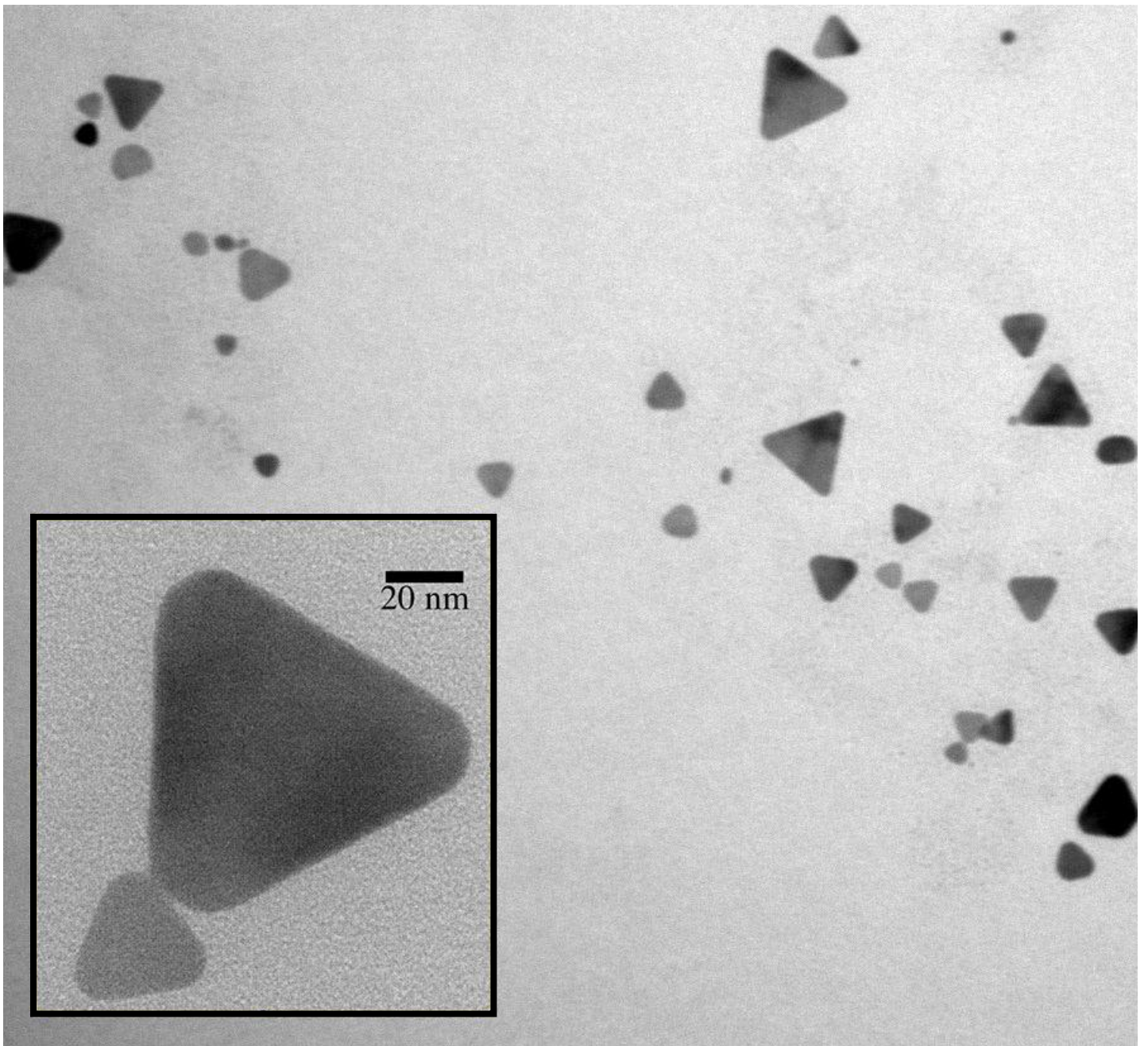




NANOPARTICULAS DE PLATA PARA SU USO COMO AGENTE ANTIBACTERIANO

Guzmán Carissimi

17/11/2015

Laboratorio de Biomateriales. Instituto de
Química Biológica Facultad de Ciencias

Agradecimientos

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la financiación otorgada.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República.

A Marcel Bentancor (Laboratorio de Biología Molecular Vegetal) por el apoyo recibido en las pruebas microbiológicas.

Al Laboratorio de Biomateriales y a todos sus integrantes, en especial a Santiago Botasini, Fernanda Cerdá y Eduardo Méndez.



Nanopartículas de plata para su uso como agente antibacteriano

Resumen

El presente proyecto plantea la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata planas, y el estudio comparativo de la incidencia de la forma de las nanopartículas, i.e. esféricas (AgNPe) o triangulares planas (AgNPt), en su acción antimicrobiana frente a la bacteria Gram positiva *Escherichia coli*. Tomando como paradigma la hipótesis de trabajo que plantea que la capacidad antimicrobiana está dada exclusivamente por la presencia de iones plata liberados por la lenta oxidación de las nanopartículas, se realizó una puesta a punto de la técnica de voltamperometría de *stripping* anódico para la cuantificación de los iones plata liberados por las nanopartículas triangulares. Los resultados sugieren que, en efecto, la actividad antibacteriana de las nanopartículas estaría dada por la presencia de iones plata, más que por la existencia de un factor inherente a las nanopartículas mismas.

Por su parte, la síntesis de nanopartículas triangulares presenta un mecanismo cinético complejo, teniendo como principales protagonistas al borohidruro de sodio (NaBH_4) y al peróxido de hidrogeno (H_2O_2), los cuales generarían reacciones opuestas y simultáneas que conllevan a la formación de AgNPs anisotrópicas. Los resultados obtenidos sugieren la posibilidad de diseñar un sensor colorimétrico de peróxido, capaz de detectar concentraciones en el rango nanomolar.

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
Resumen	3
Sección I Antecedentes	5
I.1 Introducción	6
I.2 Propiedades Ópticas de las Nanopartículas	7
I.3 Síntesis de Nanopartículas	14
I.4 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas	16
I.5 Determinación de ión plata y AgNPs	21
I.6 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	26
I.7 Técnica de dispersión de luz (DLS)	32
Sección II Desarrollo experimental	39
II.4 Conclusiones	67
II.5 Perspectivas futuras	68
Anexos	69

Sección I

Antecedentes

I.1 Introducción

En la actualidad existe un auge en el desarrollo de nanomateriales debido a las propiedades emergentes que surgen como consecuencia de la escala nanométrica. En este contexto, las nanopartículas de plata (AgNPs) presentan una gran demanda por parte de la industria, que busca explotar las propiedades antimicrobianas de amplio espectro a través de su inclusión en diversos productos comerciales como artefactos médicos auto-esterilizantes, purificadores de agua, prendas de vestir y productos cosméticos ¹⁻⁸.

¿Por qué las nanopartículas presentan nuevas propiedades?

Un nanómetro es la mil millonésima parte de 1 metro ($1 \times 10^{-9} \text{m}$). A modo de ejemplo, si comparamos esta escala con una célula promedio de $10 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro, una partícula de 1 nanómetro entraría 10 mil veces en esta célula. Al estar trabajando con escalas tan reducidas, las propiedades físicas (conductividad, punto de fusión, resistencia, propiedades ópticas, magnéticas, etc.) son diferentes a las que presenta el mismo material en escala macroscópica, debido a que la mayor relación área superficial/volumen de la partícula repercute directamente sobre las propiedades de los materiales, ya sea potenciándolas o cambiándolas.

Una de las propiedades más explotadas de los nanomateriales es el incremento en las absorptividades molares que presentan las soluciones coloidales, siendo ejemplos clásicos de esto las llamadas *nanopartículas plasmónicas*, de metales como el oro, el cobre o la plata. Para entender el fundamento del comportamiento óptico es necesario definir primero el concepto de *resonancia del plasmón superficial*, concepto que se abordará en la sección siguiente.

I.2 Propiedades Ópticas de las Nanopartículas

En la técnica de espectroscopía UV-Vis la cantidad de luz absorbida y dispersada por una muestra se cuantifica empleando un fotodetector que determina la cantidad de luz que se trasmite a través de la celda espectrofotométrica (Figura 1). En esencia se mide la relación entre la intensidad de luz emitida por la fuente y la registrada por un fotodetector; este cociente recibe el nombre de transmitancia. Desde el punto de vista analítico, en lugar de expresar los valores como transmitancia, se emplea el logaritmo decimal negativo de este valor, definido como absorbancia; magnitud que de acuerdo con la Ley de Lambert- Beer es directamente proporcional a la concentración de la muestra en un cierto rango cuyo límite se determina experimentalmente.

Las nanopartículas de plata tienen propiedades ópticas que son sensibles al tamaño, forma, concentración, estado de agregación e índice de refracción del medio. Esto hace a la técnica de espectroscopía UV-Vis una herramienta valiosa para la caracterización de los nanomateriales.

El registro de las medidas de absorbancias en función de la longitud de onda de la luz empleada se conoce como el espectro de absorción de la muestra, que en el caso particular de las nanopartículas plasmónicas se denomina espectro de resonancia del plasmón superficial (SPR).

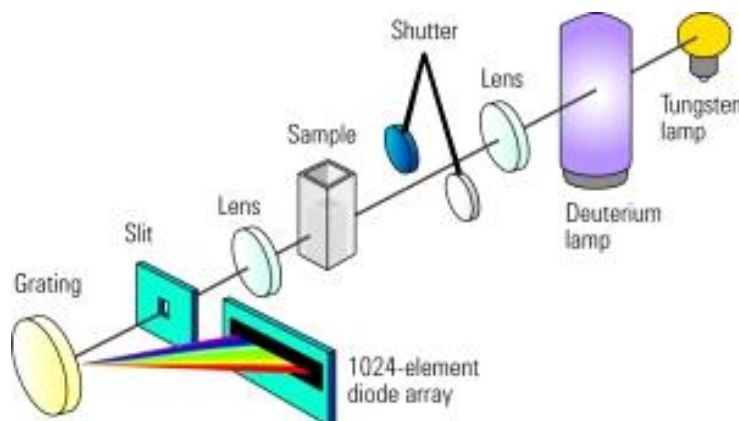


Figura 1. Esquema de la disposición de los elementos ópticos para las medidas de transmitancia en un espectrofotómetro UV-Vis. Adaptado de Ref⁹

El plasmón de superficie (PS) es la oscilación colectiva de los electrones de conducción en la superficie de un metal cuando son excitados por el campo eléctrico asociado a la naturaleza electromagnética de la luz. El campo eléctrico (E) oscilante que interactúa con los electrones superficiales del metal, debido a su carga negativa, oscilará en sentido opuesto al campo. En consecuencia, se genera una separación de cargas en la partícula y por lo tanto un campo eléctrico resultante con sentido contrario al impuesto por el haz de luz. Esto produce una vibración electromagnética en la partícula con una frecuencia de oscilación característica, ω_p :

$$\omega_p = \sqrt{\frac{4 \pi n e^2}{m}} \quad (1)$$

donde n es el numero de electrones, e es la carga del electrón y m su masa. La frecuencia recibe el nombre de frecuencia de plasma y depende fundamentalmente de la densidad de electrones que tenga la partícula, siendo característica para cada material y morfología de la nanopartícula.

De esta manera se reconocen tres posibles escenarios: El primero resulta de la condición en la cual la longitud de onda es inferior al diámetro de la partícula y por tanto no se produce una oscilación colectiva de los electrones, sino que las ondas simplemente recorren la superficie entre el metal y el dieléctrico. En estos casos no se habla una frecuencia de resonancia, sino de una función de dispersión.

En el segundo caso, cuando la longitud de onda es del mismo orden que el diámetro de la partícula, se producen ondas estacionarias, dando lugar a algunas frecuencias permitidas, cuya longitud de onda sea un número entero de veces el largo del sistema.

Por último, si la longitud de onda es ^{Mayor}menor al diámetro de la partícula, toda la superficie experimentará un campo único, obteniéndose un plasmón de superficie localizado en toda la partícula. Este fenómeno se describe matemáticamente mediante la teoría de Mie¹⁰, que plantea las soluciones de las ecuaciones de Maxwell al estudio de absorción y dispersión de luz de las nanopartículas esféricas

en función de la longitud de onda de luz incidente. La teoría de Mie permite explicar y predecir el comportamiento de sistemas coloidales de nanoesferas (Figura 2). Para el caso de estructuras no esféricas, se utilizan métodos computacionales para obtener soluciones numéricas a las ecuaciones de Maxwell.

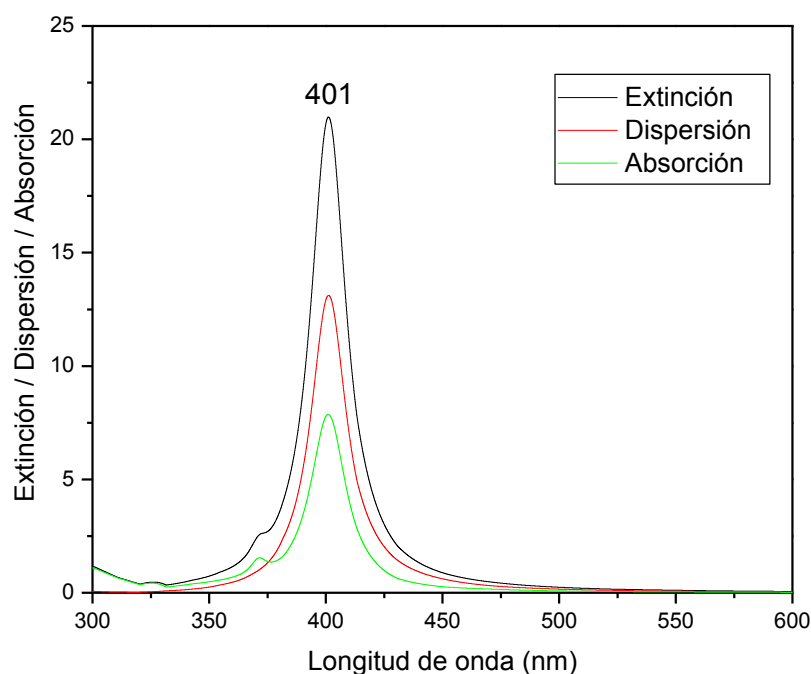


Figura 2. Simulación de los espectros de dispersión, absorción y la suma de ambos (extinción) de las nanopartículas esféricas de plata monodispersas de 20 nm de radio¹¹.

Estudio matemático de las propiedades ópticas

Como se mencionaba anteriormente, la teoría de Mie permite predecir el espectro de extinción para el plasmón superficial con soluciones analíticas exactas de las ecuaciones de Maxwell solamente para esferas y esferoides¹². Para nanopartículas de otras formas, es necesario recurrir a aproximaciones basadas en cálculos numéricos, como MMP (*Multiple Multipole Method*), FDTD (*Finite Difference Time Domain*) y DDA (*Discrete Dipole Approximation*)¹³.

