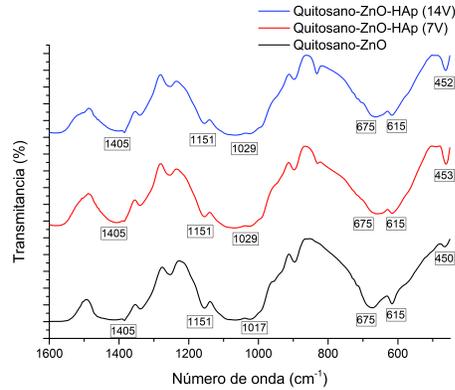


Figura 4.6: Caracterización estructural de andamios 3D de quitosano-ZnO-hidroxiapatita con deposición de HAp en campos de: a) 7V y b) 14V.

Efectos del campo eléctrico en la deposición de hidroxiapatita

En la síntesis a 7V se consigue una mejor penetración y distribución de la hidroxiapatita en la parte interna de la estructura, mientras que en la síntesis a 14V la mayor parte de hidroxiapatita se forma sobre las tapas y muy poca cantidad en la sección transversal.

Cuando el campo eléctrico aplicado es mayor (14V), no se consigue la formación de

partículas en la misma cantidad y morfología como en el caso con un campo eléctrico menor (7V). Esto puede deberse a que el tiempo durante el que se aplicó el campo de 14V fue un 50 % menor en relación al de 7V para evitar la degradación de la estructura, lo cual hizo que el proceso de nucleación y crecimiento no se complete en todo el material de una manera uniforme, afectando el tamaño y la morfología de las partículas.

Andamios de quitosano-hidroxiapatita (pre-sintetizada)

En el análisis FTIR (Fig. 4.7) se identifican las bandas 1405 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} y 615 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70], y la banda 1033 cm^{-1} correspondiente a los grupos fosfatos (PO_4).

Las micrografías SEM (Fig. 4.7) muestran un material encapsulado sobre toda la estructura del andamio. El análisis elemental EDS (Fig. 4.7) indica que el material está compuesto por Ca y P, en una proporción Ca/P= 1.69, correspondiente a la hidroxiapatita. Estas muestras resultaron frágiles a la manipulación.

Andamios de quitosano-ZnO-hidroxiapatita (pre-sintetizada)

En el análisis FTIR (Fig. 4.7) se identifican las bandas 1405 cm^{-1} , 1151 cm^{-1} y 615 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68–70], y la banda 1029 cm^{-1} correspondiente a los grupos fosfatos (PO_4) [6, 18, 53], con un corrimiento debido a la interacción con el ZnO, y las bandas 684 cm^{-1} y 450 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones del ZnO [30, 52].

En las muestras se formó una superficie externa densa de un lado del andamio, aparentemente no porosa, y una superficie externa porosa del otro lado del andamio. Las micrografías SEM (Fig. 4.7) muestran que en la superficie densa existen microporos, sin una forma definida, y se observa un material adherido sobre toda la estructura formando aglomeraciones; la superficie porosa muestra macroporos de una forma

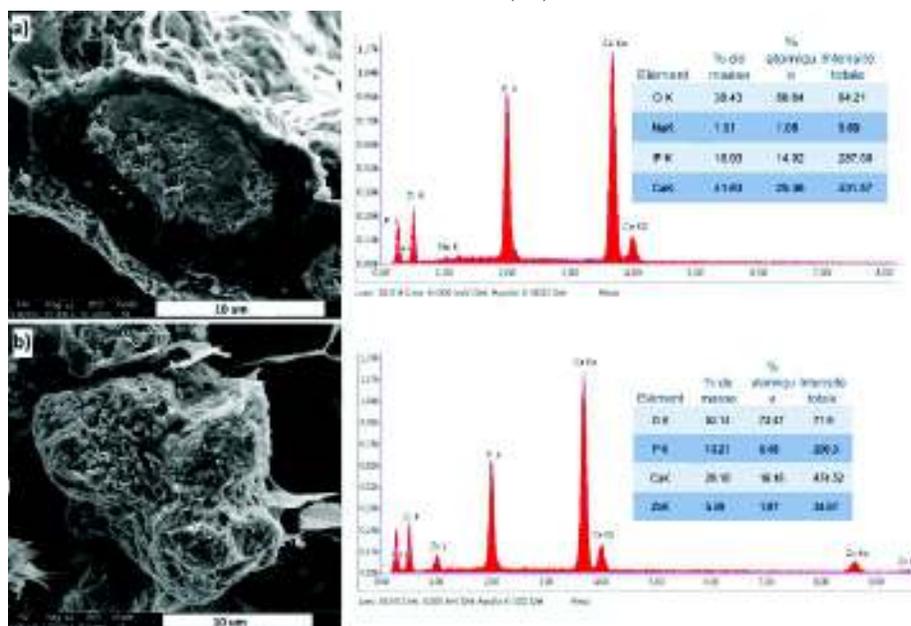
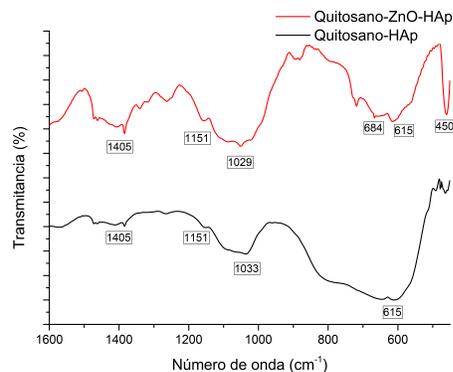


Figura 4.7: Caracterización estructural de andamios 3D de: a) quitosano-hidroxiapatita y b) quitosano-ZnO-hidroxiapatita, con HAp pre-sintetizada.

aparentemente circular y un material adherido sobre toda la estructura formando aglomeraciones. El análisis elemental EDS (Fig. 4.7) en las dos superficies indica la presencia de Ca, P, Zn, O, Na, Mg. La proporción Ca/P del material que recubre la estructura es Ca/P=1.70, correspondiente a la hidroxiapatita.

Comparación entre andamios con hidroxiapatita depositada e hidroxiapatita pre-sintetizada

Los andamios con hidroxiapatita pre-sintetizada se fabricaron debido a la desintegración de la estructura que se producía al poner en contacto los andamios de

quitosano con las soluciones SBF debido al pH ácido de la solución B. La adición de ZnO al quitosano mostró, cualitativamente, un reforzamiento en la estructura, permitiendo en este caso hacer una deposición de hidroxiapatita asistida por campo eléctrico en los andamios de quitosano-ZnO.

La principal diferencia observada en las micrografías y análisis EDS es que, al depositar hidroxiapatita en los andamios, ésta parece recubrir las partículas de ZnO dando lugar a la formación de estructuras tipo “core-shell”, mientras que con la hidroxiapatita pre-sintetizada ocurre simplemente una mezcla hidroxiapatita-ZnO, la cual es encapsulada por el quitosano debido a la forma en que se sintetizaron estas estructuras.

En todos los casos los andamios presentan una gran porosidad con tamaños en el orden de las micras. Esta característica las hace interesantes para aplicaciones en ingeniería de tejidos, en donde se requieren poros grandes que permitan la migración e intercambio celular a través de las estructuras.

4.1.3. Estructuras 0D

Estas estructuras en forma de polvo se obtuvieron al pirolizar en un ambiente de nitrógeno las membranas de quitosano-ZnO, quitosano-HAp (14V) y quitosano-ZnO-HAp (14V). El tamaño de las partículas fue calculado mediante el programa “ImageJ”.

Quitosano-ZnO

Las micrografías TEM (Fig. 4.8) muestran partículas con forma de hojuelas rodeadas por una capa delgada, formando una estructura tipo “core-shell”. El tamaño promedio de las partículas es de 14.28 [nm] con una desviación estándar de $\sigma = 4.50$ [nm], mientras que el espesor promedio de la capa que las rodea es de 3.54 [nm] con una desviación $\sigma = 1.41$ [nm]. El análisis elemental (Fig. 4.8) indica que la muestra

contiene C , O y Zn .

En el análisis FTIR (Fig. 4.9) se identifican las bandas 1549 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} y 1017 cm^{-1} correspondientes a las vibraciones ($-C = O$) del grupo amida, $\delta(OH)$ y ($C = O$) [68, 69], indicando la presencia de una película muy fina de quitosano sobre las partículas, que es la que forma la estructura tipo “core-shell”. Además, se observan las bandas 825 cm^{-1} y 735 cm^{-1} correspondientes al ZnO .

El patrón de difracción obtenido mediante la técnica SAED (Fig. 4.9) presenta anillos concéntricos difusos de diferentes intensidades, lo cual indica que el material está compuesto por un gran número de granos distribuidos de manera aleatoria, con diferentes orientaciones. Es decir, es un material policristalino.

Quitosano-HAp

Las micrografías de TEM (Fig. 4.8) presentan partículas cuya forma es similar a hojuelas, rodeadas de lo que parece ser restos de la membrana de quitosano. El tamaño promedio de las partículas es de 21.35 [nm] con una desviación estándar de $\sigma = 7.69\text{ [nm]}$, y el espesor promedio de la capa que las rodea es de 12.11 [nm] con una desviación de $\sigma = 3.11\text{ [nm]}$. El análisis elemental EDS (Fig. 4.8) indica la presencia de elementos como C , Ca , P , O y Na , donde la proporción Ca/P es de 1.47, correspondiente a un fosfato de calcio.

En el análisis FTIR (Fig. 4.9) se identifican las bandas 1405 cm^{-1} y 1151 cm^{-1} que corresponden al quitosano [68, 69], y la banda 1033 cm^{-1} característica de los grupos fosfatos de la hidroxiapatita [6, 18, 53].

El patrón de difracción SAED (Fig. 4.9) presenta anillos concéntricos con un patrón