Entre los anteriores, el método DDA es el más utilizado para el cálculo de las propiedades ópticas de las nanopartículas de plata triangulares. En este análisis

numérico, el objeto de estudio es representado sobre un eje de coordenadas en tres dimensiones en donde cada uno de los puntos del espacio (localizados según el vector posición $\mathbf{r}_i$ con $i = 1, 2, 3, 4, 5, \dots, N$ corresponde a un dipolo, cada uno con su constante de polarizabilidad α_i . El objeto definido es excitado por una onda monocromática plana, la cual genera un campo eléctrico dado por la siguiente ecuación:

$$\mathbf{E}_{inc}(\mathbf{r}, t) = \mathbf{E}_0 \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i) \quad (2)$$

donde $\mathbf{r}_i$ es el vector posición, t el tiempo, ω la frecuencia angular, y k el número de onda. Cada uno de los dipolos del sistema queda sujeto al efecto del campo eléctrico generado por la onda luminosa y al campo eléctrico que surge de los dipolos inducidos contiguos ($\mathbf{E}_{dip}$). En resumen, el campo eléctrico local de la nanopartícula queda expresado en la siguiente ecuación:

$$\mathbf{E}_{t,loc} = \mathbf{E}_{inc,t} + \mathbf{E}_{dip,t} = \mathbf{E}_0 \exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_i) - \sum_{i \neq j} \mathbf{A}_{ij} \cdot \mathbf{P}_j \quad (3)$$

donde $\mathbf{P}_i$ es el momento dipolar del elemento i y $\mathbf{A}_{ij}$ (con $i \neq j$) es una matriz cuya interacción con $\mathbf{P}_j$ es:

$$\mathbf{A}_{ij} \mathbf{P}_j = \frac{\exp(i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_{ij})}{r_{ij}^3} \left\{ k^2 r_{ij} (\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{P}_j) + \frac{(1 - i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}_{ij})}{r_{ij}^2} [\mathbf{r}_{ij}^2 \cdot \mathbf{P}_j - 3r_{ij} (\mathbf{r}_{ij} \cdot \mathbf{P}_j)] \right\} \quad (4)$$

El cálculo del momento dipolar $\mathbf{P}_i$ se realiza con la siguiente ecuación:

$$\mathbf{P}_i = \alpha_i \cdot \mathbf{E}_{i,loc} \quad (5)$$

donde α_i representa la polarizabilidad de cada uno de los i -ésimos puntos dipolares.

En 1909 Lorentz encontró una relación simple, exacta y directa entre las propiedades dieléctricas de una sustancia y la polarizabilidad de los átomos individuales que componen la misma. La expresión de Lorentz-Lorenz, también conocida como expresión de Clausius-Mossotti, relaciona las variables anteriores:

$$\alpha_i = \frac{3d^3}{4\pi} \frac{(\epsilon_i - 1)}{(\epsilon_i + 2)} \quad (6)$$

donde ϵ_i representa la constante dieléctrica de la partícula para cada i -ésimo punto y d la distancia entre los dipolos. Es importante subrayar que el valor de d depende de la sensibilidad con la cual se busquen los resultados.

La absorción de luz (C_{abs}) por unidad de área, en términos de momentos dipolares, queda determinada mediante las siguientes ecuaciones:

$$C_{\text{abs}} = \frac{4\pi k}{|E_0|^2} \sum_{i=1}^N \left\{ \text{Im} [\mathbf{P}_i \cdot (\alpha_i^{-1}) * \mathbf{P}_i *] - \frac{2}{3} k^3 |\mathbf{P}_i|^2 \right\} \quad (7)$$

$$C_{\text{sca}} = C_{\text{ext}} - C_{\text{abs}} \quad (8)$$

donde el asterisco representa la función complejo conjugada correspondiente. Mediante el cálculo de C_{abs} es posible determinar los espectros de absorción para diferentes partículas de tamaño y forma arbitrarios. Cabe destacar que la única limitante de este método es la cantidad de dipolos (N) empleados para representar el objeto de estudio. A mayor número de puntos dipolares mayor es la precisión del método, aunque también será mayor gasto computacional. En general, para el caso de nanopartículas triangulares se trabaja con un número superior a 10^4 dipolos^{13,14}.

En resumen, las propiedades ópticas de las nanopartículas dependen del tamaño y la forma de la misma, del medio en el cual se encuentren y del campo eléctrico generado por la onda electromagnética incidente¹³. Para el caso de las partículas esféricas y esferoides, las propiedades ópticas quedan descritas matemáticamente mediante las soluciones de las ecuaciones de Maxwell descritas en la teoría de Mie. Para los restantes casos, es necesario aplicar aproximaciones numéricas. El método DDA permite tomar en consideración formas y tamaño de partículas arbitrarios dando como resultado simulaciones de los espectros de absorción de las mismas, siendo especialmente útil para describir las propiedades ópticas de las nanopartículas planas.

Resonancia del Plasmón en AgNPs triangulares

Los espectros de absorción de las nanopartículas planas, en donde predomina un plano de crecimiento sobre otro, presentan más de un máximo de absorción. Esto se debe a que hay más de un posible modo de oscilación¹³. Los nanotriángulos son prismas tetraédricos que tienen dos modos de vibración dipolares y cuadrupolares (considerando los sentidos longitudinales y transversales de la partícula) (Figura 3).

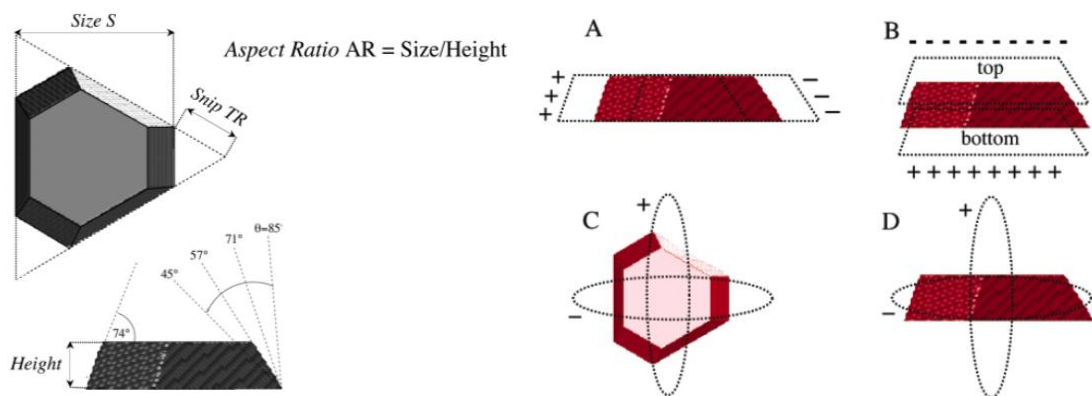


Figura 3. Representación esquemática de los modos de resonancia de plasmón que participan en las AgNPs. El modo dipolar en el plano y el dipolar fuera de plano están representados en (A) y (B), respectivamente. Los modos cuadrupolares correspondientes están representados en (C) y (D), respectivamente. Adaptado de Ref. ¹³

Estos modos de oscilación se ven reflejados en el espectro de extinción con la presencia de diferentes bandas (Figura 4). Dentro del rango visible, el momento de resonancia dipolar en el plano se localiza entre 600-1000 nm, el momento dipolar fuera de plano se ubica entre 400-600 nm y el momento cuadrupolar en plano aparece entre 400-600 nm, mientras que el momento cuadrupolar fuera de plano se localiza alrededor de los 340 nm, dentro de la región UV del espectro electromagnético (Tabla 1). Como es de esperarse, las posiciones de estos picos varían en función de tres características: el tamaño, el coeficiente de relación entre el eje mayor y el eje menor (relación de aspecto) y el truncamiento, definido como el material faltante en el vértice de un triángulo.

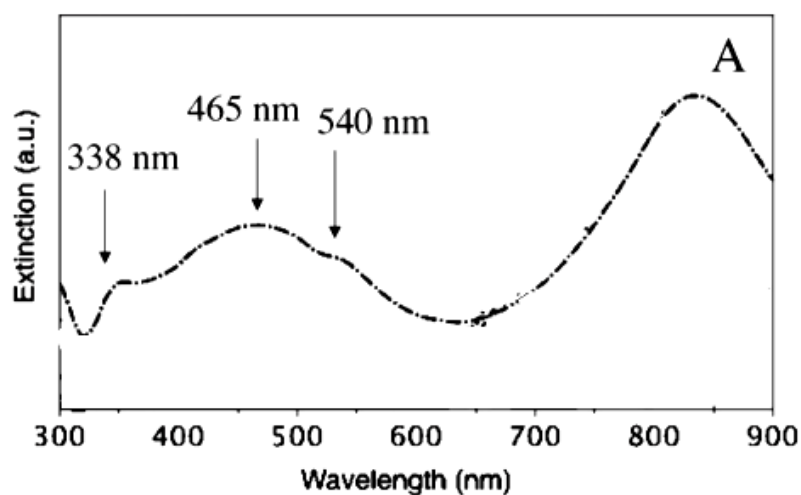


Figura 4. Espectro simulado de AgNPt. En *ca.* 850 nm aparece la banda de absorción correspondiente al modo de resonancia dipolar en el plano. El modo dipolar fuera del plano se ubica en 465 nm, el modo cuadrupolar en el plano en 540 nm y el modo cuadrupolar fuera de plano en 338 nm. Adaptado de Ref. ¹³

Tabla 1. Interpretación de los máximos observados en los espectros UV-Vis de los nanotriángulos en el UV-Vis-NIR. Adaptado de Ref. ¹⁵

Posición del máximo de absorción	Interpretación en función del modo de resonancia	Observaciones
<i>ca.</i> 358 nm	Modo cuadrupolar	Esfera de 60 nm
<i>ca.</i> 369 nm	Modo cuadrupolar	Esfera de 30 nm
<i>ca.</i> 422 nm	Modo dipolar	Esferas
600-1000 nm	Modo dipolar sobre el plano para nanotriángulos.	El valor exacto dentro del rango depende del tamaño de la nanopartícula.
400-600 nm	Modo dipolar fuera del plano y al modo cuadrupolar sobre el plano para nanotriángulos.	Los valores exactos dependen del tamaño de la nanopartícula. El pico del modo dipolar fuera del plano es un máximo pequeño y está ubicado hacia longitudes de onda menores respecto al cuadrupolar fuera del plano
<i>ca.</i> 340 nm	Modo cuadrupolar fuera del plano.	Nanotriángulos

I.3 Síntesis de Nanopartículas

Se ha establecido como límite arbitrario que para que un material sea considerado dentro de la escala nanométrica deberá poseer al menos una de sus dimensiones comprendida entre 1 y 100 nm¹⁶.

En materia de síntesis, la mayoría de las técnicas se basan en reducir la plata iónica de una sal (generalmente AgNO_3) a Ag^0 , mediante el uso de un agente reductor “suave” como el citrato, o “fuerte” como el borohidruro de sodio (NaBH_4). Más allá de las diferencias en los protocolos, el proceso se puede esquematizar en dos pasos, i) la formación de núcleos o “semillas” metálicas y ii) el crecimiento cristalino de las semillas mediante la continua reducción de una mayor cantidad de iones metálicos. Las primeras síntesis controladas datan del año 2000, realizadas en solventes orgánicos. Los desarrollos en los últimos 15 años han hecho posible la síntesis de AgNPs en fases sólida, líquida y gaseosa¹⁷, con asistencia de láser¹⁸, ultrasonido¹⁹, espray pirrólico¹⁷, e inclusive la biogénesis de nanopartículas empleando seres vivos como bacterias y plantas^{20,21}. Con la gran variedad de técnicas y protocolos sobre la mesa, existen métodos de síntesis para casi cualquier tipo de forma imaginable (esferas, triángulos²², discos, corazones²³, icosaedros²⁴, entre otras¹⁹).

Nanopartículas no esféricas

De acuerdo con la teoría de Wulff²⁵, forzar la síntesis de estructuras no esféricas no es una tarea fácil, ya que implica competir contra la tendencia natural del sistema por minimizar la energía de Gibbs superficial, debido a la gran simetría de las esferas. Por esta razón la mayoría de las nanopartículas sintetizadas tienen formas que van desde esferas hasta partículas altamente facetadas como octaedros, pero siempre manteniendo una forma isotrópica. La síntesis de estructuras anisotrópicas está asociada a un control cinético, que favorece el crecimiento de facetas cristalinas preferenciales.

Se ha invertido mucho esfuerzo en entender el mecanismo de formación de las nanopartículas no esféricas. La teoría con mayor aceptación postula que los

surfactantes empleados en la síntesis se unen preferencialmente a un plano cristalino específico, bloqueándolo y permitiendo a la partícula crecer a distintas velocidades en los distintos planos²⁶⁻²⁸. Sin embargo, el crecimiento anisotrópico no depende únicamente de la presencia de ligandos con afinidades diferentes por las distintas caras cristalinas, sino también de la simetría del cristal^{16,29,30} y la relación molar de los reactivos. Algunos autores¹⁶ encuentran defectos en los núcleos de los cristales atribuidos a la formación de partículas planas. Estudios de microscopías electrónicas de alta resolución y difracción de rayos X, revelan la existencia de defectos de apilamiento atómico. Uno de los defectos más notorios en partículas planas es llamado “planos gemelos” (*twin plane*), observados en planos de crecimiento que parecerían crecer unos sobre otros (Figura 5), como resultado de átomos erróneamente ensamblados.

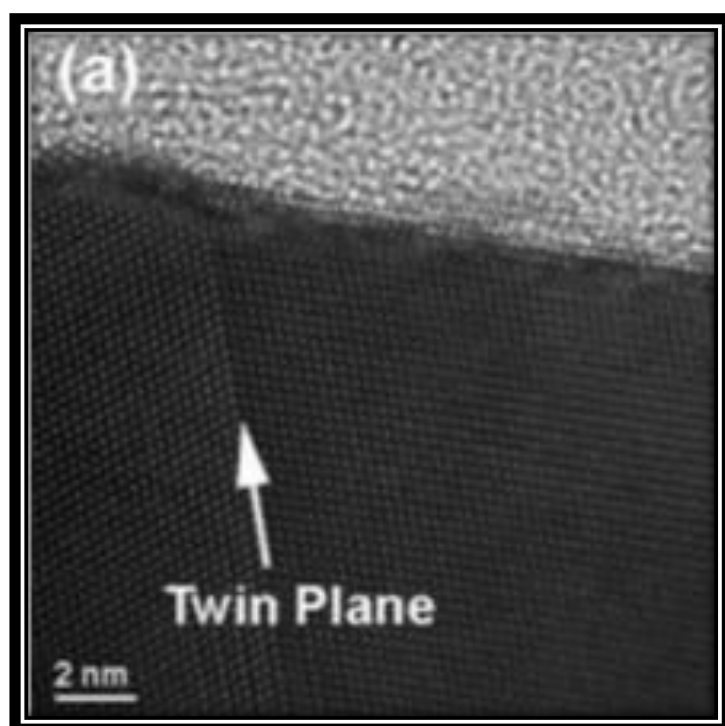


Figura 5. Ejemplos de errores en el apilamiento atómico en AgNPt Adaptado de Ref. ¹⁶

Como destacan Zhang *et al.*²² es importante entender el rol de cada reactivo en la síntesis. Por ejemplo, Botasini *et al.*²³ estudiaron sistemáticamente la incidencia de la relación molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ en el control de la morfología. Mientras la

concentración de NaBH_4 aumenta, las formas termodinámicas más favorables se hacen más probables. A nivel molecular puede ser entendido como un incremento de la probabilidad de colisiones atómicas que conllevan a un crecimiento uniforme en todas las direcciones.

I.4 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas

El efecto bactericida de las nanopartículas de plata aún sigue siendo un tema de controversia. Por un lado, algunos autores sostienen que la oxidación de la superficie de las nanopartículas es responsable de la liberación de iones plata, los cuales son tóxicos para la gran mayoría de bacterias^{31,32}. En las farmacopeas las soluciones de Ag^+ están descritas como antisépticos y desinfectantes de aplicación tópica, incluidas en el grupo D08 (concretamente con el código D08AL01³³) del código internacional ATC (**A**natomical, **T**herapeutic, **C**hemical). El mecanismo de acción de los iones plata estaría basado en su interacción con los grupos sulfhidrilos de los biotioles o los enlaces de hidrógeno³⁴ presentes en las proteínas, pudiendo inhibir algunas enzimas celulares esenciales para la vida del organismo. Los iones Ag^+ también podrían interactuar con las bases del ADN³⁵ interrumpiendo el equilibrio del aparato celular, aunque la importancia de este último mecanismo en términos de su acción letal no está del todo clara aún.

Además de sus efectos enzimáticos, las nanopartículas podrían internalizarse en la célula y depositarse en vacuolas y paredes celulares, dañándolas e inhibiendo la división celular. Por este motivo, otros autores³⁶ plantean que el mecanismo de acción estaría dado por la propia nanopartícula de plata, capaz de dañar la integridad de las estructuras celulares, como lo hacen los nanotubos al insertarse en la membrana celular³⁷. La plata metálica tiene una alta afinidad por los tioles, los cuales forman parte de los componentes celulares en todos los niveles estructurales. A modo de ejemplo, la mitocondria tiene una concentración de biotioles de entre 60 y 90 mM³⁸; este sentido las AgNPs podrían unirse a la mitocondria dañándola.

De acuerdo con la bibliografía consultada, el efecto bactericida de las nanopartículas supera al presentado por la penicilina³⁹. Sumando lo antedicho con la posibilidad que tienen las nanopartículas de fijarse a textiles^{40,41}, plásticos⁴² y geles⁴³, el abanico de potenciales aplicaciones que se abre es realmente amplio. Algunas de éstas ya se encuentran en productos del hogar, como el caso de textiles que previenen los malos olores producidos por hongos y bacterias, *tuppers* con nanopartículas que retrasan la descomposición de alimentos, materiales médicos autoesterilizantes, entre muchas otras posibilidades y promesas que retienen estos materiales.

Dependencia del efecto antibacteriano con la forma de las nanopartículas

Pal *et. al.*⁴⁴ comparan la acción antibacteriana de las nanopartículas de plata con forma de bastón, esféricas y triangulares con la de los iones Ag^+ del AgNO_3 en solución frente a muestras de *E. coli* incubadas en placas de agar con una concentración inicial de 10^7 UFC/mL. Para niveles de concentración de 1, 12.5, 50 y 100 μg , los iones Ag^+ resultaron ser los menos eficientes, seguidos por los bastones y las esferas. Los triángulos fueron los más efectivos (Figura 6), evidenciando un marcado efecto de la morfología sobre el desempeño de las partículas como agentes bactericidas.

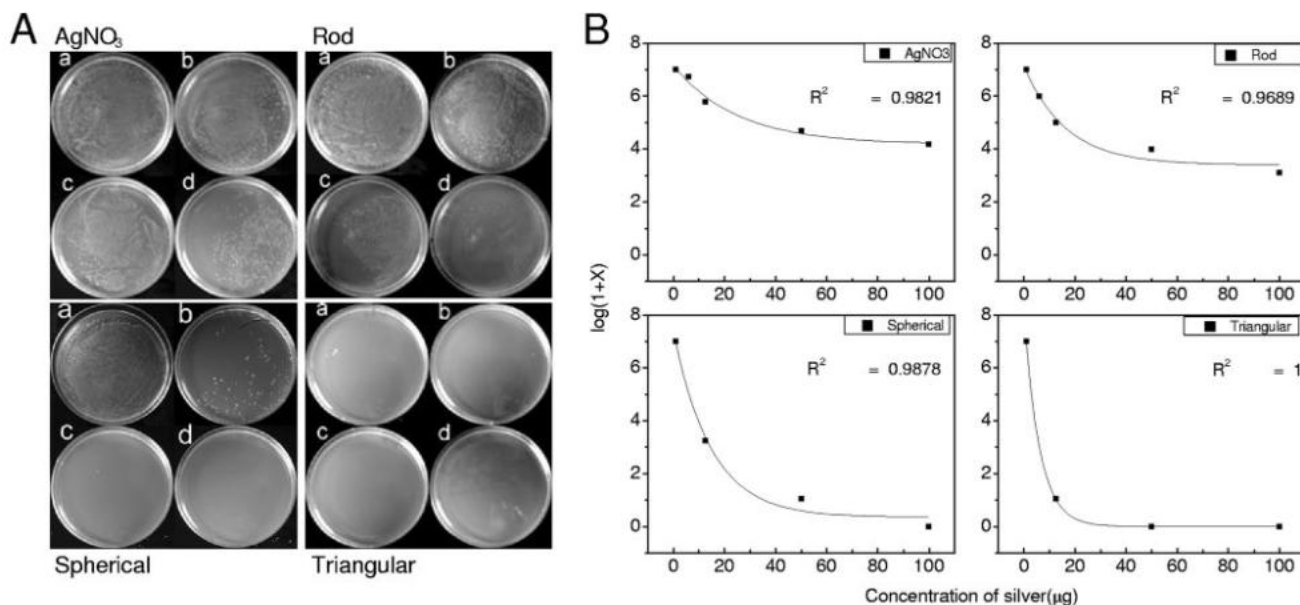


Figura 6. (A) Placas de Petri suplementadas con 107 UFC/ml de *E. coli*, incubadas con diferentes formas y concentraciones de AgNP: (a) 1, (b) 12.5, (c) 50 y (d) 100 µg. (B) Número de colonias de *E. coli* expresadas como $\log(1 + \text{número de colonias cultivadas en A})$, en función de las concentraciones de plata. Adaptado de Ref. ⁴⁴

Relación superficie/volumen

Carlson *et al.* ⁴⁵ presentaron una muy completa investigación donde comparan la toxicidad de las AgNPs esféricas de distintos tamaños (15, 30 y 55 nm) en rangos de concentraciones entre 10 y 75 µg/mL, en macrófagos alveolares de ratón (Figura 7). Las nanopartículas de 15 nm son las que presentaron la mayor toxicidad celular en todas las pruebas realizadas. Esto se explicaría por una mayor relación superficie/volumen, que aumentaría la liberación de iones plata, tóxicos para las células. Además por su tamaño, las nanopartículas pueden penetrar en las células con mayor facilidad, lo cual podría desencadenar otros efectos tóxicos dentro de la célula⁴⁶. En este sentido resultan muy interesantes y paradójicos los experimentos comparativos donde se relacionan la funcionalidad de las mitocondrias en los macrófagos frente a los distintos tamaños y concentraciones de AgNPs, y nanopartículas de óxido de titanio (TiO₂) (Figura 8). Los resultados muestran cómo, a diferencia de las de plata, las nanopartículas TiO₂ no presentan toxicidad elevada para las células y por ende la escala nano no sería suficiente por sí sola para tornar a un material como tóxico.

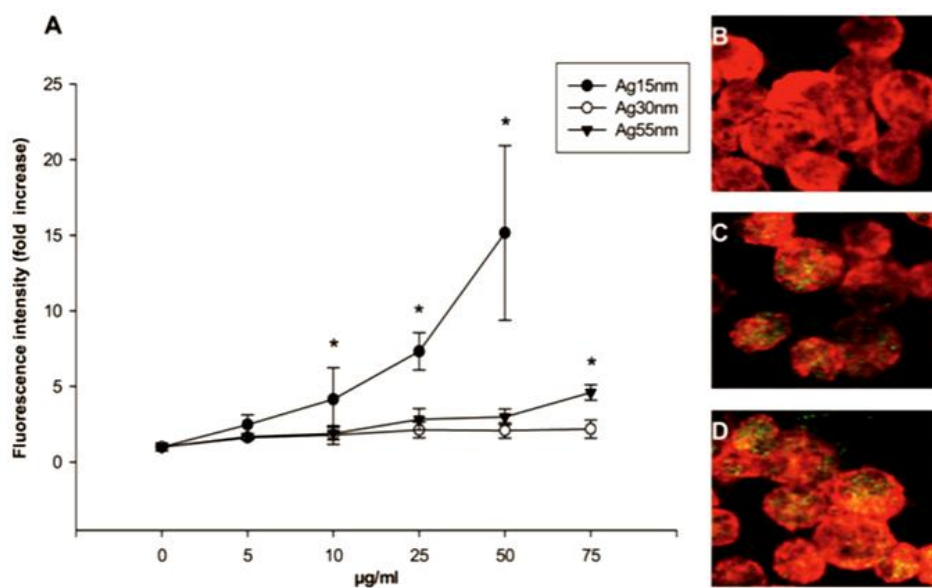


Figura 7. Efecto de AgNPe en generación de especies reactivas de oxígeno en los macrófagos. Después de 24 hs de incubación con nanopartículas de plata, la intensidad de fluorescencia de diclorofluoresceína (DCF) se evaluó mediante (A) lector de microplacas y (B-D) microscopía de fluorescencia.

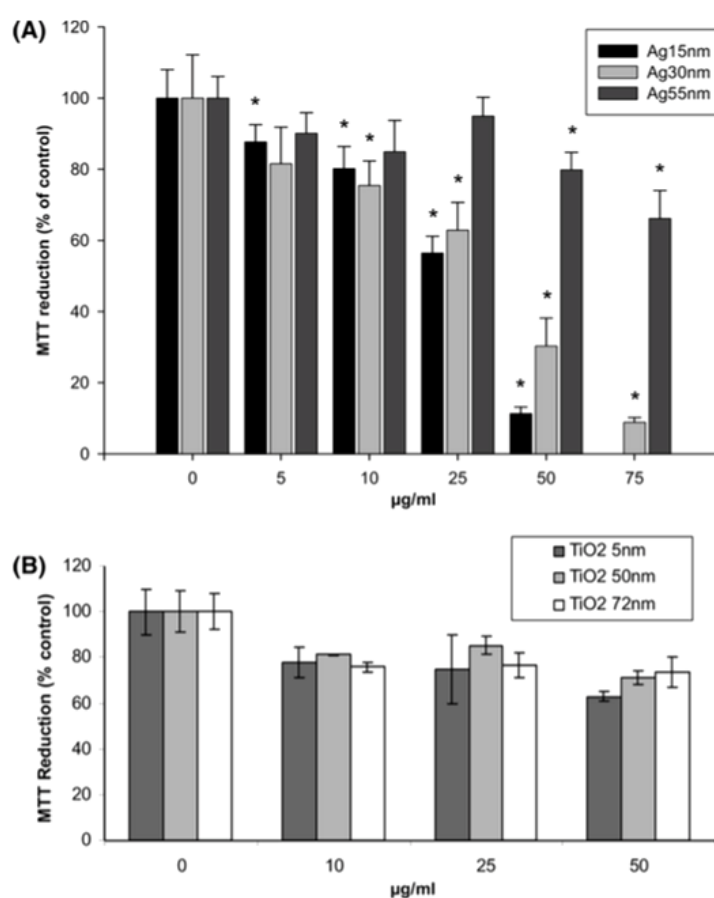


Figura 8. Efecto de las AgNPe y las nanopartículas de TiO₂ sobre la función mitocondrial en los macrófagos. Ésta se evaluó por el ensayo de reducción de bromuro de 3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) después de 24 hs de tratamiento de nanopartículas. Los valores de densidad óptica (DO) se calcularon como porcentajes de la DO medidos en las células control. Los datos se expresan como la media $\pm$ desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Los asteriscos (*) indican una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los controles ($p < 0.05$). (A) La función mitocondrial se redujo significativamente por Ag-15 nm a concentraciones superiores a 5 $\mu\text{g/mL}$, por Ag-30 nm a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$, y por Ag-55 nm a partir de 50 $\mu\text{g/mL}$, indicando una posible dependencia de la citotoxicidad al tamaño de la partícula. (B) Por su parte, las nanopartículas de TiO₂ no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa en comparación con los controles para cualquiera de los tamaños examinados.

Cuantificación de la actividad antimicrobiana

Por definición, un agente antimicrobiano es un compuesto químico, natural o sintético que mata o inhibe el crecimiento bacteriano. Los agentes capaces de matar microorganismos son denominados agentes *-cidas*, con un prefijo que indica el microorganismo sobre el cual ejerce su acción (bactericida, fungicida, virucida). Por su parte, los compuestos bacteriostáticos son aquellos que detienen el crecimiento y se denominan *-státicos* (bacteriostático, fungistático y virustático)⁴⁷.

La técnica de difusión en agar es el método comúnmente empleado para cuantificar la capacidad antimicrobiana de los nanomateriales. La interpretación de resultados está basada en el modelo de difusión libre del antibiótico en el medio. La técnica involucra la aplicación de soluciones de antibióticos en discos de papel absorbente depositados en la superficie de las placas de agar, sembradas con bacterias. Los antibióticos difunden desde las fuentes hacia el agar, inhibiendo el crecimiento bacteriano, dando lugar a “zonas claras” libres de bacterias. De acuerdo con el tamaño del diámetro del halo de inhibición es posible establecer comparativamente la efectividad de cada antibiótico^{48,49}.

I.5 Determinación de ión plata y AgNPs

La determinación de los iones plata, y su distinción de las AgNPs es uno de los desafíos analíticos más importantes en relación a la identificación del agente responsable de la acción antimicrobiana. Las técnicas habituales de determinación de la concentración de los iones plata en solución, requiere del aislamiento del ión de las nanopartículas de plata, por lo que es necesario contar con herramientas de separación previa (cromatografías de alta resolución, centrifugaciones, etc.) para cuantificar por separados ambas especies.

Las técnicas electroquímicas ofrecen una posible salida, ya que en principio ambas especies (AgNPs, Ag⁺) experimentan reacciones redox opuestas.

Voltamperometría de redisolución anódica

La técnica voltamperométrica de redisolución anódica (ASV, *Anodic Stripping Voltammetry*) está basada en la pre-concentración de un analito presente en disolución, sobre la superficie de un electrodo, para su posterior redisolución, que genera como respuesta un pico de intensidad correspondiente al potencial de oxidación del analito. Si las condiciones experimentales se mantienen constantes durante la etapa de pre-concentración, la intensidad de pico registrada se comporta como una propiedad aditiva con la concentración del analito, dentro de cierto rango que se determinará experimentalmente. A partir de una curva de calibración puede entonces determinarse la concentración en disolución de la especie pre-concentrada. La mayor ventaja de la técnica (en comparación con la voltamperometría directa y cíclica), radica principalmente en la pre-concentración del analito en el electrodo, dando de esta manera límites de detección en el orden de 10^{-10} - 10^{-11} M⁵⁰. Por otra parte, en condiciones de medida estándar, la localización

del pico de oxidación coincide con el potencial de Nernst para la reacción de estudio, por lo que también permite la identificación química de la especie pre-concentrada.

La técnica se realiza en dos etapas: una electro-deposición catódica seguida de una redisolución anódica con un barrido apropiado de potencial dependiendo del potencial redox del metal de estudio. La etapa de electro-deposición se lleva a cabo en una celda electroquímica con agitación constante, a un potencial levemente por debajo del potencial de reducción del analito de interés⁵⁰. Este potencial de reducción se mantiene durante un cierto lapso de tiempo, denominado *tiempo de deposición* (t_d) generalmente entre 2 y 12 min en función de los niveles de concentración de los analitos. Como el área del electrodo es pequeña y t_d es mucho menor que el tiempo que se necesita para una electrolisis exhaustiva, la intensidad de corriente (i_d) permanece prácticamente constante durante todo el proceso, siendo el número de moles de metal depositado igual a:

$$\text{numero de moles} = \frac{i_d t_d}{nF} \quad (9)$$

donde n es el número de electrones intercambiados y F es la constante de Faraday. La intensidad de la respuesta voltamperométrica, i_p , es el parámetro experimental que se relaciona con la concentración del analito⁵⁰.

Las condiciones del proceso de pre-concentración deben ser cuidadosamente controladas para obtener una buena reproducibilidad en las medidas. En este sentido, para la generación de una curva de calibración entre intensidad y concentración del analito se deben fijar varias variables como el potencial de reducción del ión, el tiempo de deposición, la velocidad de agitación, la geometría y volumen de la celda, la naturaleza del electrolito soporte y el área del electrodo de trabajo. Esto supone la necesidad de generar una curva de calibración con las condiciones dadas, previo a cada análisis. Entre todas las variables descritas, la agitación es un factor clave, dado que el transporte convectivo de los iones hacia la superficie del electrodo de trabajo afecta la cantidad de iones depositados, influyendo en la sensibilidad y precisión de la medida.⁵⁰

El barrido de potencial hacia valores más positivos que el de deposición puede hacerse aplicando cualquiera de los programas de potencial conocidos, desde el más sencillo, como la voltamperometría de barrido lineal, hasta los más complejos

como la voltamperometría diferencial de onda cuadrada. Cuando se alcanza el potencial del par redox correspondiente al analito depositado, se produce la oxidación electroquímica del metal, dando lugar al pico de la redisolución, cuya intensidad será proporcional a la concentración del metal, cerrando el fundamento de la determinación cuantitativa.