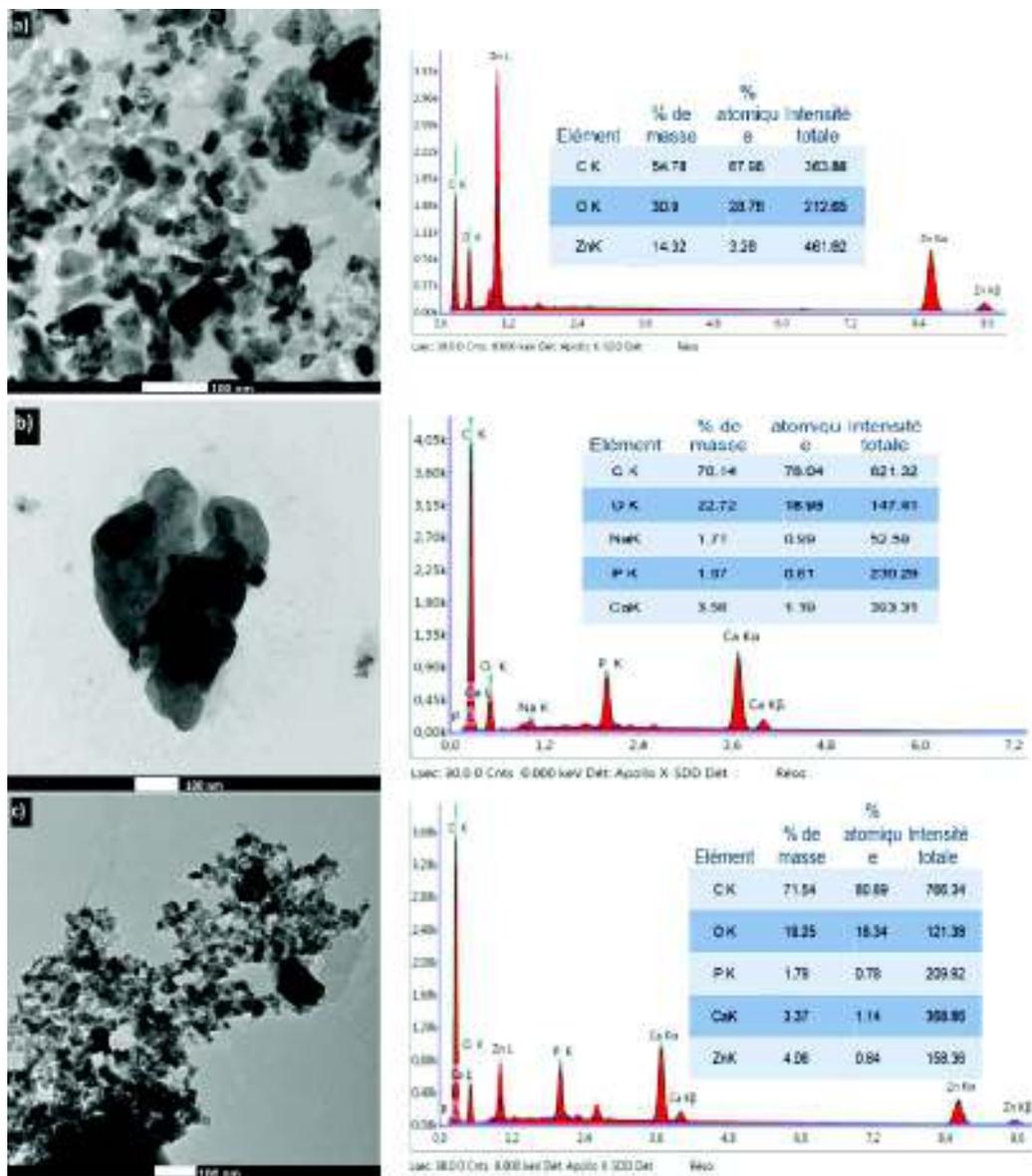


Figura 4.8: Caracterización TEM y EDS de las estructuras 0D: a) Quitosano-ZnO, b) Quitosano-HAp y c) Quitosano-ZnO-HAp.

muy definido, esto significa que el material es policristalino, y los nanocristales tienen diferentes orientaciones.

Quitosano-ZnO-HAp

En las micrografías de TEM (Fig. 4.8) se observan partículas en forma de hojuelas rodeadas por una capa delgada formando estructuras tipo “core-shell”. El tamaño

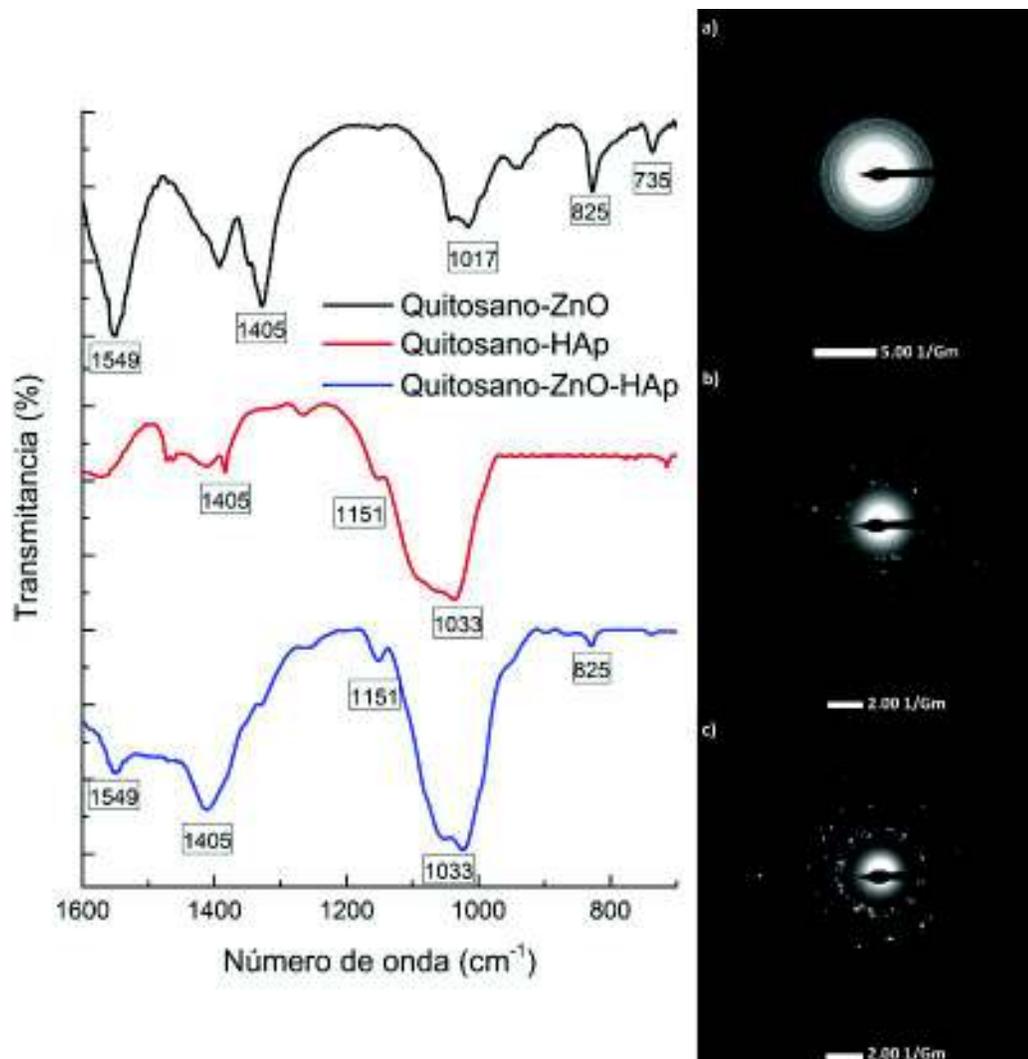


Figura 4.9: Caracterización FITR y DRX de las estructuras 0D: a) Qitosano-ZnO, b) Qitosano-HAp y c) Qitosano-ZnO-HAp.

promedio de las partículas es de 7.11 [nm] con una desviación estándar de $\sigma = 2.36$ [nm], mientras que la capa que rodea las partículas tiene un espesor promedio de 3.16 [nm] con una desviación de $\sigma = 1.12$ [nm]. El análisis elemental EDS (Fig. 4.8) indica la presencia de *C*, *O*, *Ca*, *P* y *Zn*, donde la proporción *Ca/P* es 1.46, correspondiente a un fosfato de calcio.

En el análisis FTIR (Fig. 4.9) se identifican las bandas 1549 cm^{-1} , 1405 cm^{-1} ,

1151 cm^{-1} y 1017 cm^{-1} correspondientes al quitosano [68,69], la banda 1033 cm^{-1} de los grupos fosfato de la hidroxiapatita [6, 18, 53] y la banda 825 cm^{-1} perteneciente al ZnO.

El patrón de difracción SAED (Fig. 4.9) obtenido presenta círculos concéntricos bien definidos, lo que significa que el material es policristalino, con nanocristales en diferentes orientaciones.

Resultados del proceso de pirólisis

En todos los casos se observa, tanto en el TEM como en los análisis FTIR y EDS, que luego de la pirolización quedan restos de membrana rodeando las partículas de ZnO e hidroxiapatita. Esto puede atribuirse a una falta de tiempo en el proceso de pirólisis, impidiendo que las membranas se pulvericen completamente. Desde el punto de vista de biocompatibilidad es un resultado positivo, puesto que se conservan las propiedades del quitosano, asegurando que las nanopartículas obtenidas tendrán un alto grado de biocompatibilidad.

4.2. Caracterización óptica

Como se mencionó anteriormente, estos materiales poseen propiedades de luminiscencia, lo cual los hace interesantes para posibles aplicaciones en dispositivos de bioimagen, marcadores luminiscentes, entre otros. Por ello, se consideró medir la fotoluminiscencia utilizando como fuente de excitación un diodo led ultravioleta.

Con el programa Origin se hizo curvas de ajuste a los espectros recolectados de las estructuras 2D para tratar de determinar el aporte de cada material (quitosano, ZnO e hidroxiapatita) en la luminiscencia.

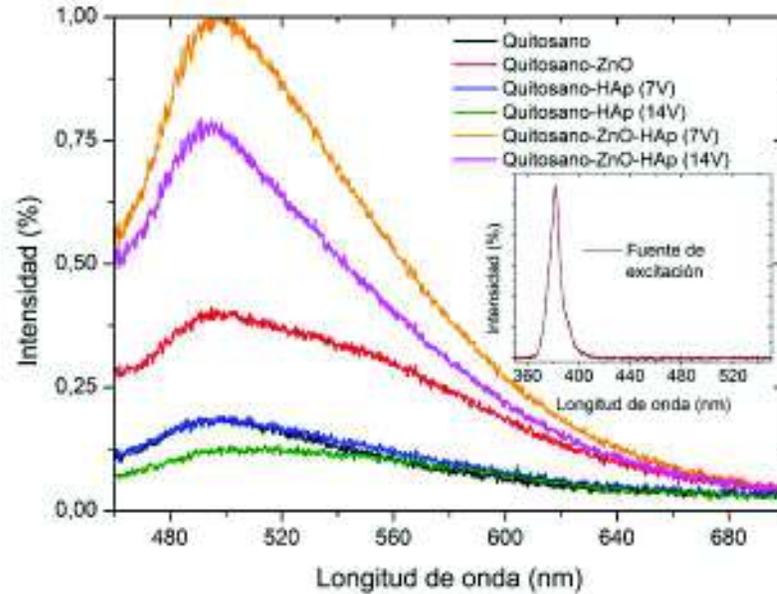


Figura 4.10: Espectros de luminiscencia de estructuras 2D.

4.2.1. Estructuras 2D

La luz de emisión de las membranas se pudo observar a simple vista, presentaba una tonalidad verde-azulada y la intensidad era claramente mayor en las que tenían una mezcla de ZnO-hidroxiapatita en su estructura.

Se tomó como base la membrana de quitosano, la cual presenta una respuesta muy débil en intensidad (Fig. 4.10), con un rango de emisión desde 420[nm] hasta 600[nm] y un máximo en $\lambda = 497[nm]$. La membrana de quitosano-HAp sintetizada a 7V presenta un rango de emisión igual al del quitosano, con un máximo en $\lambda = 502[nm]$, y un perfil que difiere al de éste debido a una contribución pequeña a bajas energías atribuida a la hidroxiapatita en $\lambda = 580[nm]$. La membrana de quitosano-HAp sintetizada a 14V tiene el mismo rango de emisión que la de quitosano, con una intensidad menor y un corrimiento ligero hacia longitudes de onda mayores, alcanzando su máximo en $\lambda = 514[nm]$, atribuido a una contribución de la hidroxiapatita a bajas energías.

De estos resultados se puede concluir que agregar hidroxiapatita al sistema modifica

sus propiedades ópticas. Respecto a la membrana de quitosano, el área total integrada bajo la curva y la intensidad en el máximo aumentaron 14 % y 4 % respectivamente en la membrana de quitosano-HAp sintetizada a 7V, mientras que disminuyeron 11 % y 29 % en la sintetizada a 14V.

A pesar de que la hidroxiapatita contribuye a la luminiscencia de las membranas, su aporte es débil. La disminución en intensidad observada en la membrana quitosano-HAp sintetizada a 14V respecto a la de quitosano podría atribuirse a que una mayor concentración de hidroxiapatita en la superficie reduce el aporte del quitosano, haciendo que disminuya la emisión total.

La membrana de quitosano-ZnO muestra un rango de emisión entre 460[nm] y 700[nm], y tiene su máximo en $\lambda = 502[nm]$. El área integrada bajo la curva y la intensidad en el máximo son 198 % y 144 % mayores respecto a la membrana de quitosano. Este aumento en la intensidad se atribuye a la contribución del ZnO, cuya emisión, de acuerdo con la literatura, se da en $\lambda = 550[nm]$ aproximadamente y es producida por los defectos superficiales [71–73]. El aporte del ZnO a la intensidad total es de aproximadamente 58 %, y su curva de ajuste coincide con las reportadas en la literatura.

La membrana de quitosano-ZnO-HAp sintetizada a 7V es la que presenta la mayor intensidad de emisión, con un rango desde 460[nm] hasta 750[nm], y un máximo en $\lambda = 497[nm]$. La membrana sintetizada a 14V tiene un perfil, rango de emisión y un máximo igual que la membrana sintetizada a 7V, pero con menor intensidad.

Respecto a la membrana de quitosano, el área integrada bajo la curva y la intensidad en el máximo son 500 % y 530 % mayores en el caso de la membrana sintetizada a 7V, y 370 % y 383 % mayores en la sintetizada a 14V.

Una vez más se observa que la hidroxiapatita en concentración más alta (sintetizada

a 14V) satura la superficie de la membrana y disminuye el aporte del quitosano y ZnO a la luminiscencia, haciendo que su intensidad total sea menor respecto a la membrana sintetizada a 7V.

El efecto sinérgico que ocurre entre la hidroxiapatita y el ZnO al combinarse mejora las propiedades de luminiscencia de las membranas. Este efecto podría deberse a un proceso de transferencia de carga entre estos dos materiales.

4.2.2. Estructuras 3D

Igual que en el caso de las membranas, la emisión luminosa se pudo observar a simple vista en una tonalidad verde-azulada.

Los espectros de las muestras no se pueden comparar entre ellos de la misma forma que se hizo con las membranas, debido a que las superficies son muy irregulares y sus tamaños son distintos, pero si se puede hacer una comparación del perfil de los espectros normalizados.

Como se mencionó en el capítulo anterior, dos de los andamios se fabricaron utilizando hidroxiapatita pre-sintetizada: quitosano-HAp (pre-sintetizada) y quitosano-ZnO-HAp (pre-sintetizada), debido a que los andamios de quitosano que no contenían ZnO se desintegraban rápidamente al entrar en contacto con las soluciones SBF.

Se tomó como base al andamio de quitosano (Fig. 4.11), el cual presenta un rango de emisión desde 420[nm] hasta 750[nm] y un máximo en $\lambda = 505[nm]$.

El andamio de quitosano-ZnO presenta emisión en el mismo rango que el andamio de quitosano y alcanza su máximo en $\lambda = 492[nm]$, es decir, existe un corrimiento hacia longitudes de onda menores. El área integrada bajo la curva es 4% menor con respecto a la del quitosano.

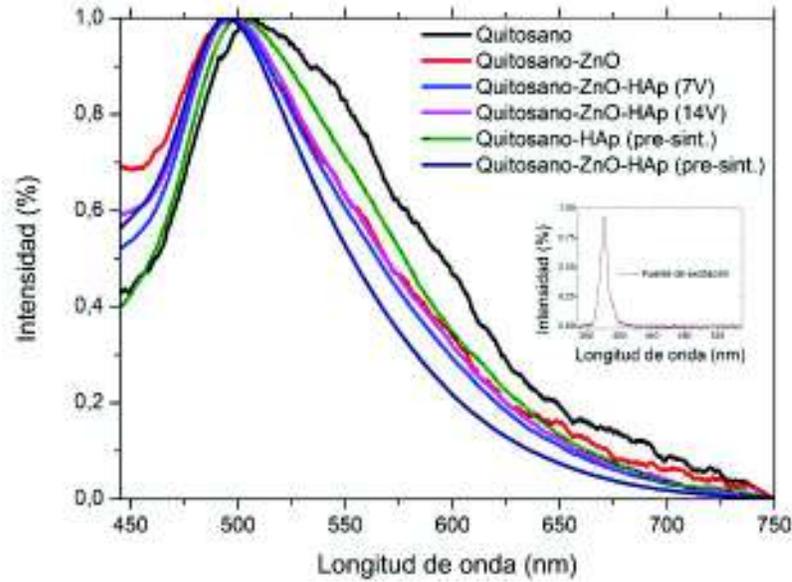


Figura 4.11: Espectros de luminiscencia normalizados de estructuras 3D.

Los andamios de quitosano-ZnO-HAp sintetizados a 7V y 14V presentan un rango de emisión desde 420[nm] hasta 750[nm] y, en los dos casos, el máximo se alcanza en $\lambda = 497[nm]$. Respecto al andamio de quitosano, el área integrada bajo la curva es 14% menor en el andamio sintetizado a 7V y 9% menor en el sintetizado a 14V.

El andamio de quitosano-HAp (pre-sintetizada) tiene un rango de emisión desde 420[nm] hasta 750[nm] y alcanza el máximo en $\lambda = 502[nm]$. El área integrada bajo la curva es 11% menor que la del quitosano.

El andamio de quitosano-ZnO-HAp (pre-sintetizada) presenta un rango de emisión desde 420[nm] hasta 750[nm] y alcanza el máximo en $\lambda = 495[nm]$. El área integrada bajo la curva es 19% menor que la del quitosano.

A pesar de que se mencionó que no es correcto hacer una comparación de las intensidades como en el caso de las membranas, es importante destacar que en los dos andamios en que se usó hidroxiapatita pre-sintetizada, la intensidad de emisión a simple vista fue notablemente mayor que en los otros andamios. Esto se atribuye a

que la hidroxiapatita que se usó fue sinterizada a 400°C, lo cual activa sus propiedades de luminiscencia [53, 54, 74].

En estas estructuras se puede observar que existe un corrimiento en la longitud de onda de máxima emisión y en el área integrada bajo las curvas, respecto al andamio de quitosano, pero no es posible realizar curvas de ajuste y determinar la contribución de cada material puesto que no se distingue con claridad picos secundarios de emisión como en el caso de las membranas.

4.2.3. Estructuras 0D

Para medir la fotoluminiscencia en estas estructuras se fabricaron discos compactos con los polvos, tal como se indicó en el capítulo anterior.

La luz de emisión de las pastillas no se pudo observar a simple vista.

Para estas muestras no se hicieron curvas de ajuste debido a que no se puede identificar claramente el efecto del ZnO, modificando la forma de los espectros, como en el caso de las membranas.

La muestra de quitosano-ZnO es la que presenta mayor intensidad de emisión (Fig. 4.12), con un rango desde 470[nm] hasta 770[nm] y un máximo en $\lambda = 560[nm]$. Las muestras de quitosano-HAp y quitosano-ZnO-HAp tienen el mismo perfil de emisión entre ellas, y el rango y máximo coinciden con el de la muestra de Quitosano-ZnO, pero su intensidad es notablemente menor. El área integrada bajo la curva de las muestras de quitosano-HAp y quitosano-ZnO-HAp son 42% y 54% menores respectivamente, respecto a la muestra de quitosano-ZnO.

En relación con los resultados obtenidos en estructuras 2D y 3D, existe un corrimiento en los máximos de emisión hacia longitudes de onda más grandes. Este

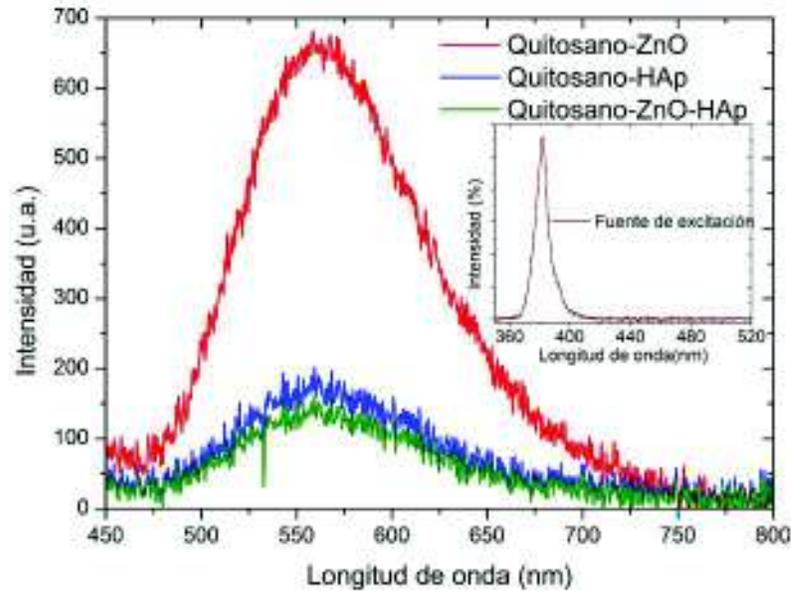


Figura 4.12: Espectros de luminiscencia de estructuras 0D.

efecto podría deberse a la formación de carbono amorfo en la superficie de la muestra, cuyo rango de emisión está en longitudes de onda mayores.

4.2.4. Efectos de la arquitectura

Los espectros de los andamios presentan más ruido que en el caso de las membranas y su intensidad es más débil, lo cual se atribuye al mayor número de irregularidades y a la porosidad en la estructura de las muestras, haciendo que la luz absorbida y emitida sea menor.

Durante el proceso de deposición de hidroxiapatita asistida por campo eléctrico puede haberse desintegrado parte del material tanto en las membranas como en los andamios, creando defectos superficiales que apagan la intensidad de emisión. Este efecto es mucho más notorio en los andamios debido a la fragilidad de su estructura.

En las estructuras 0D se esperaba una mejor respuesta, puesto que al estar compactadas se reducen los defectos superficiales y aumenta la densidad de partículas fotoluminiscentes, pero la gran cantidad de carbono amorfo superficial no permitió

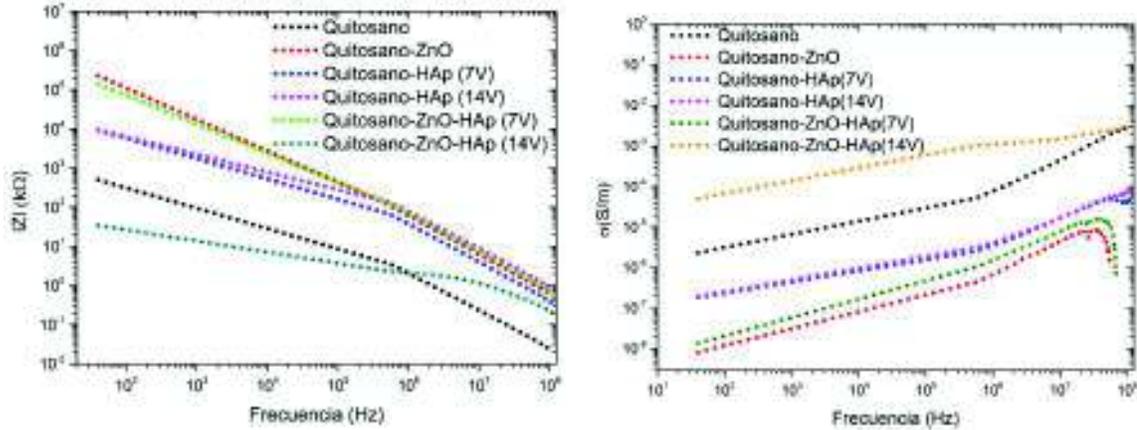


Figura 4.13: Gráfica de la impedancia y conductividad en función de la frecuencia para las estructuras 2D.

que se produzca este efecto, haciendo que su intensidad esté en el rango de la de los andamios.