En el tratamiento teórico de la etapa de redisolución debe tenerse en cuenta el espesor de capa de iones depositados (l). Para películas delgadas y bajas velocidades de barrido (v), se produce el agotamiento o redisolución total del analito, comportamiento que se denomina de capa delgada, caracterizado por la proporcionalidad entre i_p y v . Para películas gruesas y altas velocidades de barrido, predomina el comportamiento difusivo y la intensidad de pico es proporcional a $v^{1/2}$. Normalmente para velocidades menores a 500 mV/s se observan comportamientos de capa delgada. Una ecuación aproximada para la corriente de pico en estas condiciones es:

$$i_p = \frac{n^2 F^2 v l A C_M}{2,7 RT} \quad (10)$$

donde C_M es la concentración del analito en el seno de la disolución. Como en cualquier otra técnica voltamperométrica, la corriente de carga condiciona la exactitud de las medidas y los límites de detección que pueden ser alcanzados en el análisis por redisolución^{50,51}. En la práctica se emplea una onda cuadrada para independizar los resultados de la corriente de carga (Figura 9).

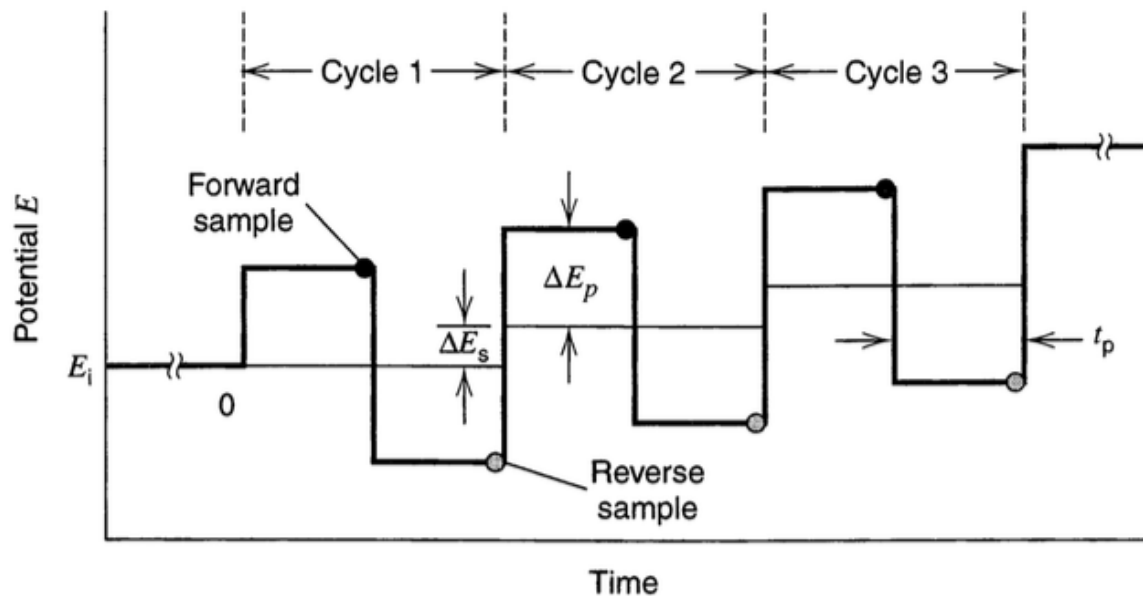


Figura 9. Esquema del potencial de onda cuadrada aplicado. En negrita se aprecia el potencial aplicado al electrodo de trabajo. Las líneas finas representan el potencial en escalera. Se realiza una medida en cada ciclo directo e inverso (*Forward sample* y *Reverse sample*). ΔE_p representa la amplitud de la onda cuadrada y ΔE_s representa la altura del escalón de cada ciclo. Adaptado de Ref.⁵²

En una onda cuadrada la corriente es medida dos veces en cada ciclo (al final del ciclo directo y nuevamente al final del ciclo inverso), lo que permite excluir la corriente de carga (capacitancia) mediante el retraso de la medida al final el pulso. La diferencia de corriente entre los dos pulsos es graficada en función del potencial. Dado que sólo la corriente farádica es medida, los valores dan cuenta exclusivamente de los procesos de oxidación/reducción involucrados, los cuales resultan proporcionales a la concentración del analito en la disolución.

Para un sistema redox simple y reversible puede escribirse como:

$$i = \left[\frac{nFA D^{\frac{1}{2}}}{\sqrt{\pi t_p}} \right] \psi(\Delta E_s, E_p) \quad (11)$$

donde i es la corriente medida en cada impulso, n es el número de electrones transferidos en la reacción farádica, F es la constante de Faraday, A es el área del electrodo, D es el coeficiente de difusión del reactivo, C su concentración en el seno

de la disolución, t_p la duración del impulso (mitad del ciclo de escalera) y Ψ es una función de corriente adimensional que depende de la altura del escalón y de la amplitud de la onda cuadrada.

La cantidad expresada entre corchetes rectos en la ecuación 11, se corresponde con la corriente máxima que se obtendría con un experimento mediante la técnica normal de impulsos. La representación de esta función de corriente frente al potencial normalizado resulta en voltamperogramas que se corresponden con las corrientes experimentales medias (Figura 10). Así, la curva Ψ_1 corresponde a la corriente medida en el ciclo directo y la curva Ψ_2 a la corriente medida en el punto reverso, siendo $\Delta\Psi$ la corriente neta. La curva de Δi vs. E , o $\Delta\Psi$ frente a $n(E-E_{1/2})$ en la Figura 10 es la señal más útil desde el punto de vista analítico, siendo la altura del pico proporcional a la concentración⁵⁰.

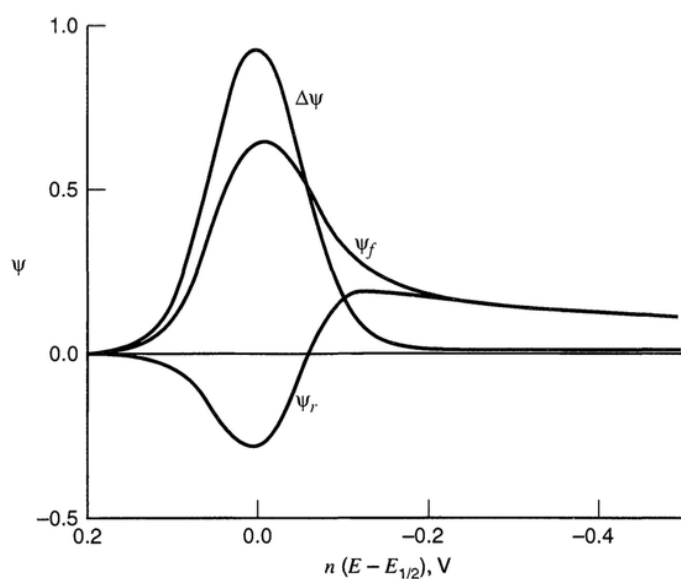


Figura 10. Forma del voltamperograma de onda cuadrada adimensional para el proceso de Oxidación/reducción $nE_p = 50$ mV y $nE_s = 10$ mV. Corriente directa Ψ_f , corriente reversa Ψ_r y su diferencia $\Delta\Psi$ referido al potencial definido por la ecuación de Nernst. Adaptado de Ref.⁵²

I.6 Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

La microscopía de transmisión electrónica (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) es históricamente una de las técnicas que más ha impulsado el desarrollo de la nanotecnología por el simple hecho de permitir la visualización directa de los materiales a la escala nanométrica. El esquema general de funcionamiento del equipo es análogo al de un microscopio óptico, remplazándose la fuente lumínica por un haz de electrones y las lentes de vidrio que focalizan la luz por electroimanes que orientan los electrones.

Una disposición típica de los elementos del microscopio se ilustra en la Figura 11, el mismo esquema se aplica tanto a un microscopio de luz como a uno electrónico. Para observar estructuras muy pequeñas no solo el aumento es importante, sino que también hay que tener en cuenta la resolución del equipo. El aumento refiere a cuantas veces podemos magnificar un objeto y la resolución a la nitidez de la imagen⁵³.

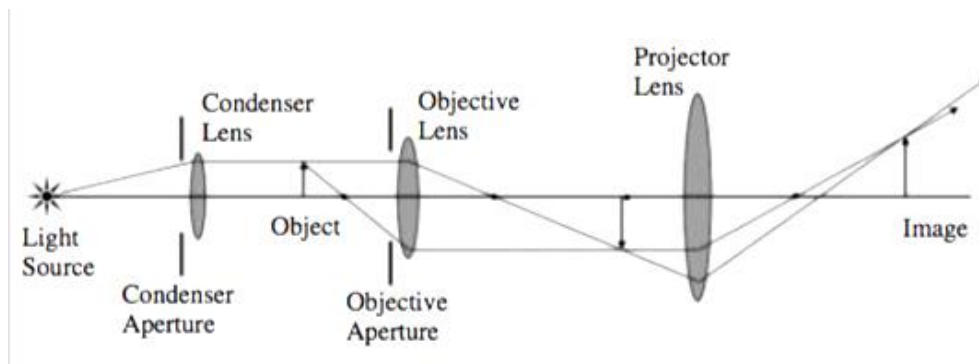


Figura 11. Disposición esquemática de lentes y rayos de luz dentro de un microscopio electrónico.
Adaptado ref.⁵³

Fundamentos del alto poder de resolución

La resolución de un microscopio puede ser explicada bajo el concepto de difracción de Rayleigh, el cual establece la mínima distancia (r) capaz de ser resuelta entre dos puntos, resumida en la siguiente ecuación:

$$r = \frac{0.61\lambda}{\mu \sin(\beta)} \quad (12)$$

donde λ es la longitud de onda de la luz incidente, μ es el índice de refracción del medio y β es el ángulo de apertura, definido entre el objetivo y el objeto de observación.

De la ecuación de Rayleigh se deduce que para aumentar la resolución (r), se debe disminuir λ , aumentar μ y/o el $\sin \beta$. En el microscopio óptico, λ está acotado al rango visible, μ es fijo una vez que se determina el medio de observación, y el incremento del ángulo se puede lograr aumentando el diámetro de las lentes y/o reduciendo la distancia focal de los objetivos, lo cual tiene un límite y es fijo para cada microscopio y conjunto de lentes (por simplicidad, la cantidad $\mu \cdot \sin \beta$ es llamada *apertura numérica*, cuyo valor numérico es cercano a uno).

Concentrándonos en la ecuación propuesta por De Broglie, que relaciona la energía de un electrón con su longitud de onda, e ignorando los efectos relativistas, la longitud de onda se aproxima a:

$$\lambda \sim \frac{1.22}{E^{\frac{1}{2}}} \quad (13)$$

De la ecuación anterior se deduce que un electrón acelerado a 100 keV define una longitud de onda del haz de aproximadamente 0.004 nm, siendo esta mucho más chica que el diámetro de un átomo. Pese a esto, en la práctica no es posible aún llegar a resoluciones tan bajas dado que no se puede construir lentes electromagnéticas perfectas⁵⁴.

Las Lentes

El TEM usa lentes electrostáticos y/o electromagnéticos. Los lentes electrostáticos son raramente usados en los TEM modernos, ya que producen mayores

aberraciones que los electromagnéticos, sin embargo son usados en sistemas de iluminación para extraer los electrones de la punta del filamento del cañón.

Los lentes electromagnéticos consisten en una bobina enrollada en la cual circula corriente y dos puntas de hierro hacia el centro del lente, los cuales generan un campo magnético. Los electrones que pasan a través de la bobina se someten a un efecto de enfoque, el cual depende de la intensidad de corriente administrada a la bobina. El pequeño espacio entre las piezas polares concentra el campo y acorta la longitud focal (Figura 12). El límite de un lente electromagnético recae en la saturación magnética, el punto en el cual el campo magnético deja de aumentar a pesar de la corriente agregada.⁵³

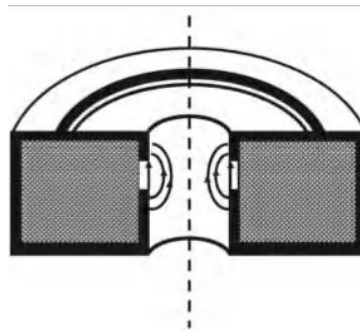


Figura 12. Esquema de un lente electromagnético en un corte trasversal. Adaptado ref.⁵³

Trayectoria electrónica

La fuerza F que percibe un electrón (e^-), viajando a una velocidad v en un campo magnético de carga B se define en las siguientes ecuaciones:

$$F = -e(V \times B) \quad (14)$$

$$|F| = |B|e|v|\sin\theta \quad (15)$$

donde θ es el ángulo entre el campo B y la velocidad v .

De la expresión anterior se desprende que cualquier electrón viajando en paralelo al campo magnético experimentará una fuerza nula, mientras que si viaja en forma perpendicular al mismo describirá una trayectoria circular alrededor de B . De esta manera los electrones que atraviesen el eje del lente cilíndrico del campo homogéneo no cambiarán su trayectoria. Por el contrario si el ángulo de incidencia del haz de electrones es distinto de 0, girarán en espiral hacia el centro y después

hacia fuera de nuevo, dando un efecto de enfoque. La distancia focal del lente es gobernada por la magnitud $|B|^2$ y por lo tanto dependerá de la corriente aplicada a la bobina. Combinaciones de lentes pueden dar una amplia gama de magnificaciones.⁵³

Aberraciones

En un sistema óptico ideal cada punto del objeto sería reproducido perfectamente. En la práctica, esto es muy improbable y solo ocurre para los rayos paraxiales cercanos al eje del lente (dentro de $100\ \mu\text{m}$ y sosteniendo un ángulo de 10 miliradianes o menor). Las aberraciones monocromáticas incluyen: esféricas positivas, astigmatismo, coma, campo curvado y distorsión. Cuando el haz de electrones no es monocromático, se suman las aberraciones cromáticas. Estas pueden ser debido a la propagación de la energía inherente a los electrones emitidos desde una fuente, fluctuaciones en el voltaje del acelerador de electrones o diferentes pérdidas de energía debidas a las interacciones con la muestra (conocidas como EELS, *Energy Electron Losses*). Las ondas con diferentes longitudes (análogo a los colores en la luz visible) son enfocadas en diferentes puntos del eje óptico (Figura 13).

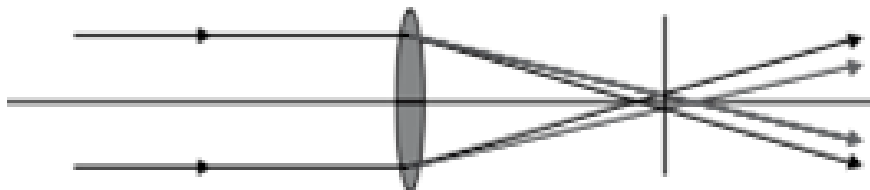


Figura 13. Las aberraciones cromáticas en las lentes dan lugar a ondas de diferentes energías ($E_1 < E_2$) siendo llevadas a un foco en diferentes puntos a lo largo del eje óptico. Adaptado ref. ⁵³

De las cinco aberraciones monocromáticas las más importantes resultan ser la esférica positiva, el astigmatismo y de coma. La aberración esférica positiva se produce cuando los rayos quedan fuera del eje y no se enfocan en el mismo punto que los rayos paralelos al eje. En el caso de astigmatismo, el cruce de los rayos

fuera de eje se desliza a lo largo de eje óptico pero el grado de desplazamiento varía con el ángulo acimutal del haz en consideración (Figura 14).

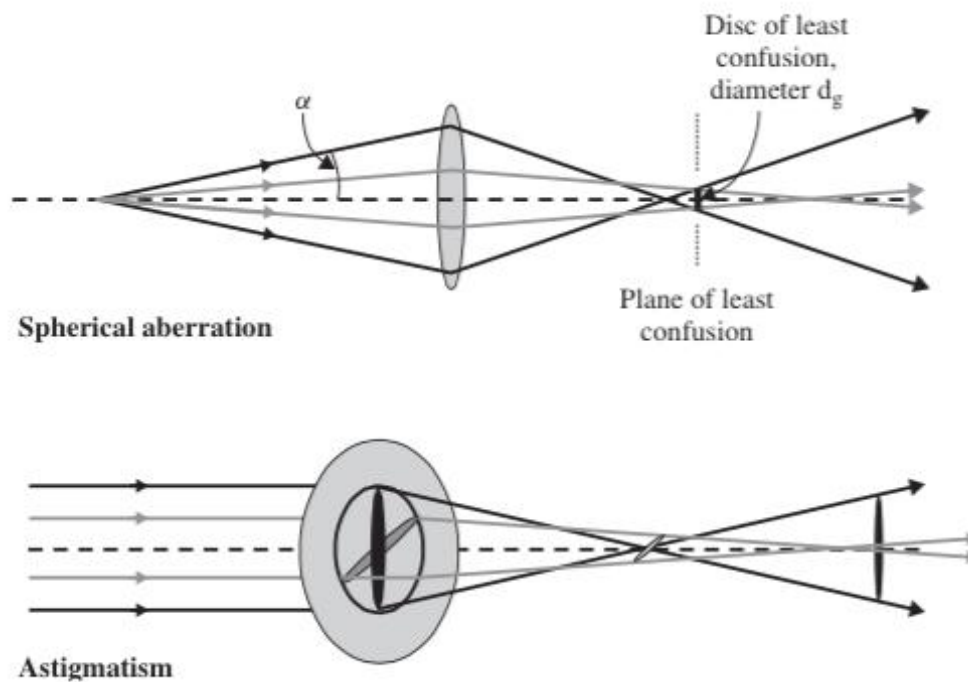


Figura 14. Dos de las cinco fuentes distintas de la aberración monocromática : aberración esférica positiva (arriba) y astigmatismo (abajo) , α es el semi-ángulo de colección de la lente y d_g es el diámetro del disco de menor desenfoque. Adaptado ref. ⁵³

La aberración de coma está relacionada principalmente a los rayos que se emiten desde un punto ligeramente fuera del eje óptico. Todos los rayos que viajan hacia el centro del lente van a ser llevados hacia un punto focal mientras que los rayos que viajan en la periferia van a ser enfocados en distintos puntos (Figura 15). ⁵³

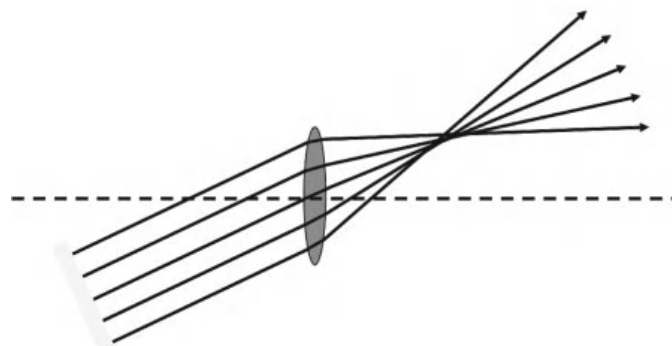


Figura 15. Es la aberración donde los rayos que viajan fuera de eje, son llevados a un punto de enfoque diferente. Adaptado ref. ⁵³

Fuente de electrones

Existe una amplia variedad de fuentes de electrones y cañones disponibles. La elección depende en gran medida de la corriente de haz y de la propagación de la energía que se requiere, junto con el vacío que se puede mantener en la cámara del cañón.

Una cualidad a menudo nombrada es el brillo del cañón (Br), el cual es definido como la densidad de corriente (j) por unidad de ángulo ($d\Omega$):

$$Br = \frac{j}{d\Omega} = \frac{j}{\pi\alpha^2} \quad (16)$$

donde α es el ángulo formado por el cono de los electrones emergentes desde el cañón. En todos los casos, los electrones se emiten por el calentamiento a muy altas temperaturas de una punta, como el tungsteno, y/o el hexaboruro de Lantano, que poseen altos puntos de fusión.

Un filamento en forma de horquilla hecho de un pedazo de tungsteno, es la forma más simple y barata de emitir electrones. Un arreglo típico es mostrado en la Figura 16.

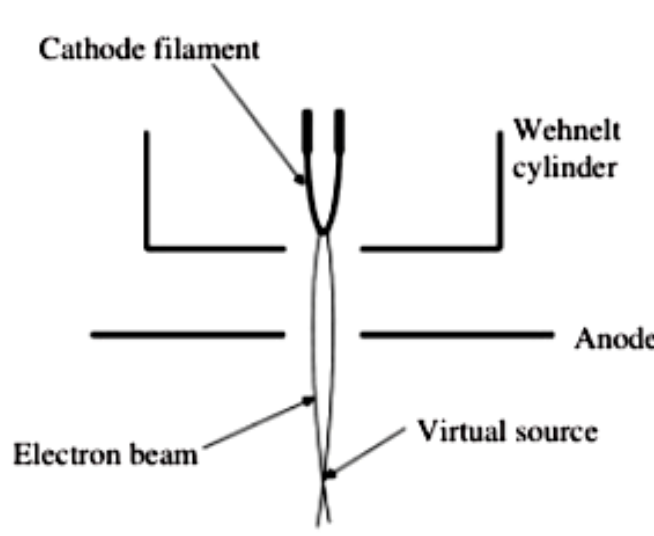


Figura 16. Esquema de un cañón de electrones. Adaptado ref. ⁵³

El filamento catódico es mantenido dentro de un cilindro hueco (cilindro de Wehnelt). Esto es usado para concentrar los electrones, los cuales son acelerados a través de la diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo. ⁵³

I.7 Técnica de dispersión de luz (DLS)

La técnica de dispersión de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*) se basa en medir el tamaño de partícula a partir del movimiento Browniano que define el movimiento aleatorio de las partículas dado por el constante choque con las moléculas del solvente, producto de la agitación térmica.

El diámetro hidrodinámico

El diámetro de una partícula es calculado a partir de coeficiente de difusión medio de las partículas en solución, usando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (17)$$

donde $d(H)$ representa el radio hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión, k la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta y η la viscosidad. De la ecuación se desprende la importancia de la temperatura en el cálculo de los radios hidrodinámicos de las partículas.

El radio hidrodinámico considera al diámetro de la partícula (*core*) junto con las estructuras que la misma posea en su superficie, así como también el tamaño de la doble capa electroquímica generada por la carga de la partícula y los iones adsorbidos a la superficie.

La fuerza iónica del medio

La concentración de iones en el medio puede afectar la difusión mediante el engrosamiento de la doble capa iónica. Por lo tanto un medio con conductividad baja producirá una doble capa extensa, reduciendo la velocidad de difusión, resultando

en una partícula aparente más grande. De modo inverso, un medio con conductividad alta minimiza la doble capa reduciendo el radio hidrodinámico⁵⁵.

Partículas no esféricas

Diferentes técnicas pueden ser sensibles a las propiedades de las partículas como ser área proyectada, densidad y difracción, produciendo diferentes tamaños promedios y distribuciones de las poblaciones. Incluso los bordes de partícula en un microscopio depende del contraste definido por el usuario. Es importante entender que ninguno de estos resultados son inherentemente "correctos". De esta manera, el diámetro hidrodinámico de una partícula no esférica será equivalente al diámetro de una esfera que se mueve con la misma velocidad de difusión. En otras palabras, cualquier cambio en la forma de la partícula que afecte su velocidad de difusión, afectara el diámetro hidrodinámico. No todos los cambios conformacionales afectan de igual manera; por ejemplo, engrosar un bastón no afectará tanto la medida como lo haría alargar el mismo⁵⁵.

Teorías de dispersión de luz

Si las partículas son más pequeñas que la longitud de onda del láser utilizado (típicamente $d \leq \lambda/10$), entonces la dispersión de luz de una partícula iluminada con un haz polarizado será esencialmente isotrópica. Para estos casos, la aproximación de Rayleigh nos dice que la intensidad es directamente proporcional a la sexta potencia del diámetro de la partícula ($I \propto d^6$) e inversamente proporcional a la cuarta potencia de la longitud de onda ($I \propto 1/\lambda^4$). La proporcionalidad de la I con d^6 denota que una partícula de 50 nm dispersará un millón de veces más luz que una de 5 nm. Por lo que si medimos una muestra con tamaños variados (pero cada uno con similar concentración), la intensidad de luz dispersada por las partículas más pequeñas puede llegar a ser despreciable frente a partículas de mayor tamaño. Por otro lado, notamos que la relación inversa de λ^4 significa que una mayor intensidad de dispersión de luz será obtenida con longitudes de onda más cortas⁵⁵.

¿Cómo funciona el equipo de DLS?

El equipo de DLS mide los coeficientes de difusión de las partículas que se mueven bajo régimen de movimiento Browniano. Esto se logra midiendo las fluctuaciones en las intensidades de la luz dispersada por las partículas en solución.

Imaginando una cubeta en donde las partículas se encuentran en estado estacionario y son iluminadas por un láser, la luz dispersada en un ángulo de 90° , forma un patrón de dispersión conocido como patrón de diagrama de *speckle*, formado por todas las interferencias constructivas y destructivas de luz dispersada (Figura 17).

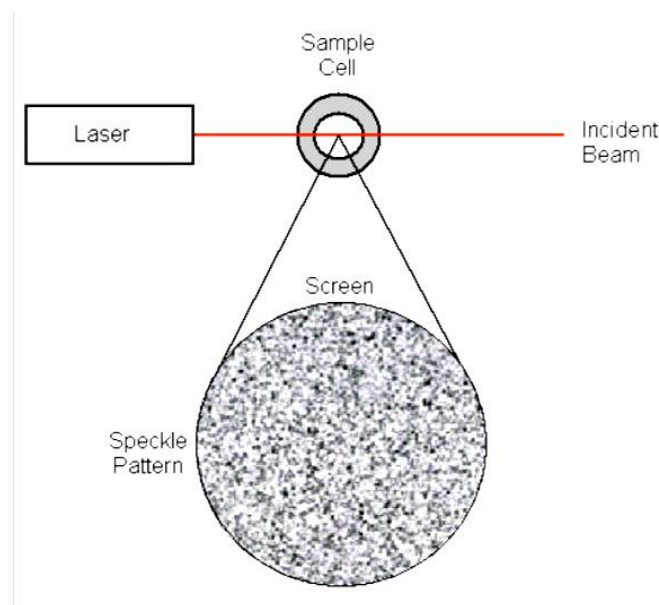


Figura 17. Representación esquemática de un patrón de puntos con intensidades variables, dependiendo de la suma de las interferencias de las ondas de luz dispersadas por las partículas en solución. Adaptado de ref⁵⁶

En la Figura 17, los puntos oscuros son formados cuando dos ondas desfasadas tienen una conformación destructiva y se cancelan la una a la otra; los puntos claros, representa las ondas que llegan en fase y se forma interferencia constructiva (Figura 18).

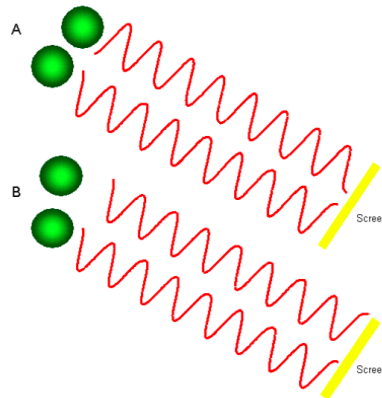


Figura 18. La señal observada depende de la adición de fase de la luz dispersada que cae sobre el detector. En el ejemplo A, dos haces interfieren destructivamente resultando en una disminución de la intensidad detectada. En el ejemplo B, dos haces interfieren constructivamente resultando en un aumento de la intensidad detectada. Adaptado de ref⁵⁶

Para un sistema de partículas bajo movimiento browniano, el patrón de manchas en el detector del equipo estaría en cambio constante en el tiempo. El ritmo con el que cambia dependerá del tamaño de las partículas. Las partículas pequeñas se moverán más rápido y por lo tanto la fluctuación será mayor (Figura 19). Para cuantificar esta variación se utiliza la función de auto correlación.

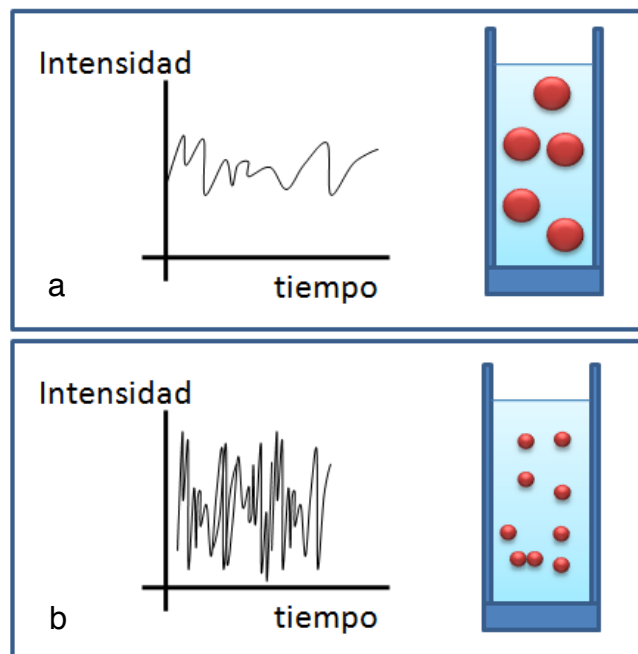


Figura 19. Esquema de las fluctuaciones de intensidad medidos para partículas grandes (a) y pequeñas (b).

¿Cómo opera la función de correlación?

La función de correlación mide el grado de cambio entre dos señales, o consigo misma (auto correlación) dentro de intervalos de tiempo definidos. Si los intervalos de tiempo tomados son comparados consigo mismos dentro de periodos de tiempo muy extendidos, para un movimiento aleatorio, la correlación entre esas dos señales será nula. Si por el contrario, tomamos intervalos de tiempo muy pequeños, las señales tendrán una fuerte correlación⁵⁵.

El tiempo en que el correlograma tarda en caer significativamente es un indicativo del tamaño de partícula medio. Cuanto más pronunciada sea la caída, menor es la dispersión en la muestra. En contrapartida si se extiende más el decaimiento, más dispersa es la muestra (Figura 20)⁵⁵.

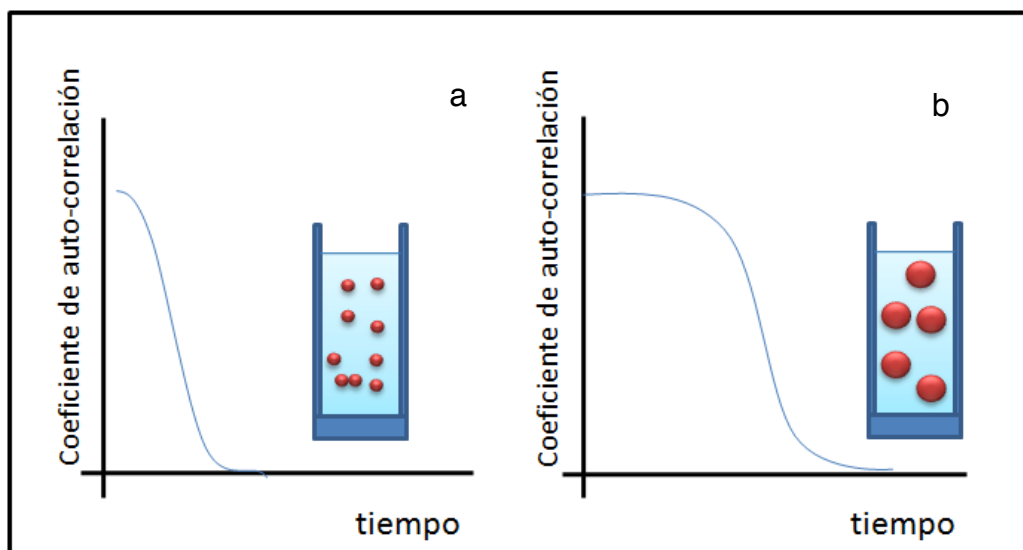


Figura 20. Esquema mostrando las diferencias de los correlogramas de dos muestras con partículas de distinto tamaño. Se observa que para el caso de que las partículas sean pequeñas, la correlación de la señal decae rápidamente (a), mientras que para el caso de partículas grandes lo hace más lentamente (b). Adaptado de ref⁵⁶

Como se expuso las partículas en solución se encuentran en constante movimiento y esto causa que la luz dispersada fluctúe con el tiempo. Los algoritmos empleados en computadoras construyen una función de autocorrelación $G(\tau)$ dependiente del tiempo y la intensidad:

$$G(\tau) = \langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle \quad (18)$$

donde τ es el tiempo de muestreo.