4.3. Caracterización eléctrica

Las propiedades eléctricas que se midieron fueron la impedancia y la capacitancia, y a partir de estos datos se hizo el cálculo de la conductividad y de la constante dieléctrica de las muestras.

Como se mencionó en el capítulo anterior, se utilizaron dos contactos conductores como electrodos para las mediciones en las membranas y andamios, mientras que las estructuras 0D (polvos) se compactaron en forma de discos y sus superficies fueron pintadas con capas conductoras de plata como electrodos.

Esta caracterización es importante puesto que las propiedades eléctricas no han sido estudiadas en estos sistemas a profundidad, y podrían tener aplicaciones en la electrónica, fabricación de biosensores, entre otras.

4.3.1. Estructuras 2D

Al analizar el comportamiento de la membrana de Quitosano-ZnO respecto a la de Quitosano (Fig. 4.13), la cual se ha tomado como base, se observa que el valor del módulo de la impedancia aumenta en cerca de dos órdenes de magnitud, lo cual implica que el material es más resistente al paso de la corriente tanto para bajas como para altas frecuencias; esto se verifica también en la gráfica de la conductividad, donde los valores en la membrana de Quitosano-ZnO son menores que en la de Quitosano. El ZnO al ser un semiconductor, se comporta como un material dieléctrico bajo las condiciones de medición, dificultando la conducción iónica en la membrana.

En la literatura se reporta que las membranas de quitosano alcanzan valores de conductividad de hasta $10^{-2}[S/m]$ debido a la presencia de iones y agua estructural [46], lo cual significa que los valores que se obtuvo están dentro de lo esperado.

Las membranas de Quitosano con diferentes concentraciones de hidroxiapatita: Quitosano-HAp (7V) y Quitosano-HAp (14V), presentan un comportamiento similar entre ellas tanto en el módulo de la impedancia como en la conductividad (Fig. 4.13), siendo la muestra de mayor concentración (14V) la que posee una impedancia ligeramente mayor para altas frecuencias. Al comparar estas muestras con la membrana de Quitosano, observamos que la impedancia de las muestras Quitosano-HAp (7V y 14V) es aproximadamente una orden de magnitud mayor, lo cual está de acuerdo con la gráfica de la conductividad. Esto significa que el comportamiento de la hidroxiapatita es también el de un material dieléctrico.

Las membranas de quitosano con ZnO e hidroxiapatita a diferentes concentraciones tienen un comportamiento diferente entre sí (Fig. 4.13). La muestra de menor concentración de hidroxiapatita (7V) tiene valores de impedancia aproximadamente 4

órdenes de magnitud mayores que la de mayor concentración (14V), esto se confirma con la gráfica de la conductividad, tanto para bajas como altas frecuencias. Esto significa que la mezcla de ZnO con hidroxiapatita en una mayor concentración favorece la conducción iónica de la membrana. Estas muestras presentan también el comportamiento de materiales dieléctricos.

La membrana de Quitosano-ZnO-HAp (7V) sigue un comportamiento bastante parecido al de la muestra de Quitosano-ZnO, lo cual puede deberse a que la baja concentración de hidroxiapatita no afecta sus propiedades eléctricas en comparación con la otra muestra en consideración. Por otro lado, el comportamiento de la membrana de Quitosano-ZnO-HAp (14V) es diferente al de todas las otras muestras, siendo la que menor impedancia presenta para frecuencias menores que 10^6 Hz y acercándose a un valor similar al de las demás muestras a frecuencias mayores, exceptuando la membrana de Quitosano que es la de menores valores a altas frecuencias. En cuanto a la conductividad, esta muestra es la que tiene los mayores valores tanto a altas como a bajas frecuencias.

En las gráficas de impedancia y conductividad se observa un cambio en la pendiente de las curvas a una frecuencia de aproximadamente 10^6 Hz para todas las muestras, este cambio podría estar relacionado con la activación de procesos de conducción protónica. Los enlaces de hidrógeno que se producen por la absorción de agua en las cadenas del quitosano promueven una transferencia de protones de los grupos amino hacia las moléculas de agua [46, 47].

En la gráfica de la capacitancia y de la constante dieléctrica relativa (Fig. 4.14) se observa que la membrana de Quitosano-ZnO tiene valores 2 órdenes de magnitud menores respecto a la membrana de Quitosano. Estos valores disminuyen conforme

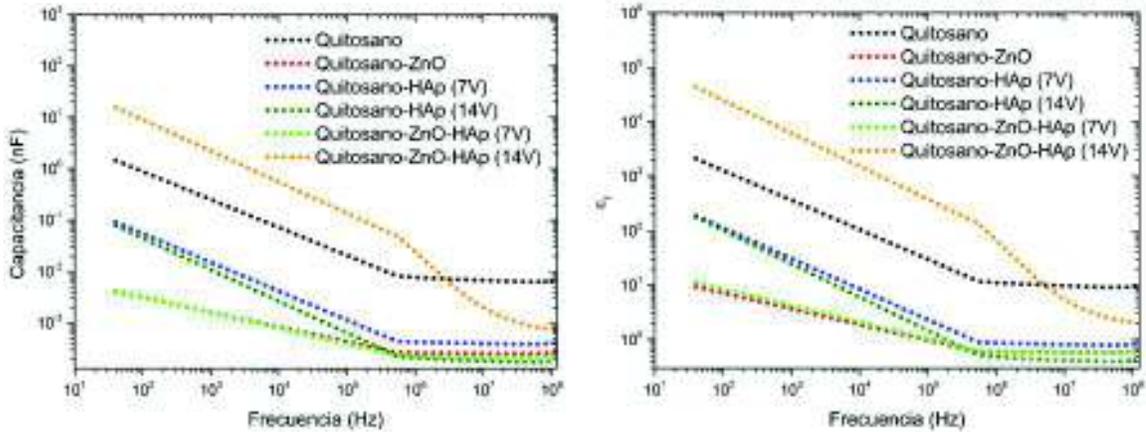


Figura 4.14: Gráfica de la capacitancia y constante dieléctrica relativa en función de la frecuencia para las estructuras 2D.

aumenta la frecuencia hasta llegar a un valor estable. En este caso, agregar ZnO a la membrana reduce la capacidad de almacenamiento de carga en comparación con la membrana de Qitosano. Este efecto podría explicarse al considerar que la carga se transfiere mediante iones, y por tanto está limitada a la velocidad con que éstos se mueven a través de la membrana; esto quiere decir que una menor movilidad (menor conductividad) implica una menor capacitancia puesto que aquí no existen fugas internas de carga a través de electrones como en los capacitores convencionales.

En la literatura se encontró solamente un estudio realizado por Nainggolan et al. [75] en el que miden la capacitancia de membranas de quitosano, utilizando una técnica diferente a la de este trabajo. Los valores que obtienen están en el orden de los faradios hasta los milifaradios dependiendo de las condiciones de medición. Sin embargo, hay que aclarar que estas medidas las obtuvieron en circuitos DC, y no en AC como se hizo en este trabajo.

Las membranas de Qitosano con hidroxiapatita a diferentes concentraciones (7V y 14V) muestran un comportamiento similar entre ellas (Fig. 4.14), salvo que

si la frecuencia aumenta, la capacitancia y la constante dieléctrica relativa de la muestra con menor concentración (7V) es mayor. En comparación con la membrana de Quitosano, los valores de la capacitancia y constante dieléctrica son aproximadamente una orden de magnitud menores, lo cual está de acuerdo con los resultados de la conductividad.

La muestra de Quitosano con ZnO e hidroxiapatita de menor concentración (7V) tiene valores de capacitancia y constante dieléctrica 3 órdenes de magnitud menores a altas frecuencias, y de la misma magnitud a muy altas frecuencias en comparación con la muestra de mayor concentración (14V). Estos resultados tienen congruencia con los de la conductividad de estas muestras. Además, se observa que la muestra de mayor concentración (14V), que tiene los valores más altos de conductividad, presenta también los valores más altos de capacitancia y de constante dieléctrica en comparación con todas las demás muestras.

En general, el comportamiento de la capacitancia y de la conductividad de todas las muestras es el esperado para un material dieléctrico, esto es, un decremento de los valores de la constante dieléctrica a medida que la frecuencia aumenta, debido a que las moléculas polarizadas que se alinean con cada cambio de dirección del campo a bajas frecuencias no pueden seguir el cambio tan rápido que se produce a altas frecuencias, quedando en una posición donde no aportan al almacenamiento de energía.

4.3.2. Estructuras 3D

El comportamiento en impedancia de las estructuras 3D es bastante similar al de las estructuras 2D, salvo que las primeras presentan valores más altos, lo cual puede explicarse por la arquitectura de los andamios, donde la distancia entre los electrodos

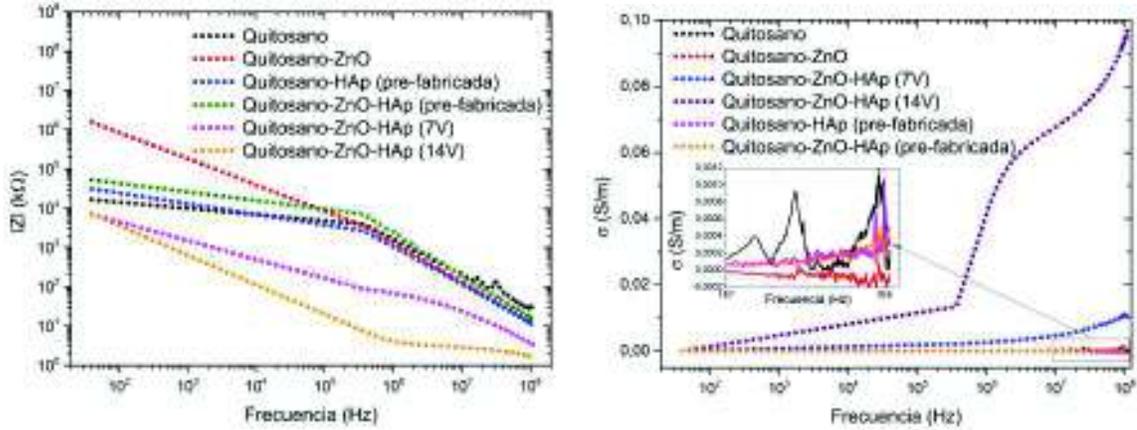


Figura 4.15: Gráfica de la impedancia y conductividad en función de la frecuencia para las estructuras 3D.

y la porosidad hacen más difícil el transporte iónico a través del material.

La muestra de Qitosano-ZnO presenta una impedancia más alta respecto a la de Qitosano a bajas frecuencias (Fig. 4.15), aproximadamente dos órdenes de magnitud, mientras que sus valores son muy similares a altas frecuencias. Esto significa que el ZnO genera una resistencia a la movilidad de iones a través del andamio, igual que en el caso de las membranas, aunque su efecto es más marcado a bajas frecuencias. En la gráfica de la conductividad no se pueden apreciar las diferencias con claridad, puesto que los valores son muy cercanos entre sí.