Para un gran número de partículas monodispersas en movimiento Browniano, la función de autocorrelación se ajusta a un decaimiento exponencial:

$$G(\tau) = A[1 + B\exp(-2\Gamma\tau)] \quad (19)$$

donde A representa la línea de base de la función y B es una constante asociada al equipo

$$\tau = Dq^2 \quad (20)$$

donde D es el coeficiente de difusión.

$$q = (4\pi n/\lambda_0) \sin(\theta/2) \quad (21)$$

donde n es el índice de refracción del medio, λ_0 la longitud de onda del láser irradiante, y θ el ángulo de la luz dispersa.

Para muestras polidispersas, la ecuación puede ser escrita como

$$G(\tau) = A[1 + B g_1(\tau)^2] \quad (22)$$

donde g_1 es la suma de todos los decaimientos exponenciales contenidos en la función de correlación.⁵⁵

Obteniendo información de tamaño desde la función de autocorrelación

El tamaño es obtenido de la función de autocorrelación usando varios algoritmos. El problema puede ser resuelto de dos maneras: o bien se ajusta la función por una exponencial única, para obtener el tamaño promedio, o por una exponencial múltiple (mínimos cuadrados) para obtener la distribución de tamaños de partículas.

La distribución de tamaños se obtiene del gráfico de la intensidad relativa de la luz dispersada por las partículas en función del diámetro. Si la distribución de intensidad tiene un único máximo, entonces no tiene mucho sentido hacer la conversión a una distribución de volumen utilizando la teoría de Mie⁵⁷. Sin embargo, si el gráfico muestra una cola sustancial, o más de un pico, entonces la teoría de Mie puede hacer uso del parámetro de entrada del índice de refracción de la muestra para

convertir la distribución (d) de intensidad en una distribución de volumen. Esto dará una visión más realista de la importancia de la cola y/o el segundo pico presente. En términos generales, se verá que: $d(\text{intensidad}) > d(\text{volumen}) > d(\text{número})$.⁵⁵

Para ejemplificar estas transformaciones, se toma las diferencias entre la intensidad, el volumen y la distribución numérica de 2 poblaciones de partículas esféricas de 5 nm y 50 nm de diámetro presentes en números iguales. Si se representa gráficamente una distribución numérica de estas poblaciones, presentes en iguales cantidades, se obtendrían 2 picos (de 5 y 50 nm) con una relación 1:1. Si esta distribución numérica se convirtiera en volumen, entonces los 2 picos cambiarían a una proporción de 1:1000 (porque el volumen de una esfera de 50 nm de diámetro es mayor que uno de 5 nm). Por último, convirtiendo la gráfica en una distribución de intensidad, se obtendría una relación de 1 :1000000 entre los 2 picos (porque la intensidad de dispersión es proporcional a d^6 (de acuerdo con la aproximación de Rayleigh)⁵⁵.

Sección II

Desarrollo experimental

Materiales

Reactivos

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico y fueron usados como se recibieron sin mayor purificación: nitrato de plata (AgNO_3 99%, Biopack™); citrato tri-sódico (TSC 99%, Carlo Erba™); ácido cítrico (99.5%, Sigma-Aldrich™); borohidruro de sodio (NaBH_4 , 98%, Sigma-Aldrich™); peróxido de hidrogeno (H_2O_2 , 30% v/v, Mallinckrodt™); dioctilsulfosuccinato de sodio (NaAOT, 98%, Sigma-Aldrich™); almidón soluble (pureza analítica, Merck™). El agua usada durante toda la investigación fue de calidad Milli-Q™ con resistividad mayor a 18.2 MΩcm. Para el crecimiento de las bacterias, se empleó un medio de cultivo Luria-Bertani (*low salt*) (LBIs): 10 g de Bactotripton, 5 g de Levadura, 5 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 10 g Agar, pH 7; controles positivos: Ampicilina Lachifarma™, AgNO_3 100 mM y 1 μM ; *E. coli* cepa DH5 α .

Equipos

Los espectros UV-Vis fueron adquiridos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603 y en Analytik-Jena 2000, empleando cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico.

Las imágenes de microscopia electrónica fueron tomadas con un Microscopio Electrónico de Transmisión (TEM) JOEL Microscopy JEM modelo 1010. Las muestras fueron depositadas sobre gradillas de carbono, con evaporación natural al aire.

Los experimentos electroquímicos fueron llevados a cabo con un potenciostato Voltamaster 3000 de la firma Radiometer y analizados con el software Voltamster4 MFC.

Para la purificación de nanopartículas se empleó una centrífuga Sigma modelo D37520.

Métodos

Consideraciones generales

Todo el material de vidrio fue previamente lavado con una mezcla sulfonítrica, $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ (1:1 v/v), por unos minutos y posteriormente enjuagado con agua ultra pura. Previamente a cualquier síntesis de nanopartículas, se preparan soluciones

acuosas frescas de AgNO_3 , NaAOT, ácido ascórbico, TSC y NaBH_4 . En especial las soluciones de NaBH_4 deben prepararse en baño de hielo y usarse de inmediato para evitar la hidrólisis del reactivo ⁵⁸.

Síntesis de nano partículas de plata

Para la formación de AgNPe, se sigue la síntesis reportada por Jiang *et al.*^{59,60} Brevemente, se colocan 35.6 mL de H_2O ultra pura en un matraz de fondo plano de 100 mL y se agregan consecutivamente 2 mL de AgNO_3 0.01 M, 2 mL de una disolución de dioctilsulfosuccinato de sodio (NaAOT) 0.02 M, 120 μL de ácido cítrico 0.1 M y 180 μL de ácido ascórbico 0.1 M. Se mantiene con agitación constante y se inicia la reacción con 100 μL de NaBH_4 0.001 M, manteniendo la agitación por 30 min adicionales. Una vez terminada la síntesis, las nanopartículas son diluidas al medio en una solución de almidón 1 $\mu\text{g/mL}$ como agente de recubrimiento y posteriormente usadas o almacenadas en heladera a 4°C.

Para la síntesis de AgNPt se sigue el protocolo descrito por Zhang *et al.*²². En breve, a 24.2 mL de agua ultra pura en agitación vigorosa, se le agregan consecutivamente 50 μL de AgNO_3 50 mM, 500 μL TSC 75 mM, 60 μL de H_2O_2 30% y se inicia la reacción con la adición de 250 μL de NaBH_4 0.1 M. La solución incolora cambia a un color amarillo claro casi instantáneamente, pasando rápidamente por los colores rojo, verde y finalmente azul a los ca. 3 min. Las mismas son usadas o guardadas en heladera a 4°C.

Caracterización: UV-Vis – TEM –DLS

UV-Vis

Todos los lotes de AgNPs fueron caracterizados en una primera instancia por espectroscopía UV-Vis como método de rutina, dado que esta metodología aporta información relevante sobre la morfología y el tamaño de las AgNPs.

TEM

Las imágenes fueron adquiridas con una aceleración electrónica de 100 keV, después depositar a temperatura ambiente 10 μL de una solución conteniendo nanopartículas sobre una grilla de cobre. Las imágenes fueron analizadas con el *software* de uso libre *Image J*. Para el análisis estadístico de los tamaños de

partículas se contabilizaron entre 100 y 500 nanopartículas, utilizándose el programa Prism Graph Pad 6c.

DLS

Tanto el agua ultrapura como las muestras se filtraron (tamaño de poro promedio de 0.45 μm) y todo el material fue cuidadosamente lavado, para eliminar el polvo. Las medidas de dispersión de luz fueron obtenidas con un equipo de la firma *Brookhaven*, en solución acuosa a 25°C con una fuente de luz láser a 659 nm, un ángulo de medida de 90°C y utilizando un algoritmo de distribución de tamaño de tipo continuo. Se realizaron 6 corridas de 10 min cada una, y se estableció un algoritmo de filtro de polvo del 30%.

Seguimiento de reacción de síntesis de las AgNPt

La síntesis a tiempo real se siguió llevando a cabo la reacción en la propia celda del espectrofotómetro. Para ello se ajustó el protocolo de síntesis manteniendo la proporción entre los reactivos a volumen total de 3 mL. La reacción de síntesis es seguida espectrofotométricamente con agitación magnética a 400 rpm y los espectros son tomados, con una resolución de 2 nm a una velocidad de 200 nm/s en el rango 300–900 nm.

Prueba de estabilidad

Se colocó 1 mL de solución en las celdas espectrofotométricas y se almacenaron a 4°C. Dado que una pequeña-pero significativa- fracción de las nanopartículas puede agregarse y adherirse a las paredes de la cubeta, los espectros electrónicos fueron normalizados para su comparación.

Cuantificación de iones Ag^+ por voltamperometría de *stripping* anódico

Para la cuantificación de plata libre, se puso a punto la técnica de *stripping* anódico en una celda compuesta por tres electrodos: carbono vítreo como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contra electrodo y un electrodo de hidrógeno como electrodo de referencia. El electrodo de referencia es preparado en cada ensayo a partir de una solución 0.1 M H_2SO_4 que llena una cámara de vidrio conteniendo al electrodo de platino, y que queda separado de la disolución de

trabajo mediante un capilar de Luggin. Para el desprendimiento de hidrógeno se empleó una batería de 9 V, usando un alambre de platino como contra electrodo.

Para la electrodeposición de plata metálica en el electrodo de trabajo se usó una crono amperometría a un potencial de -50 mV durante 7 min.

El *stripping* anódico fue realizado con un potencial de onda cuadrada en un barrido desde los 300 a 1100 mV a una velocidad de 125 mV/s y una frecuencia de 25 Hz.

Para la limpieza de electrodo se utiliza una repetición de la secuencia de potencial de onda cuadrada y una cronoamperometría a un potencial de 900 mV durante 5 min.

El programa de medida se esquematiza en la siguiente secuencia:

Potencial de onda cuadrada (Comprobación de electrodo)

Cronoamperometría (Deposición)

Potencial de onda cuadrada (Medida)

Potencial de onda cuadrada (Limpieza)

Cronoamperometría (Limpieza)

Potencial de onda cuadrada (Comprobación de Limpieza)

Entre cada paso de las secuencias, el sistema permanece bajo potencial controlado y se mantiene una leve agitación durante toda la secuencia para homogeneizar la solución.

Curva de Calibración

Se realiza una curva de calibración en el rango de 0.25 μM a 2.73 μM de AgNO_3 . Las soluciones a cuantificar deben estar libres de nanopartículas, para ello se toma una solución de AgNPt recién sintetizada (A) la cual se centrifuga durante 40 minutos a 13.000 rpm. Posteriormente el sobrenadante es guardado en heladera durante 6 días (B) y el *pellet* a temperatura ambiente (C). El *pellet* es re suspendido en agua ultra pura y ambos son centrifugados durante 2 hs a 13.000 rpm (Figura 21). Al finalizar estos pasos se obtienen como resultados dos soluciones libres de nanopartículas (de acuerdo con las medidas espectrofotométricas Figura 33), una de ellas con los iones plata que no sedimentan (D) y otra con los iones plata que las

nanopartículas liberaron durante los 6 días en condiciones de concentración y temperatura ambiente (F).

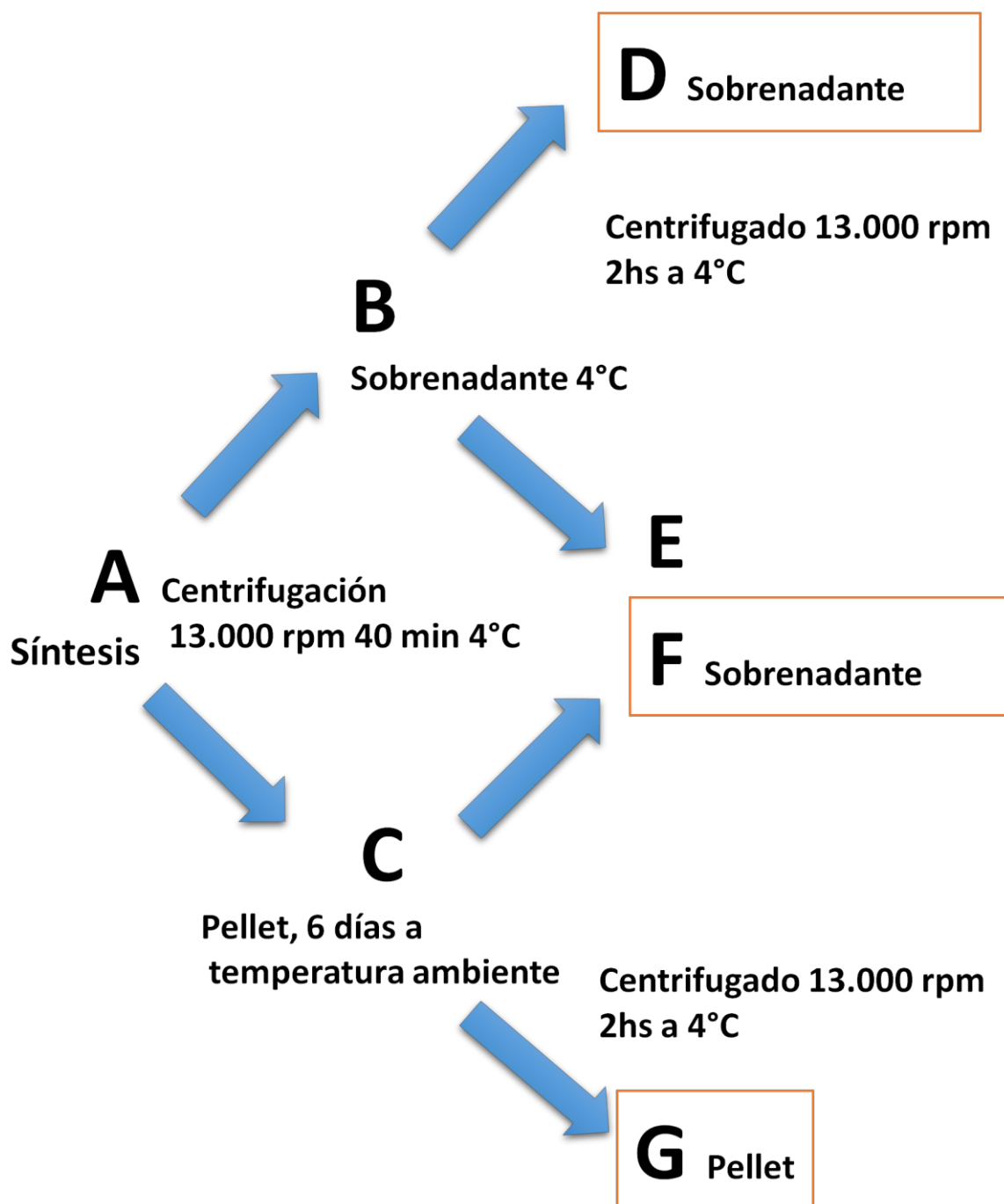


Figura 21. Esquema de purificación por centrifugación. La síntesis de AgNPt (A), es centrifugada a 13.000 rpm durante 40 min a 4°C, obteniéndose el pellet G y los sobrenadantes E y F. El sobrenadante D se obtiene luego de una segunda centrifugación a 13.000 rpm durante 2 hs a 4°C.

Ensayos microbiológicos

Se siembran 100 μL de un cultivo fresco de *E. coli*, crecido durante toda la noche, con una absorbancia ajustada a 0.1 u.a. para una longitud de onda de 600 nm. Luego las bacterias se diseminan uniformemente por rastrillado en placas plásticas de Petri con medio de cultivo LB. Los círculos de papel de 6 mm de diámetro fueron sumergidos en las soluciones de análisis y se depositaron en la superficie de las placas de Petri, dejando el sistema en reposo por 10 min. Las placas se incubaron a 37°C en estufa durante 24 hs.