Los andamios de Qitosano con ZnO e hidroxiapatita a diferentes concentraciones (7V y 14V) muestran un comportamiento similar entre sí en cuanto a la tendencia (Fig. 4.15), pero a medida que la frecuencia aumenta, la impedancia de la muestra de menor concentración (7V) tiene valores más grandes. Se visualiza un cambio más notorio en la gráfica de la conductividad, donde la curva de la muestra de mayor concentración presenta varios cambios en el valor de su pendiente y valores mucho mayores a los de la muestra de menor concentración. Los cambios en la pendiente

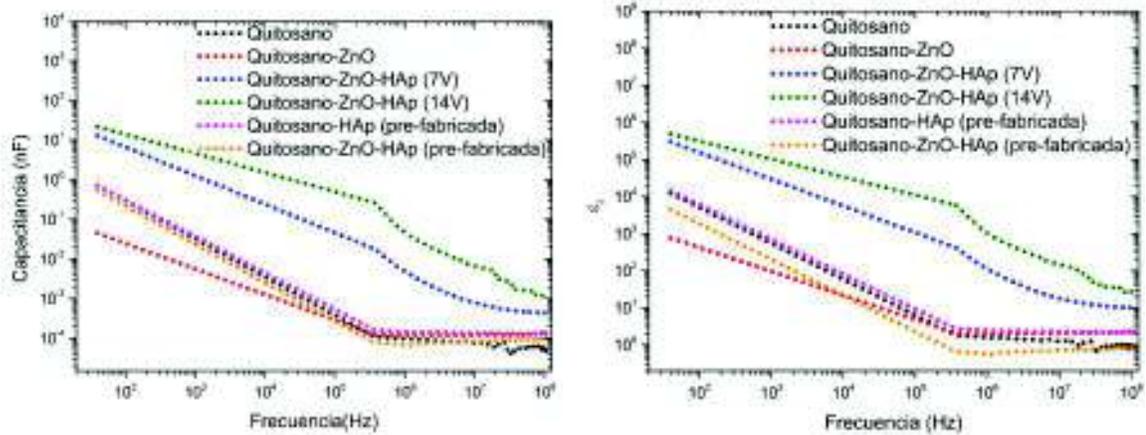


Figura 4.16: Gráfica de la capacitancia y constante dieléctrica relativa en función de la frecuencia para las estructuras 3D.

podrían estar ligados a la activación de diferentes procesos de conducción dentro de la muestra. En comparación a los andamios de Quitosano y Quitosano-ZnO, éstos presentan valores más bajos de impedancia y más altos en conductividad, lo cual significa que la mezcla de ZnO con hidroxiapatita mejora la movilidad iónica dentro de estas estructuras.

Las muestras que se hicieron con hidroxiapatita prefabricada, Quitosano-HAp y Quitosano-ZnO-HAp, tienen un comportamiento en impedancia similar entre ellas (Fig. 4.15), siendo la muestra que contiene ZnO e hidroxiapatita la que tiene valores más altos. Los valores y tendencias de las dos muestras se acercan mucho a las del andamio de Quitosano, tanto en impedancia como en conductividad, y si comparamos la muestra de Quitosano-ZnO-HAp con hidroxiapatita pre-fabricada respecto a las dos muestras de Quitosano-ZnO-HAp (7V y 14V), vemos que sus valores de impedancia son mayores, y su conductividad es menor. Esto significa que la hidroxiapatita pre-fabricada no altera drásticamente la movilidad iónica en los andamios de quitosano.

En cuanto a la capacitancia y a la constante dieléctrica relativa vemos que la tendencia es similar a la de las estructuras 2D, y su comportamiento es el de un material dieléctrico.

El andamio de Quitosano-ZnO tiene una capacitancia y constante dieléctrica un orden de magnitud menor respecto al andamio de Quitosano (Fig. 4.16), lo cual está de acuerdo con los resultados anteriores, donde se encontró que la muestra que contiene ZnO dificulta la movilidad iónica y por tanto su constante dieléctrica y capacitancia serán más bajas. Estos resultados concuerdan con los de las estructuras 2D.

Las muestras de Quitosano-ZnO-HAp a diferentes concentraciones (7V y 14V) presentan un comportamiento similar de la capacitancia y de la constante dieléctrica (Fig. 4.16), siendo la de mayor concentración (14V) la de valores más altos conforme la frecuencia aumenta. Estos resultados están de acuerdo con los que se observa de la conductividad, donde la muestra de mayor concentración tiene los valores más altos, favoreciendo la movilidad iónica. Con relación a las demás muestras, la de Quitosano-ZnO-HAp (14V) es la que tiene una mayor conductividad y una mayor capacitancia y constante dieléctrica, lo cual coincide con lo encontrado en las estructuras 2D.

Los andamios con hidroxiapatita pre-fabricada tienen una tendencia y valores de capacitancia y constante dieléctrica muy cercanos a los del andamio de Quitosano (Fig. 4.16), igual como ocurrió con la impedancia y conductividad. Esto sugiere una vez más que esta hidroxiapatita no modifica mayormente las propiedades eléctricas de los andamios de quitosano.

Al comparar de manera general los resultados obtenidos para la capacitancia

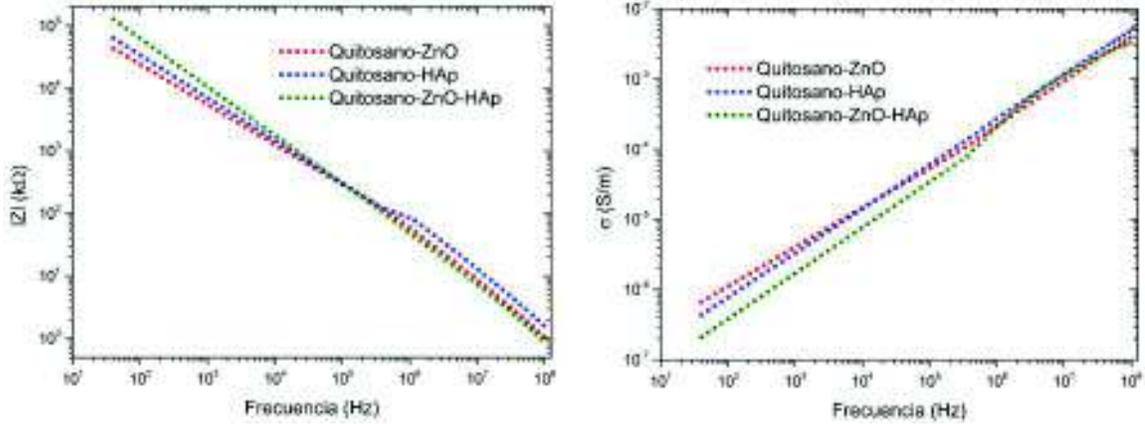


Figura 4.17: Gráfica de la impedancia y conductividad en función de la frecuencia para las estructuras 0D.

en las muestras 3D y 2D, se observa que a bajas frecuencias la capacitancia de las estructuras 3D es mucho mayor que la de las estructuras 2D, pero a altas frecuencias tienden a los mismos valores. Esto sugiere que la arquitectura de los sistemas afecta a sus propiedades eléctricas, pero de una manera más marcada a bajas frecuencias.

4.3.3. Estructuras 0D

Las estructuras 0D exhiben un comportamiento bastante similar entre ellas (Fig. 4.17). La impedancia disminuye con el aumento de frecuencia, mientras que la conductividad aumenta, tal como sucede con las estructuras 2D y 3D. Es decir, se comportan como un material dieléctrico. A bajas frecuencias la muestra de Qitosano-ZnO-HAp tiene los valores más altos de impedancia y los más bajos de conductividad. A frecuencias altas es la muestra de Qitosano-HAp la de mayor impedancia, mientras que los valores de conductividad son muy cercanos en las tres muestras.

En cuanto a la capacitancia y a la constante dieléctrica se observa que la tendencia es similar en las 3 muestras (Fig. 4.18). A bajas frecuencias la muestra de Qitosano-ZnO-HAp tiene la capacitancia y constante dieléctrica más baja, lo

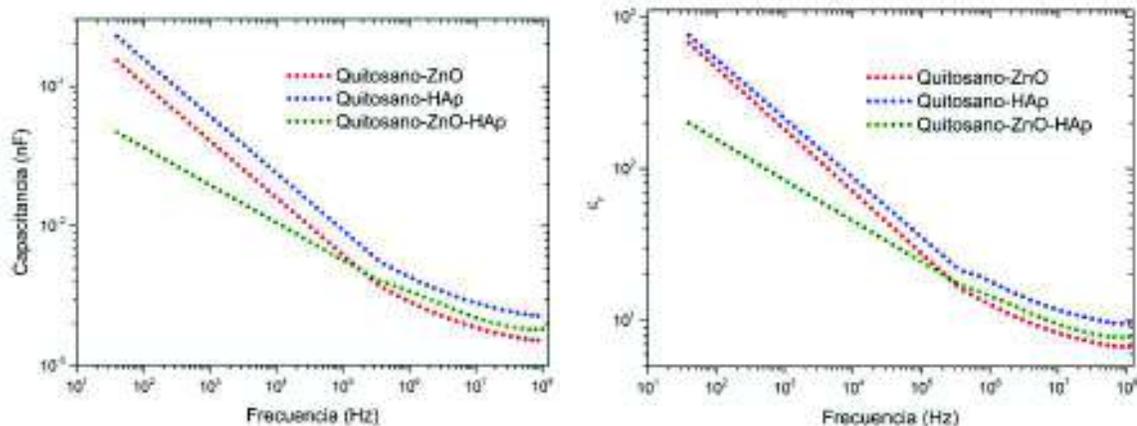


Figura 4.18: Gráfica de la capacitancia y constante dieléctrica en función de la frecuencia para las estructuras 0D.

cual se explica por su conductividad más baja, que dificulta la movilidad iónica. A altas frecuencias las muestras tienden a estabilizarse, y la de Qitosano-HAp es que presenta los valores más altos, lo cual se explica por su mayor conductividad.

En general, el comportamiento de estas estructuras es el de materiales dieléctricos. Y al comparar con las estructuras 2D y 3D, encontramos que la capacitancia y la constante dieléctrica en las estructuras 0D a altas frecuencias es menor que en las 3D y similares en valores a las 2D, mientras que, a altas frecuencias, tienden todas a los mismos valores. Es decir, se reafirma que la arquitectura influye en las propiedades eléctricas de los materiales, con una diferencia más marcada en bajas frecuencias.

4.4. Análisis comparativo de las estructuras

Se han sintetizado estructuras en arquitecturas 3D, 2D y 0D, cuyas propiedades estructurales, ópticas y eléctricas difieren entre sí, haciendo posible su aplicación en distintos campos como la biomedicina, fabricación de dispositivos de bioimagen, biosensores, dispositivos emisores de luz.

Las estructuras 3D presentan una gran porosidad, haciéndolas ideales para su aplicación en ingeniería de tejidos en donde ésta característica es importante al permitir la migración celular a través de los sistemas. Las estructuras 2D muestran menor porosidad que las estructuras 3D, sin embargo, su resistencia mecánica es cualitativamente mayor, pudiendo tener posibles aplicaciones como sustituto de piel, vendaje para curación de heridas, sistemas de guía para regeneración de tejidos, entre otras. En las estructuras 0D se consiguió la formación de partículas tipo “core-shell” con pequeños residuos de quitosano, las cuales tienen potenciales aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos, por ejemplo.

En lo referente a las propiedades ópticas, todas las muestras presentaron luminiscencia, siendo las estructuras 2D las que mostraron una mayor intensidad. La explicación de estos resultados es que en el caso de las estructuras 3D su porosidad y mayor número de irregularidades hacen que, tanto la luz absorbida como la emitida sea menor; en las estructuras 0D, por otra parte, se formó una capa de carbono superficial en su proceso de síntesis, reduciendo la emisión de luz. Considerando que la luminiscencia en las estructuras 3D y 0D es muy débil, no serían muy útiles en aplicaciones relacionadas con la óptica, sin embargo, las estructuras 2D podrían utilizarse en el desarrollo de dispositivos de bioimagen, marcadores luminiscentes, dispositivos emisores de luz, entre otros.

Las propiedades eléctricas en las estructuras 2D, 3D y 0D siguen un comportamiento similar entre ellas en cuanto a tendencias, pero sus valores son diferentes y están determinados en gran parte por la arquitectura de los sistemas. De manera general, el comportamiento de los sistemas es el de materiales dieléctricos. Se obtuvieron valores más altos de impedancia en las estructuras 3D, lo cual se atribuye

a la gran porosidad y el mayor tamaño de las muestras que dificulta la movilidad iónica, en comparación con las muestras 2D y 0D. La capacitancia y constante dieléctrica relativa tienen los valores más bajos en las estructuras 0D, lo cual se debe a que, para frecuencias altas, los iones no se mueven a la velocidad suficiente para alinearse con el campo eléctrico, haciendo que su aporte a la capacitancia disminuya. El estudio de estas propiedades, que no se ha realizado antes, puede conducir a potenciales aplicaciones de estos sistemas en la fabricación de biosensores y otro tipo de dispositivos electrónicos.

Capítulo 5

Conclusiones y Recomendaciones

5.1. Conclusiones

- Se consiguió sintetizar estructuras con arquitecturas 3D y 2D de quitosano, quitosano/ZnO y quitosano/ZnO/hidroxiapatita.
- El método de deposición de hidroxiapatita asistido por campo eléctrico funcionó bien en todas las membranas y en los andamios que contienen ZnO, pero no pudo ser usado para los andamios de quitosano puro debido a la desintegración que éstos presentaron.
- Se obtuvieron estructuras 0D tipo “core-shell” a partir de la pirolización de las membranas previamente sintetizadas. Los polvos resultantes contienen pequeños restos de quitosano, que a pesar de no ser lo esperado es algo positivo puesto que contribuyen a la biocompatibilidad de los sistemas.
- Se realizó la caracterización estructural y microestructural de las muestras mediante diferentes técnicas, permitiendo determinar características como la cristalinidad, composición, morfología y tamaño de las partículas y estructuras.

- Se determinaron las propiedades eléctricas (conductividad, capacitancia, constante dieléctrica) de los sistemas 3D, 2D y 0D. El comportamiento que muestran es el de materiales dieléctricos y sus valores dependen en gran parte de su arquitectura. Los valores más altos de impedancia y más bajos de conductividad corresponden a las estructuras 3D, y son atribuidos a su alta porosidad e irregularidades que dificultan la movilidad iónica.
- Se determinaron las propiedades de fotoluminiscencia de todos los sistemas. La mezcla de ZnO/hidroxiapatita en arquitectura 2D produjo un efecto sinérgico mejorando notablemente la intensidad de emisión. En los sistemas 3D y 0D no se observó este efecto, lo cual se atribuye a la porosidad e irregularidad de las superficies en los sistemas 3D y a la gran cantidad de carbono amorfo resultante de la pirólisis en las estructuras 0D. Sin embargo, todas las muestras presentan una respuesta fotoluminiscente.
- Se determinó que la arquitectura influye en las propiedades eléctricas y ópticas de los sistemas.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda hacer un estudio cualitativo y cuantitativo sobre los efectos del ZnO en las propiedades mecánicas de las estructuras 2D y 3D de quitosano.
- Se recomienda aumentar el tiempo de pirolización de las membranas si se quiere evitar restos de quitosano en las estructuras 0D.
- Se recomienda trabajar con voltajes menores que 15V para la deposición de hidroxiapatita asistida por campo eléctrico para evitar daños graves en las estructuras de membranas y andamios.

Bibliografía

- [1] Yoshihiro Shigemasa and Saburo Minami. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 13(1):383–420, 1996.
- [2] S. Islam, M. A. Rahman Bhuiyan, and M. N. Islam. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *Journal of Polymers and the Environment*, 25(3):854–866, 2017.
- [3] Hadis Morkoc and Umit Ozgur. *General Properties of ZnO*. 2009.
- [4] S. L. Shi, G. Q. Li, S. J. Xu, Y. Zhao, and G. H. Chen. Green luminescence band in ZnO: Fine structures, electron-phonon coupling, and temperature effect. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(21):10475–10478, 2006.
- [5] M P Ferraz, F J Monteiro, and C M Manuel. Hydroxyapatite nanoparticles : A review of. *Journal of Applied Biomaterials*, 2(2):74–80, 2004.
- [6] Philippe Le Coustumer. Influence of Annealing Treatment of Nano- Hydroxyapatite Bioceramics on the Vibrational Properties. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(January 2017):609–624, 2011.
- [7] Oguzhan Gunduz, Eray M. Erkan, Sibel Daglilar, Serdar Salman, Simeon Agathopoulos, and Faik Nuzhet Oktar. Composites of bovine hydroxyapatite (BHA) and ZnO. *Journal of Materials Science*, 43(8):2536–2540, 2008.
- [8] Naresh Saha, Kahraman Keskinbora, Ender Suvaci, and Bikramjit Basu. Sintering, microstructure, mechanical, and antimicrobial properties of HAp-ZnO biocomposites. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 95 B(2):430–440, 2010.
- [9] Amit Bandyopadhyay, Elizabeth A. Withey, Jessica Moore, and Susmita Bose. Influence of ZnO doping in calcium phosphate ceramics. *Materials Science and Engineering C*, 27(1):14–17, 2007.
- [10] C A Martínez, U Gilabert, L Garrido, M Rosenbusch, and A Ozols. Functionalization of hydroxyapatite scaffolds with ZnO. *Procedia Materials Science*, 9:484–490, 2015.

- [11] Raju Khan, Ajeet Kaushik, Pratima R. Solanki, Anees A. Ansari, Manoj K. Pandey, and B. D. Malhotra. Zinc oxide nanoparticles-chitosan composite film for cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*, 616(2):207–213, 2008.
- [12] T. Hanada. Basic Properties of ZnO, GaN, and Related Materials. pages 1–19, 2009.
- [13] Zhong Lin Wang. Zinc oxide nanostructures: growth, properties and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 16(25):R829–R858, 2004.
- [14] Z. G. Wang, X. T. Zu, S. Zhu, and L. M. Wang. Green luminescence originates from surface defects in ZnO nanoparticles. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 35(1):199–202, 2006.
- [15] N. Horiuchi, S. Nakaguki, N. Wada, K. Nozaki, M. Nakamura, A. Nagai, K. Katayama, and K. Yamashita. Polarization-induced surface charges in hydroxyapatite ceramics. *Journal of Applied Physics*, 116(1), 2014.
- [16] S B Lang, S a M Tofail, a L Kholkin, M Wojtaś, M Gregor, a a Gandhi, Y Wang, S Bauer, M Krause, and a Plecenik. Ferroelectric polarization in nanocrystalline hydroxyapatite thin films on silicon. *Scientific reports*, 3:2215, 2013.
- [17] Ketaki Deshmukh, M. Monsoor Shaik, Sutapa Roy Ramanan, and Meenal Kows-hik. Self-Activated Fluorescent Hydroxyapatite Nanoparticles: A Promising Agent for Bioimaging and Biolabeling. *ACS Biomaterials Science and Engi-neering*, 2(8):1257–1264, 2016.
- [18] C Zhang, J Yang, Z Quan, and P Yang. Hydroxyapatite nano- and microcrystals with multiform morphologies: Controllable synthesis and luminescence prop-erties. *Crystal Growth and Design*, 9(6):2725–2733, 2009.
- [19] Venina dos Santos, Rosmary Nichele Brandalise, and Michele Savaris. *Engineer-ing of Biomaterials*. 2017.
- [20] Saad M. Ahsan, Mathai Thomas, Kranthi K. Reddy, Sujata Gopal Sooraparaju, Amit Asthana, and Ira Bhatnagar. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 110:97–109, 2018.
- [21] Gang Zhou, Yubao Li, Wei Xiao, Li Zhang, Yi Zuo, Jing Xue, and John A. Jan-sen. Synthesis, characterization, and antibacterial activities of a novel nanohy-droxyapatite/zinc oxide complex. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 85(4):929–937, 2008.
- [22] C. Heinemann, S. Heinemann, B. Kruppke, H. Worch, J. Thomas, H. P. Wies-mann, and T. Hanke. Electric field-assisted formation of organically modified hydroxyapatite (ormoHAP) spheres in carboxymethylated gelatin gels. *Acta Biomaterialia*, 44:135–143, 2016.

- [23] Xin Liu, Jinhui Pang, Feng Xu, and Xueming Zhang. Simple Approach to Synthesize Amino-Functionalized Carbon Dots by Carbonization of Chitosan. *Scientific Reports*, 6(1):31100, 2016.
- [24] Zhiyong Li, Yunlan Su, Baoquan Xie, Huiliang Wang, Tao Wen, Changcheng He, Hong Shen, Decheng Wu, and Dujin Wang. A tough hydrogel–hydroxyapatite bone-like composite fabricated in situ by the electrophoresis approach. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(12):1755, 2013.
- [25] Arundhati Bhowmick, Sovan Lal Banerjee, Nilkamal Pramanik, Piyali Jana, Tapas Mitra, Arumugam Gnanamani, Manas Das, and Patit Paban Kundu. Organically modified clay supported chitosan/hydroxyapatite-zinc oxide nanocomposites with enhanced mechanical and biological properties for the application in bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106:11–19, 2018.
- [26] Zhang Li, Li Yubao, Zuo Yi, Wu Lan, and John A. Jansen. In vitro and in vivo evaluation on the bioactivity of ZnO containing nano-hydroxyapatite/chitosan cement. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 93(1):269–279, 2010.
- [27] Li Hua Li, Jian Cheng Deng, Hui Ren Deng, Zi Ling Liu, and Ling Xin. Synthesis and characterization of chitosan/ZnO nanoparticle composite membranes. *Carbohydrate Research*, 345(8):994–998, 2010.
- [28] S. Dhivya, S. Saravanan, T. P. Sastry, and N. Selvamurugan. Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(1):1–13, 2015.
- [29] W. W. Thein-Han and R. D.K. Misra. Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5(4):1182–1197, 2009.
- [30] Marioara Moldovan, Doina Prodan, Violeta Popescu, Cristina Prejmerean, Codruta Saroși, Monica Saplonțai, Stefan TĂlu, and Eugeniu Vasile. Structural and morphological properties of HA-ZnO powders prepared for biomaterials. *Open Chemistry*, 13(1):725–733, 2015.
- [31] Ji Hong Zhao, Chang Jiang Liu, and Zhen Hua Lv. Photoluminescence of ZnO nanoparticles and nanorods. *Optik*, 127(3):1421–1423, 2016.
- [32] M. S. Ramachandra Rao and Tatsuo Okada. ZnO Nanocrystals and Allied Materials. *Springer Series in Materials Science*, 180:289–307, 2014.
- [33] S. Ashok Kumar and Shen-Ming Chen. Nanostructured Zinc Oxide Particles in Chemically Modified Electrodes for Biosensor Applications. *Analytical Letters*, 41(2):141–158, 2008.