Sensor H_2O_2

Se realizan diluciones seriadas del H_2O_2 30% v/v (en el rango de 10^{-2} - 10^{-6} M), y se agregan volúmenes de 5 μL sobre 1 mL de una solución fresca de AgNPt. Los cambios colorimétricos observados se siguen por espectrofotometría UV-Vis.

II.2 Resultados y discusión

Caracterización de las nanopartículas

El espectro de absorción de las AgNPt (Figura 22), muestra una banda de absorción centrada en 400 nm en concordancia con lo esperado de acuerdo con la teoría de Mie¹⁰, confirmando a su vez la presencia mayoritaria de partículas esféricas o cuasi-esféricas, como se observa en las imágenes TEM (Figura 23), y la ausencia de señales correspondientes al momento cuadrupolar, que sería visible para nanopartículas con tamaños superiores a los 50 nm. Por su parte, las soluciones coloidales de AgNPt muestran una banda de absorción con un máximo a ca. 760 nm, un hombro entre 430 y 500 nm y una pequeña contribución a 320 nm correspondiente al modo dipolar de vibración en el plano, al modo dipolar fuera del plano junto con el cuadrupolar en el plano, y al modo cuadrupolar fuera de plano respectivamente (Tabla 1).

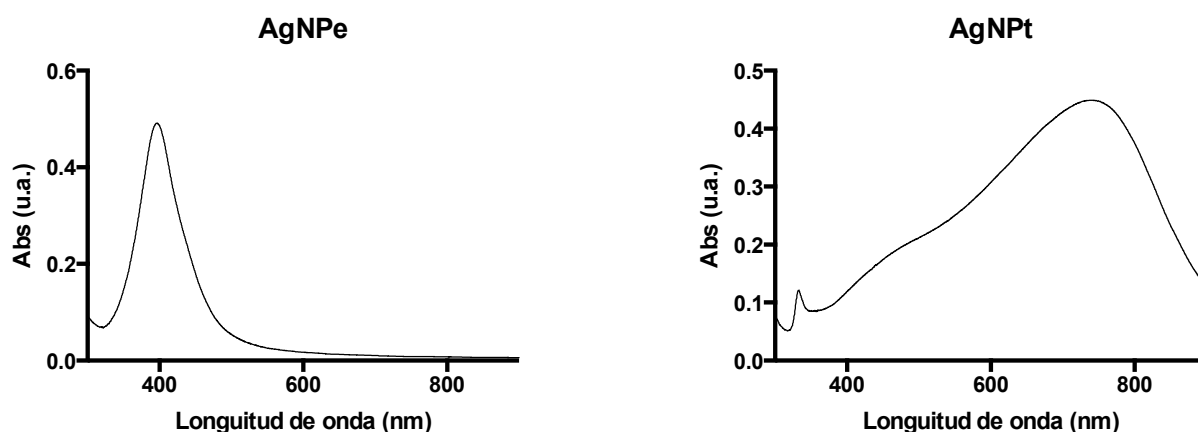


Figura 22. Izquierda, espectro de AgNPe; derecha, espectro AgNPt.

Las imágenes obtenidas por TEM son mostradas en la Figura 23 izquierda donde se observa a las AgNPt que muestran una forma triangular truncada en sus vértices y en la Figura 23 derecha las de forma esférica.

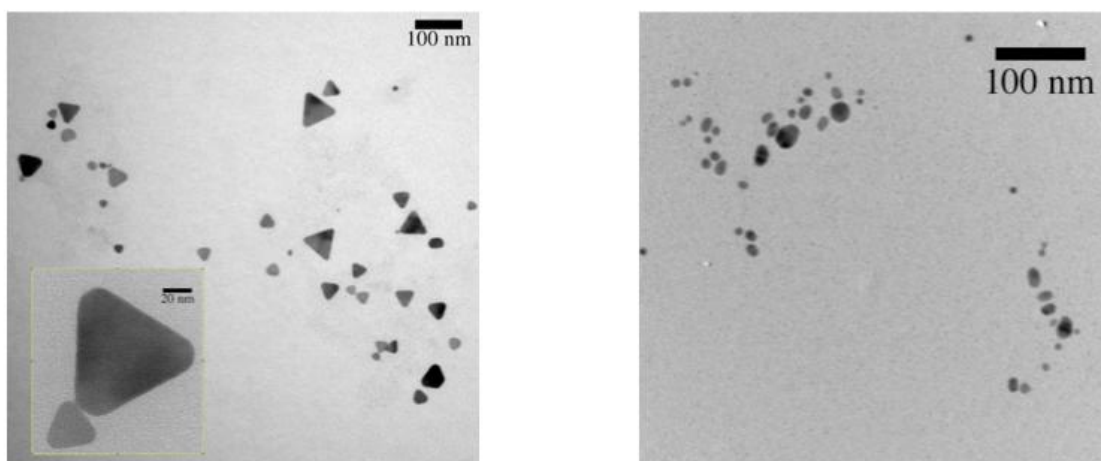
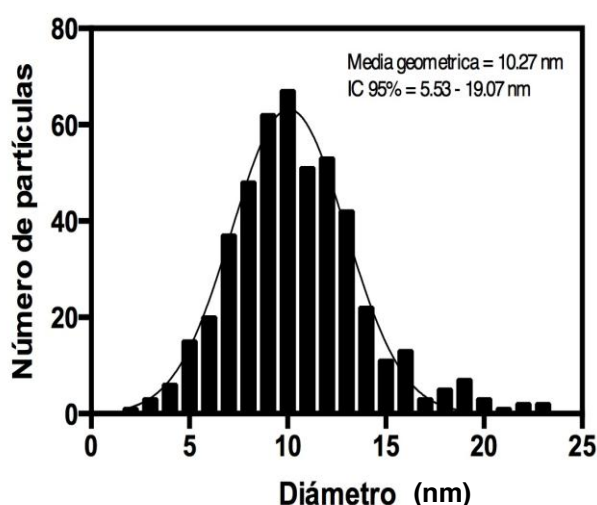


Figura 23. Imágenes TEM, Izquierda, AgNPt; Derecha, AgNPe.

A partir de las imágenes se construyen los histogramas para la distribución de tamaño de las AgNPs. Los resultados muestran esferas con 10.3 nm de diámetro (83.3 nm^2 de área) y triángulos con un área de 722.4 nm^2 (25 nm de altura) (Figura 24).

Por su parte, las medidas por DLS (Tabla 2 y 3) presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 29.06 nm para AgNPt, valor que se encuentra en concordancia con el calculado a partir de los datos del TEM. Sin embargo para las AgNP_e obtenemos un diámetro promedio de 27.27 nm, siendo éste casi 3 veces mayor al obtenido por imágenes TEM. Esto se atribuye a que las AgNP_e se encuentran recubiertas por macromoléculas de almidón, el cual no puede ser visualizado por TEM.

Frecuencia de distribución, diámetro AgNP_e



Frecuencia de distribución, área AgNPt

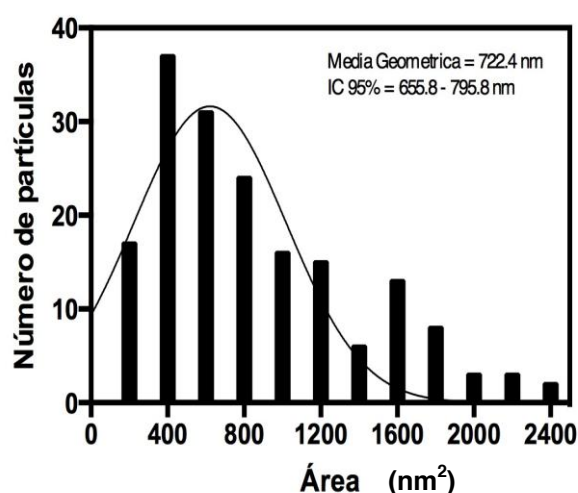


Figura 24. Histogramas de distribución del tamaño de las AgNP_e (izquierda) y AgNPt (derecha). los gráficos muestran distribuciones de tipo log Normal con medias geométricas a 10.27 nm de diámetro y 722.4 nm² de área respectivamente.

Medidas en DLS para AgNPt			
Corrida	Diámetro efectivo	Polidispersión	Índice de línea base
1	29.37	0.124	10.0
2	29.02	0.138	9.9
3	28.97	0.135	9.9
4	28.84	0.139	9.6
5	29.04	0.125	8.4
6	29.14	0.128	7.5
Media:	29.06	0.131	9.2
ErrStd:	0.07	0.003	9.2
Desv. Std:	0.18	0.007	1.0

Tabla 2: Medidas de DLS de las nanopartículas triangulares. El diámetro efectivo promedio es de 29.06 nm.

Medidas en DLS para AgNPe			
Corrida	Diámetro efectivo	Polidispersión	Índice de línea base
1	27.13	0.31	5.30
2	27.02	0.31	5.70
3	26.91	0.31	5.23
4	27.26	0.31	2.29
5	28.01	0.31	1.08
Media:	27.27	0.31	3.92
Err. Std:	0.19	0.00	0.94
Desv. Std:	0.44	0.00	2.09

Tabla 3: Medidas de DLS de las nanopartículas esféricas. El diámetro efectivo promedio es de 27.27 nm.

Seguimiento de la reacción de síntesis AgNPt

En la Figura 25 se muestran los espectros tomados desde los 0 a los 176 s de la reacción de síntesis de AgNPt. Como muestran las gráficas la nucleación de partículas se da casi inmediatamente mostrando un máximo a 400 nm a los 39 s, característico de nanopartículas esféricas con ca. 50 nm de diámetro ya que se ve la banda correspondiente al modo cuadrupolar¹³. Inmediatamente después se observa que el máximo de las AgNPe comienza a disminuir aumentando en su lugar la banda de absorción centrada en 760 nm, característico de AgNPt (Figura 22).

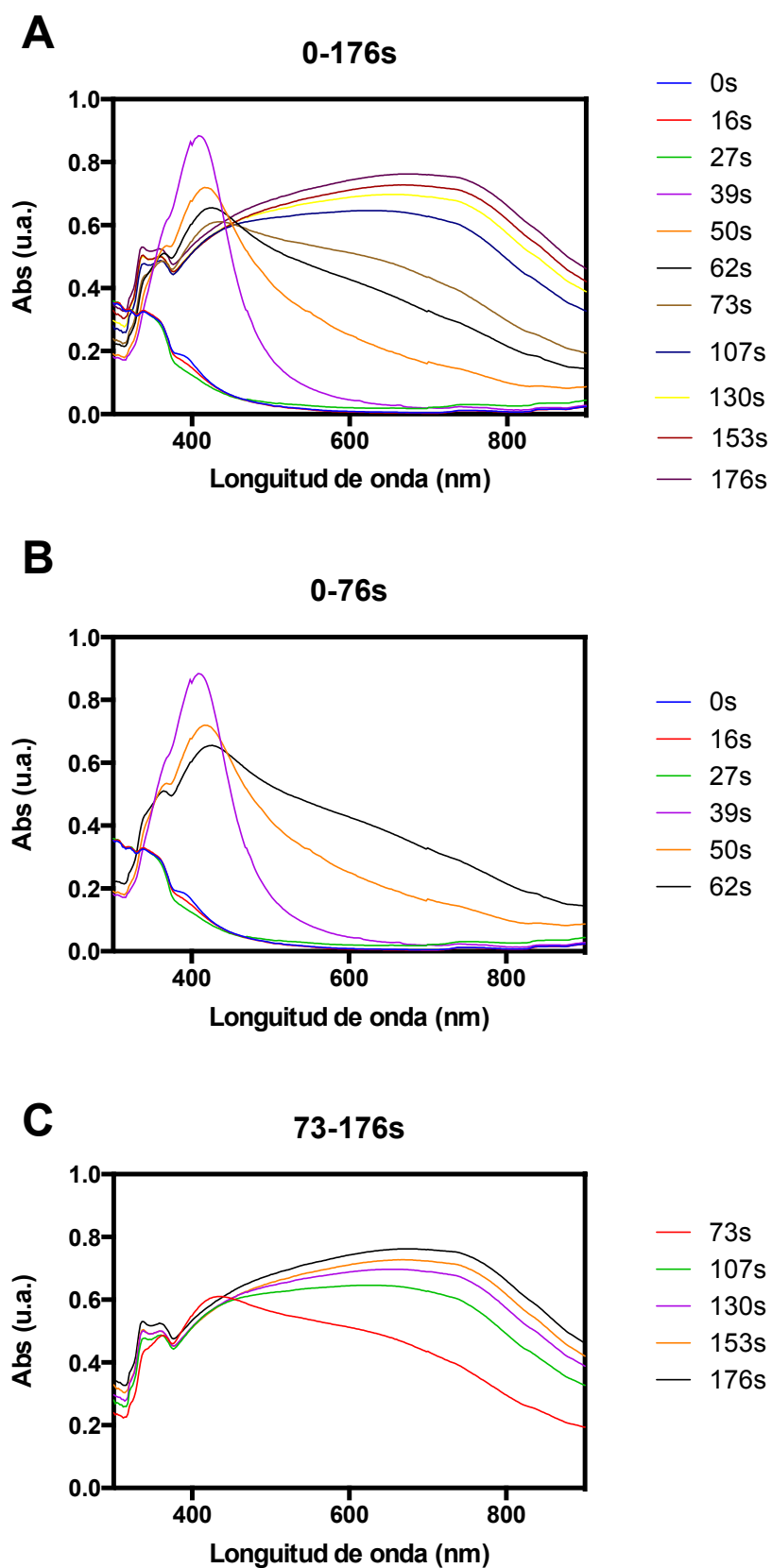


Figura 25. Seguimiento espectrofotométrico de la reacción de síntesis de AgNPt entre 0-176 s de reacción (A); entre 0-76 s (B); entre 73-176 s (C).

Evaluando puntualmente las absorbancias a 400 y 750 nm características de las nanopartículas esféricas y triangulares respectivamente (Figura 26), se observa que los primeros núcleos esféricos se forman entre los 27 y los 39 s, siendo su máxima concentración a los 39 s. Posteriormente, la absorbancia a 400 nm comienza a disminuir mientras que aumenta concomitantemente la absorción a 750 nm. Esto sugiere que la morfología triangular se forma a partir de una transformación de los núcleos esféricos. Estos resultados confirman los estudios de síntesis reportados por Zhang y Yin²².

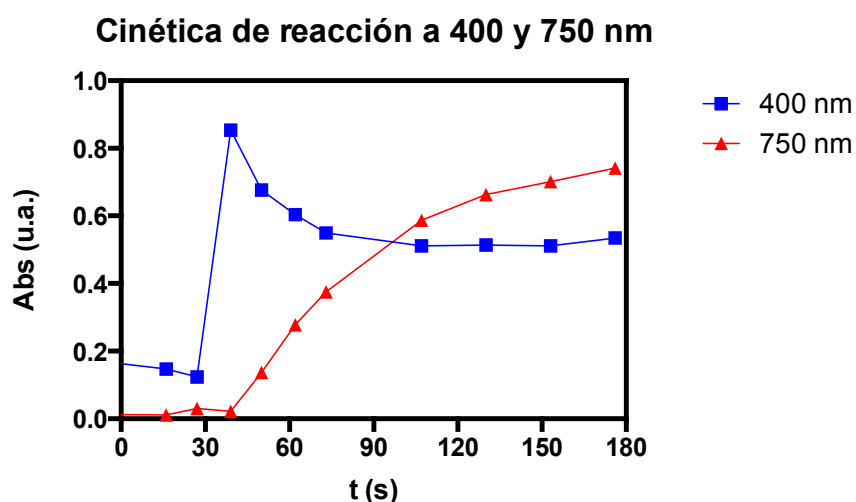


Figura 26. Cinética de reacción para la formación de AgNPt seguida espectrofotométricamente a 400 y 750 nm.