- [34] José García-Garduño, Margarita Victoria; Reyes-Gasgay. La hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica . *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 9(2):90–95, 2006.
- [35] Syed Ansar M. Tofail, Abbasi A. Gandhi, Maros Gregor, and Joanna Bauer. Electrical properties of hydroxyapatite. *Pure and Applied Chemistry*, 87(3):221–229, 2015.
- [36] Vijaykiran N Narwade, Megha P. Mahabole, Kashinath A Bogle, Rajendra S. Khairnar, Pradnya N. Chavan, Manjushri M. Bahir, and Mene. Sorption of divalent metal ions from aqueous solution by oxidized carbon nanotubes and nanocages: A review. *Advanced Materials Letters*, 4(1):451–465, 2015.
- [37] J. P. Gittings, C. R. Bowen, A. C.E. Dent, I. G. Turner, F. R. Baxter, and J. B. Chaudhuri. Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. *Acta Biomaterialia*, 5(2):743–754, 2009.
- [38] M. Sh Khalil, Hanan H. Beheri, and Wafa I. Abdel Fattah. Structural and electrical properties of zirconia/hydroxyapatite porous composites. *Ceramics International*, 28(4):451–458, 2002.
- [39] A Laghzizil, N Elherch, A Bouhaouss, G Lorente, and T Coradin. Electrical behavior of hydroxyapatites $M_{10} (PO_4)_6 (OH)_2 (M = Ca, Pb, Ba)$. *Materials Research Bulletin*, 36:953–962, 2001.
- [40] Vojislav Stanić, Suzana Dimitrijević, Jelena Antić-Stanković, Miodrag Mitrić, Bojan Jokić, Ilija B. Plećaš, and Slavica Raičević. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders. *Applied Surface Science*, 256(20):6083–6089, 2010.
- [41] Kui Cheng, Zhenwei Guan, Wenjian Weng, Huiming Wang, Jun Lin, Piya Du, and Gaorong Han. Hydroxyapatite/ZnO-nanorod composite coatings with adjustable hydrophilicity and Zn release ability. *Thin Solid Films*, 544:260–264, 2013.
- [42] Megha P Mahabole, Manjushree M Bahir, Namdev V Kalyankar, and Rajendra S Khairnar. Effect of incubation in simulated body fluid on dielectric and photoluminescence properties of nano-hydroxyapatite ceramic doped with strontium ions. 2012(July):396–405, 2012.
- [43] Haoshuo Li, Lefu Mei, Haikun Liu, Yangai Liu, Libing Liao, and R. Vasant Kumar. Growth Mechanism of Surfactant-Free Size-Controlled Luminescent Hydroxyapatite Nanocrystallites. *Crystal Growth and Design*, 17(5):2809–2815, 2017.
- [44] N. Spanos, D. Y. Misirlis, D. G. Kanellopoulou, and P. G. Koutsoukos. Seeded growth of hydroxyapatite in simulated body fluid. *Journal of Materials Science*, 41(6):1805–1812, 2006.

- [45] Xiao Ting Wu, May Lei Mei, Quan Li Li, Chris Ying Cao, Jia Long Chen, Rong Xia, Zhi Hong Zhang, and Chun Hung Chu. A direct electric field-aided biomimetic mineralization system for inducing the remineralization of dentin collagen matrix. *Materials*, 8(11):7889–7899, 2015.
- [46] E. Prokhorov, G. Luna-Biurcenas, J. B. González-Campos, Yu Kovalenko, Z. Y. García-Carvajal, and J. Mota-Morales. Proton conductivity and relaxation properties of chitosan-acetate films. *Electrochimica Acta*, 215:600–608, 2016.
- [47] Guodong Wu, Jin Zhang, Xiang Wan, Yi Yang, and Shuanghe Jiang. Chitosan-based biopolysaccharide proton conductors for synaptic transistors on paper substrates. *J. Mater. Chem. C*, 2(31):6249–6255, 2014.
- [48] Guangsheng Guo, Yong Gan, Fubo Gu, Dongmei Han, and Zhihua Wang. Biomimetic synthesis of zinc oxide 3D architectures with gelatin as matrix. *Journal of Nanomaterials*, 2010:1–8, 2010.
- [49] SB Aziz and Zul Hazrin Z. Abidin. Electrical Conduction Mechanism in Solid Polymer Electrolytes: New Concepts to Arrhenius Equation. *Journal of Soft Matter*, 2013:1–8, 2013.
- [50] R. Raji and K.G. Gopchandran. ZnO nanostructures with tunable visible luminescence: Effects of kinetics of chemical reduction and annealing. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*, 2(1):51–58, 2017.
- [51] S. A. Studenikin, Nickolay Golego, and Michael Cocivera. Fabrication of green and orange photoluminescent, undoped ZnO films using spray pyrolysis. *Journal of Applied Physics*, 84(4):2287–2294, 1998.
- [52] K. Sowri Babu, A. Ramachandra Reddy, Ch Sujatha, K. Venugopal Reddy, and A. N. Mallika. Synthesis and optical characterization of porous ZnO. *Journal of Advanced Ceramics*, 2(3):260–265, 2013.
- [53] Gema Gonzalez, Cesar Costa-Vera, Luis J. Borrero, Damarys Soto, Lisbeth Lozada, Jose I. Chango, J. Camilo Diaz, and Luis Lascano. Effect of carbonates on hydroxyapatite self-activated photoluminescence response. *Journal of Luminescence*, 195:385–395, 2018.
- [54] Thales R. Machado, Júlio C. Sczancoski, Héctor Beltrán-Mir, Içamira C. Nogueira, Máximo S. Li, Juan Andrés, Eloisa Cordoncillo, and Elson Longo. A novel approach to obtain highly intense self-activated photoluminescence emissions in hydroxyapatite nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry*, 249:64–69, 2017.
- [55] A. Ghafarinazari, M. Scarpa, G. Zoccatelli, M. Comes Franchini, E. Locatelli, and N. Dalosso. Hybrid luminescent porous silicon for efficient drug loading and release. *RSC Adv.*, 7(11):6724–6734, 2017.

- [56] Tamilselvan Abiraman, Ganapathy Kavitha, Ramasamy Rengasamy, and Sengottuvelan Balasubramanian. Antifouling behavior of chitosan adorned zinc oxide nanorods. *RSC Adv.*, 6(73):69206–69217, 2016.
- [57] Xiaoyong Pan, Wei Ren, Liuqun Gu, Guan Wang, and Ye Liu. Photoluminescence from chitosan for bio-imaging. *Australian Journal of Chemistry*, 67(10):1422–1426, 2014.
- [58] Haowen Huang, Fang Liu, Shenna Chen, Qian Zhao, Bo Liao, Yunfei Long, Yunlong Zeng, and Xiaodong Xia. Enhanced fluorescence of chitosan based on size change of micelles and application to directly selective detecting Fe³⁺ in human serum. *Biosensors and Bioelectronics*, 42(1):539–544, 2013.
- [59] R S Oliveira, D O Maia, M R Pereira, and F R G E Silva. Preparation, characterization and luminescence study of chitosan membrane and powder forms with Eu³⁺ and Tb³⁺. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 47(5):392–398, 2010.
- [60] Duan K. Boanić, Lidija V. Trandafilović, Adriaan S. Luyt, and Vladimir Djoković. 'Green' synthesis and optical properties of silver-chitosan complexes and nanocomposites. *Reactive and Functional Polymers*, 70(11):869–873, 2010.
- [61] K. Hauffe. *Solid State Chemistry*, volume 58. 2014.
- [62] Nithin Kundachira Subramani. Revisiting Powder X-ray Diffraction Technique: A Powerful Tool to Characterize Polymers and their Composite Films. *Research & Reviews: Journal of Material Sciences*, 04(04):1–5, 2016.
- [63] Peter Moeck. *Transmission Electron Microscopy*, 2003.
- [64] D. R. Baer and S. Thevuthasan. *Characterization of Thin Films and Coatings*. Elsevier Ltd., third edition edition, 2010.
- [65] S.P. Jiang, J.G. Love, and S.P.S. Badwal. Electrochemical Techniques in Studies of Solid Ionic Conductors. *Key Engineering Materials*, 125-126:81–132, 1997.
- [66] Vadim F. Lvovich(auth.). *Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*. 2012.
- [67] Marc Bohner and Jacques Lemaitre. Can bioactivity be tested in vitro with SBF solution? *Biomaterials*, 30(12):2175–2179, 2009.
- [68] Jolanta Kumirska, Małgorzata Czerwicka, Zbigniew Kaczyński, Anna Bychowska, Krzysztof Brzozowski, Jorg Thöming, and Piotr Stepnowski. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8(5):1567–1636, 2010.
- [69] Dilyana Zvezdova. Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in. *Synthesis and characterization of chitosan from marine sources in Black Sea*, 3(1):65–69, 2010.

- [70] Vasilica Țucureanu, Alina Matei, and Andrei Marius Avram. FTIR Spectroscopy for Carbon Family Study. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(6):502–520, 2016.
- [71] L. A. Avinash Chunduri, Aditya Kurdekar, Bulagonda Eswarappa Pradeep, Mohan Kumar Haleyrigirisetty, Venkataramaniah K, and Indira K. Hewlett. Streptavidin conjugated ZnO nanoparticles for early detection of HIV infection. *Advanced Materials Letters*, 8(4):472–480, 2017.
- [72] A S Kuznetsov, Y-g Lu, S Turner, M V Shestakov, V K Tikhomirov, D Kirilenko, J Verbeeck, A N Baranov, and V V Moshchalkov. Preparation , structural and optical characterization of nanocrystalline ZnO doped with luminescent Ag-nanoclusters. 2(6):15955–15964, 2012.
- [73] E. J. Guidelli, O. Baffa, and D. R. Clarke. Enhanced UV Emission from Silver/ZnO and Gold/ZnO Core-Shell Nanoparticles: Photoluminescence, Radioluminescence, and Optically Stimulated Luminescence. *Scientific Reports*, 5(September), 2015.
- [74] Lixin Liu, Hongliang Zhang, Yuan Wang, Yurong Su, Ziwei Ma, Yizhu Xie, Haiting Zhao, Changcheng Chen, Yanxia Liu, Xiaosong Guo, Qing Su, and Erqing Xie. Synthesis and white-light emission of ZnO/HfO₂: Eu nanocables. *Nanoscale Research Letters*, 5(9):1418–1423, 2010.
- [75] I. Nainggolan, T. I. Nasution, S. R.E. Putri, D. Azdena, M. Balyan, and H. Agusnar. Study on chitosan film properties as a green dielectric. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 309(1), 2018.

Apéndice A

Curvas de ajuste para los espectros de fotoluminiscencia de las estructuras 2D

Los ajustes fueron realizados con el programa OriginPro 8.6, siguiendo el procedimiento detallado a continuación:

- Se tomó como base la membrana de quitosano, su espectro fue ajustado mediante una distribución lorentziana y se determinó la longitud de onda de máxima intensidad ($\lambda_{máx_1}$).
- Al espectro de la muestra quitosano-ZnO se lo ajustó con dos curvas lorentzianas, fijando el centro de una de ellas en el valor obtenido del ajuste anterior ($\lambda_{máx_1}$), y se determinó la longitud de onda de máxima emisión de la segunda curva ($\lambda_{máx_2}$).
- El mismo procedimiento del punto anterior se realizó con los espectros de las membranas de quitosano-HAp (7V) y quitosano-HAp (14V).

- En las muestras de quitosano-ZnO-HAp (7V) y quitosano-ZnO-HAp (14V) se utilizó tres curvas lorentzianas para su ajuste, y se fijó los centros de dos de ellas ($\lambda_{máx_1}$ y $\lambda_{máx_2}$), dejando libre la tercera curva.

La ecuación utilizada para los ajustes (distribución lorentziana) es:

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{\omega}{4(x - x_c)^2 + \omega^2}$$

Los resultados obtenidos con sus correspondientes gráficas son los siguientes:

Muestra	Intensidad máxima (u.a.)	Área total integrada
Quitosano	650	71847,25
Quitosano-ZnO	1590	213147,48
Quitosano-HAp (7V)	680	81966,34
Quitosano-HAp (14V)	460	63535,73
Quitosano-ZnO-HAp (7V)	4100	431577,29
Quitosano-ZnO-HAp (14V)	3140	337602,34

Tabla A.1: Área total integrada de las curvas de ajuste para los espectros de fotoluminiscencia en estructuras 2D.

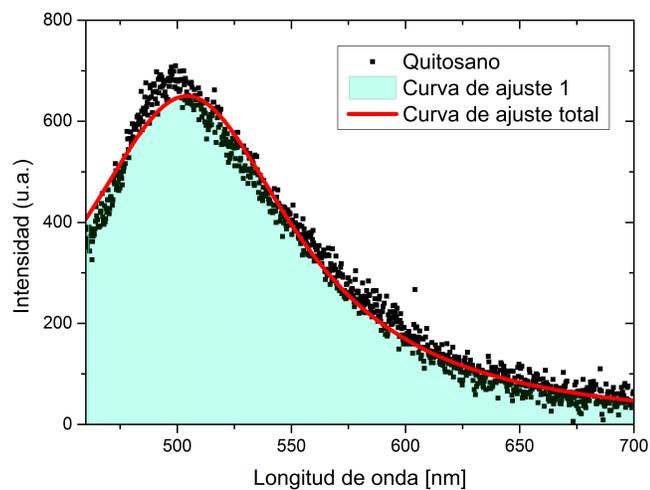


Figura A.1: Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano.

Curva de ajuste 1		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	504,24374	0,16573
ω	114,99856	0,52184
A	118331,25673	409,50232
Intensidad en x_c (u.a.)	650	-
Área bajo la curva	71847,25	-

Tabla A.2: Parámetros de la curva de ajuste: membrana de quitosano.

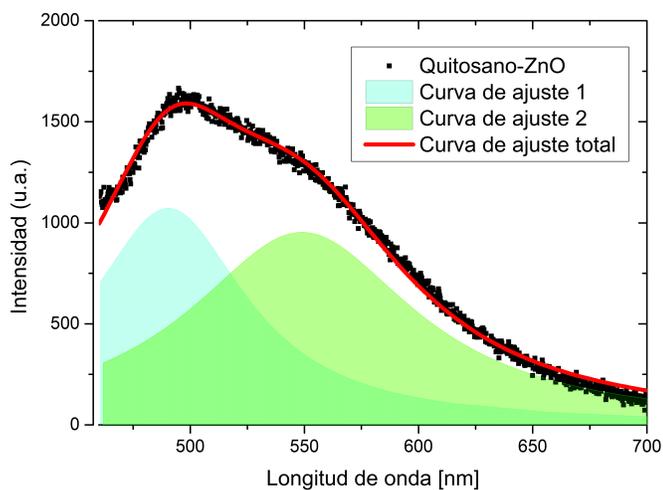


Figura A.2: Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-ZnO.

Curva de ajuste 1		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	504,24374	0
ω	82,7249	1,0625
A	139243,02557	1904,50954
Intensidad en x_c (u.a.)	1072	-
Área bajo la curva	88731,96	-
Curva de ajuste 2		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	545,3125	0,19216
ω	120,16378	0,65579
A	179891,09003	1404,35136
Intensidad en x_c (u.a.)	958	-
Área bajo la curva	123645,40	-

Tabla A.3: Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-ZnO.

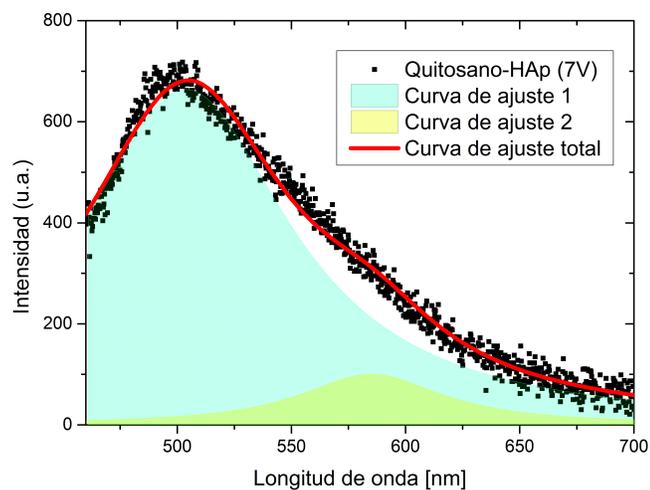


Figura A.3: Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-HAp (7V).

Curva de ajuste 1		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	504,24374	0
ω	111,08979	1,26241
A	115848,78037	1340,55136
Intensidad en x_c (u.a.)	664	-
Área bajo la curva	72007,93	-
Curva de ajuste 2		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	585,0321	0,2416
ω	75,94021	3,6289
A	11947,35047	849,71417
Intensidad en x_c (u.a.)	103	-
Área bajo la curva	9617,80	-

Tabla A.4: Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-HAp (7V).

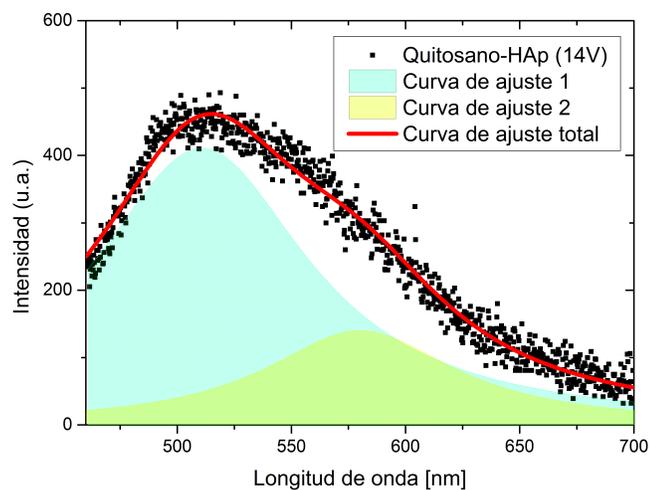


Figura A.4: Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-HAp (14V).

Curva de ajuste 1		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	504,24374	0
ω	113,83045	1,94295
A	73463,6811	1440,14477
Intensidad en x_c (u.a.)	413	-
Área bajo la curva	46697,43	-
Curva de ajuste 2		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	580,07925	0,42497
ω	101,59393	2,49034
A	22298,82792	1030,55025
Intensidad en x_c (u.a.)	140	-
Área bajo la curva	16615,98	-

Tabla A.5: Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-HAp (14V).

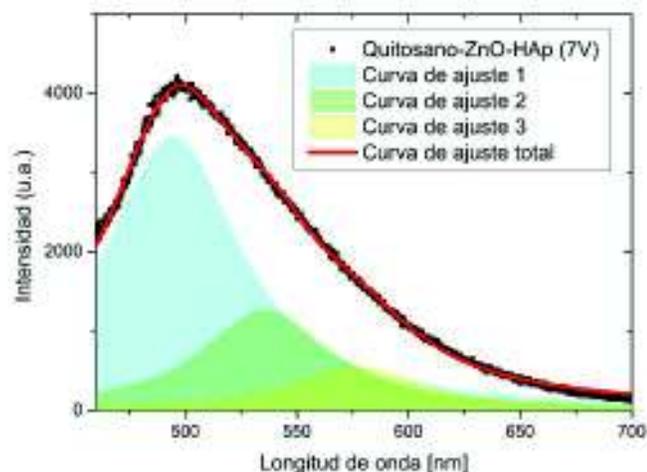


Figura A.5: Curva de ajuste para el espectro de fotoluminiscencia de la membrana de quitosano-ZnO-HAp (7V).

Curva de ajuste 1		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	504,24374	0
ω	82,93573	1,01637
A	370481,36551	1016,70995
Intensidad en x_c (u.a.)	3452	-
Área bajo la curva	269557,11	-
Curva de ajuste 2		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	545,3125	0
ω	69,70803	7,1043
A	80634,47005	1656,94205
Intensidad en x_c (u.a.)	1283	-
Área bajo la curva	111528,96	-
Curva de ajuste 3		
Parámetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	583,8308	2,20481
ω	68,18438	4,24189
A	39112,5952	8101,48194
Intensidad en x_c (u.a.)	558	-
Área bajo la curva	51112,49	-

Tabla A.6: Parámetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-ZnO-HAp (7V).

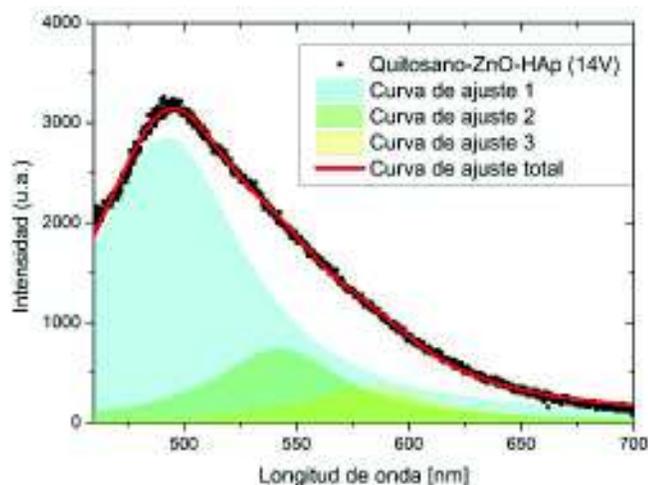


Figura A.6: Curva de ajuste para o espectro de fotoluminescência da membrana de quitosano-ZnO-HAp (14V).

Curva de ajuste 1		
Parâmetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	504,24374	0
ω	72,69096	0,92869
A	394309,26888	14989,01185
Intensidad en x_c (u.a.)	2850	-
Área bajo la curva	239936,99	-
Curva de ajuste 2		
Parâmetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	545,3125	0
ω	70,34579	6,38781
A	140082,23033	26819,01036
Intensidad en x_c (u.a.)	739	-
Área bajo la curva	64858,00	-
Curva de ajuste 3		
Parâmetro	Valor	Error Estándar
y_0	0	0
x_c	578,12306	2,11475
ω	71,44297	4,0937
A	62608,76168	1267,07245
Intensidad en x_c (u.a.)	366	-
Área bajo la curva	32238,97	-

Tabla A.7: Parâmetros de las curvas de ajuste: membrana de quitosano-ZnO-HAp (14V).