Mecanismo de formación de AgNPt

El peróxido de hidrogeno es conocido por su alto poder oxidante. Su potencial estándar varía dependiendo del medio de reacción: 1.763 V y 0.867 V para un medio ácido y alcalino respectivamente. Ambos valores son superiores al de la cupla Ag^+/Ag ($E^\circ = 0.7996$ V). Esto indica que en un principio el peróxido puede ser un buen agente oxidante de la plata metálica. Por su parte es bien sabido que el NaBH_4 actúa como agente reductor de los iones Ag^+ , lo cual indica que se genera como resultado de un mecanismo complejo en el que se superponen ambas reacciones opuestas: la reducción de la plata por el borohidruro y la disolución de las nanopartículas de plata generadas por la presencia del H_2O_2 .

La síntesis de AgNPt se produce en distintas etapas sucesivas donde el color de la solución se torna amarillo claro inmediatamente después del agregado del agente reductor. Al cabo de 3 min, la solución se torna de color amarillo intenso y en menos de 1 s la solución se torna roja, verde y vuelta al amarillo intenso, oscilando brevemente hasta llegar a un color azul (ver video en el cd adjunto).

Para entender esta reacción se propone un mecanismo posible para la formación de partículas planas (Figura 27): con el agregado de NaBH_4 , los iones plata son parcialmente reducidos para formar de pequeñas nanopartículas, las cuales son temporalmente estabilizadas por la adsorción del citrato. Al mismo tiempo, el crecimiento de las partículas pequeñas es inhibido por la disolución del H_2O_2 . Como resultado, obtenemos un equilibrio dinámico entre la reducción y la oxidación. La plata se mantiene en la forma de pequeñas partículas las cuales presentan un plasmón de resonancia con un máximo en 400 nm, mostrando a simple vista un color amarillo. Cuando el NaBH_4 es consumido, quedando únicamente el citrato como posible agente reductor y agente de recubrimiento, lo que se traduce en el crecimiento de núcleos con estructuras variadas. Debido a la coordinación preferencial del citrato con el plano $\{111\}$ ¹⁶ de la nanopartícula y la presencia del oxidante fuerte (H_2O_2), los núcleos de plata contienen un sin fin de defectos, incluidos los defectos gemelos¹⁶ que favorecen el crecimiento anisotrópico de forma plana.

Si bien este fenómeno es notorio en la reacción macroscópica, no fuimos capaces de detectarlo con el espectrofotómetro, esto puede ser debido a que la velocidad con la cual el equipo toma el espectro completo no es lo suficientemente rápida (4 segundos). También es relevante aclarar que la síntesis en matraz (volumen de reacción 25 mL) el color amarillento aportado por las nanopartículas esféricas aparece inmediatamente al agregar el NaBH_4 , mientras que el color azul aportado por los nano triángulos se observa a los 180 s. En cambio, cuando la reacción ocurre en la cubeta podemos ver que el espectro a 400 nm obtiene su valor máximo a los 39 s y el pico de nano triángulos a los 107 s. Estas diferencias se atribuye a cambios en los volúmenes de reacción, en la geometría de la celda de reacción, y en la velocidad de agitación, lo cual muestra también indicios de que la síntesis sigue un control cinético, consistente el crecimiento de nanotriángulos²³. El cambio en la geometría de la celda afecta la resolución de los espectros, dado que, pese a las

precauciones tomadas, la agitación en un recipiente de tales dimensiones no es perfecta y algunas burbujas pequeñas (que surgen del desprendimiento del H_2 por parte del $NaBH_4$) quedan temporalmente atrapadas en las paredes de la celda. Pese a estas dificultades experimentales, se observa claramente la evolución del espectro con el corrimiento sucesivo de los máximos hacia longitudes de onda de menor energía. Esto sugiere que la síntesis de AgNPt se produce a partir de semillas esféricas que evolucionan por un mecanismo controlado cinéticamente, que se genera como consecuencia de dos reacciones opuestas que ocurren en simultáneo con el peróxido de hidrógeno y el borohidruro de sodio como agentes oxidante y reductor.

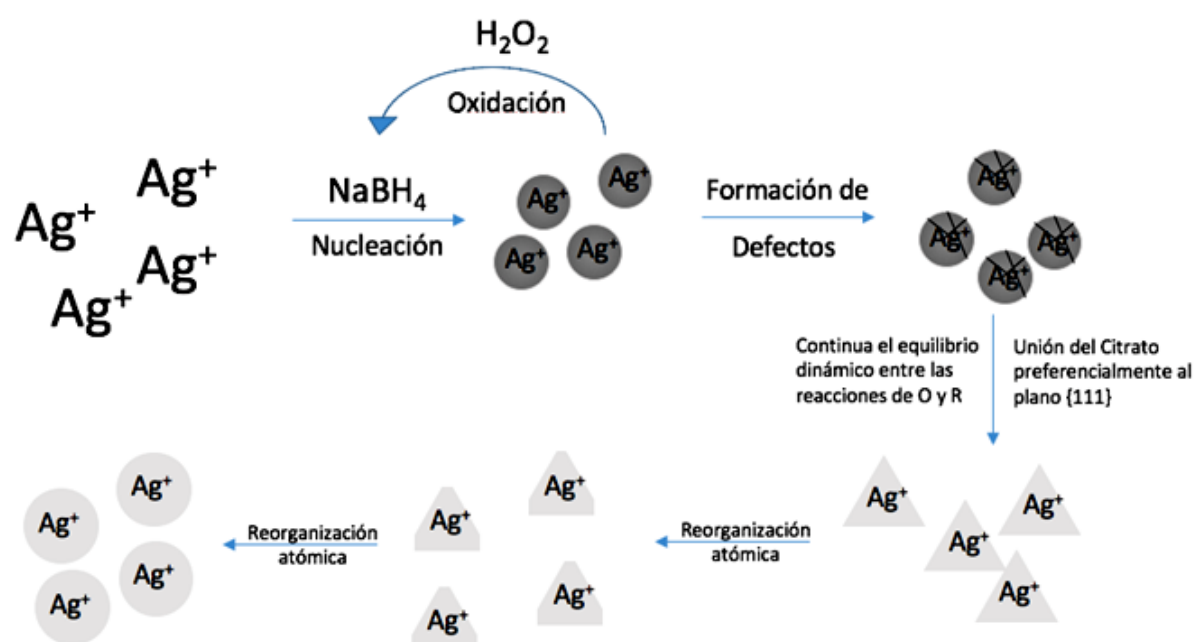


Figura 27. Esquema de reacción síntesis de AgNPt. Los iones Ag^+ son reducidos por el $NaBH_4$ y luego oxidados por el H_2O_2 en reacciones inversas que generan errores de apilamiento atómico, los cuales favorecen un crecimiento cristalino con formas anisotrópicas. La unión preferencial del citrato al plano {111} modifica las velocidades de crecimiento en los planos. La morfología de las AgNP sigue avanzando con el tiempo hacia estructuras más estables mediante reorganizamiento atómico, sin la pérdida de átomos.

Efecto del H_2O_2

Las AgNPt resultan extremadamente sensibles al H_2O_2 , incluso a concentraciones muy bajas (Figuras 28 y 29). Este último, es capaz de oxidar la plata metálica influyendo en la morfología y tamaño de las AgNPt y por lo tanto alterando su espectro de absorción. La alta reactividad de las nanopartículas de plata con el H_2O_2 abre la puerta a la posibilidad del uso de esta cualidad para la confección de un sensor colorimétrico. En la Figura 28 se observan los espectros normalizados tomados a los 55 s luego del agregado de 5 μL de H_2O_2 . La presencia de H_2O_2 genera un corrimiento gradual del espectro hacia zonas de mayor energía. Estos resultados sugieren que el efecto del peróxido se vincula con el proceso de oxidación de los vértices de los nanotriángulos, los cuales evolucionan a nano discos, evidenciados por su máximo de absorción a ca. 600 nm^{23} .

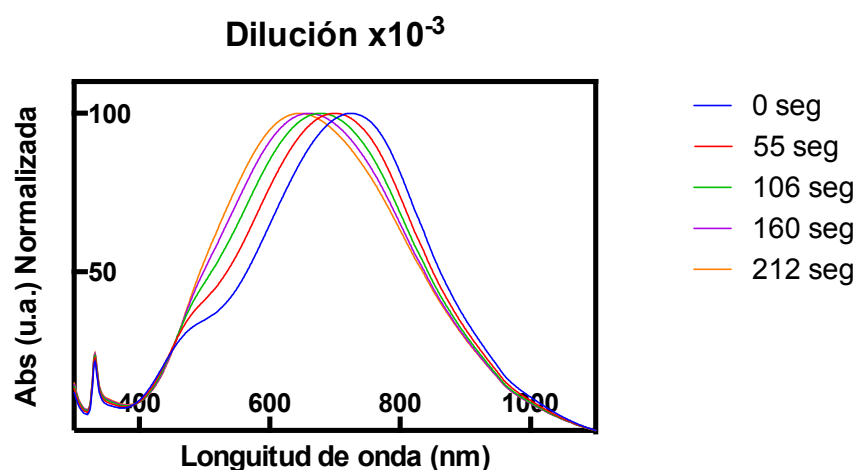


Figura 28. Agregado de 5 μL de H_2O_2 0.030% v/v a 1 mL de AgNPt. Los espectros son medidos a los tiempos 0, 55, 106, 160 y 212 s.

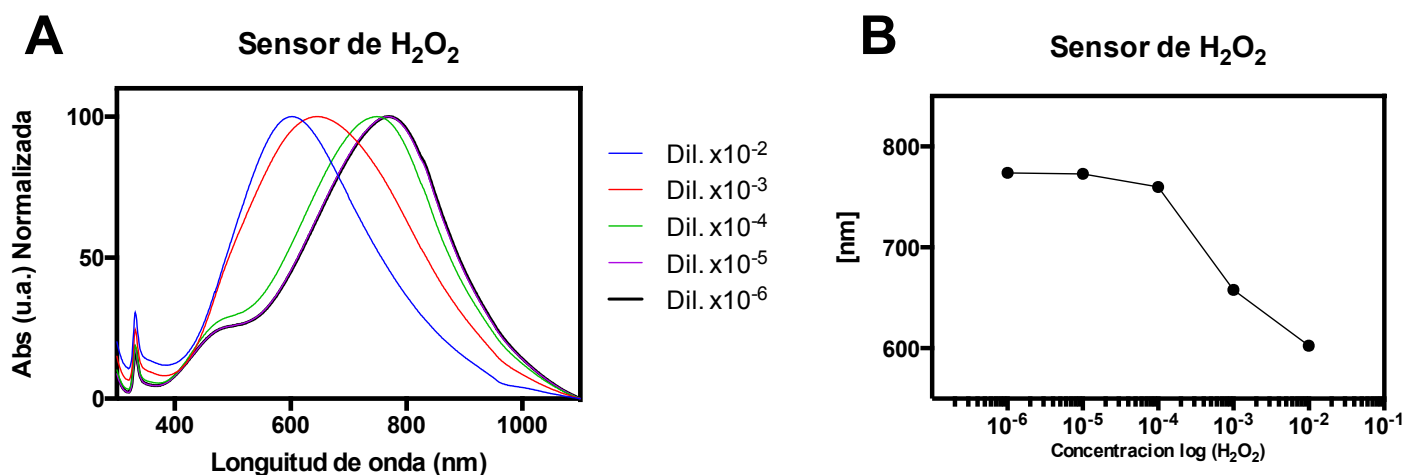


Figura 29. Espectros de las AgNPt frente a distintas diluciones del H₂O₂ 30% v/v (A). Posición del máximo de absorción con respecto al logaritmo del factor de dilución del H₂O₂ agregado (B).

Efecto del NaBH₄

El efecto del borohidruro en la reacción de síntesis de AgNP fue estudiado por Botasini *et al.*²³ En sus experimentos demuestran que el proceso de síntesis conlleva un control cinético, el cual se ve afectado por la relación molar AgNO₃/NaBH₄ (Figura 29). Para relaciones molares altas, las formas termodinámicamente estables como la esférica se ven favorecidas, que a nivel molecular puede entenderse como un aumento en la probabilidad de colisiones atómicas que permite un crecimiento uniforme en todas las direcciones de los núcleos originales. Mientras que para relaciones molares bajas, la forma triangular se muestra dominante en el proceso (Figura 30 c y e).

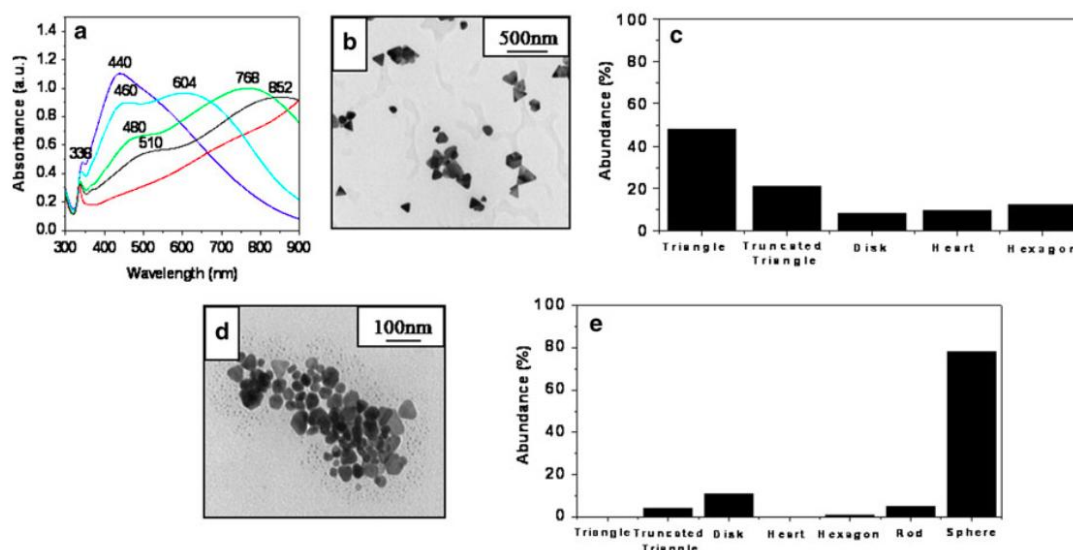


Figura 30. Espectro UV -Vis -NIR entre 300 y 900 nm de nanopartículas de plata, sintetizados con diferentes relaciones molares $\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$: de derecha a izquierda 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 (a). Imágenes TEM tomada de la muestra con una relación molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ de 0.005 (b). Distribución de la forma de nanopartículas en la muestra con relación molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ de 0.005 (c). Imagen TEM tomada de la muestra con la relación molar más alta: $\text{AgNO}_3/\text{NaBH}_4$ de 0.05 (d). Distribución de la forma de nanopartículas para la muestra con una relación molar $\text{NaBH}_4/\text{AgNO}_3$ de 0.05 (e). Adaptado de Ref. ²³

Estabilidad de las nanopartículas

Los espectros normalizados de AgNP (Figura 31) muestran distintos comportamientos para los nanotriángulos y nanoesferas. El espectro de las AgNPt experimentan un corrimiento de su máximo a 720 nm hacia la región del azul, alcanzando la estabilidad a los 30 días. Esto puede deberse a un truncamiento de las puntas y/o al aumento en el tamaño de las nanopartículas por agregación¹³. El hombro desaparece al 6^{to} día, mostrando un corrimiento hacia el rojo, quedando oculto por la vibración dipolar en el plano.

En base a los resultados observados, concluimos que la reacción sigue avanzando, haciendo crecer las partículas, moldeándolas en una forma más energéticamente favorable^{23,61}.

Por su lado, las AgNPe recubiertas con almidón luego de pasados 50 días desde su síntesis muestran un espectro inalterado, confirmando la estabilidad y uniformidad de la disolución coloidal.

Si el proceso de evolución de nanotriángulos a nanodiscos se genera por un mecanismo de oxidación de los vértices, es lógico suponer que con el correr del tiempo se generen una mayor cantidad de iones Ag^+ en las soluciones de nanopartículas planas, en comparación con las esféricas. Sin embargo, como se verá más adelante, el proceso de maduración de nanotriángulos a nanodiscos se produciría como consecuencia de un reordenamiento atómico interno de las partículas, más que por un efecto de oxidación de los mismos.

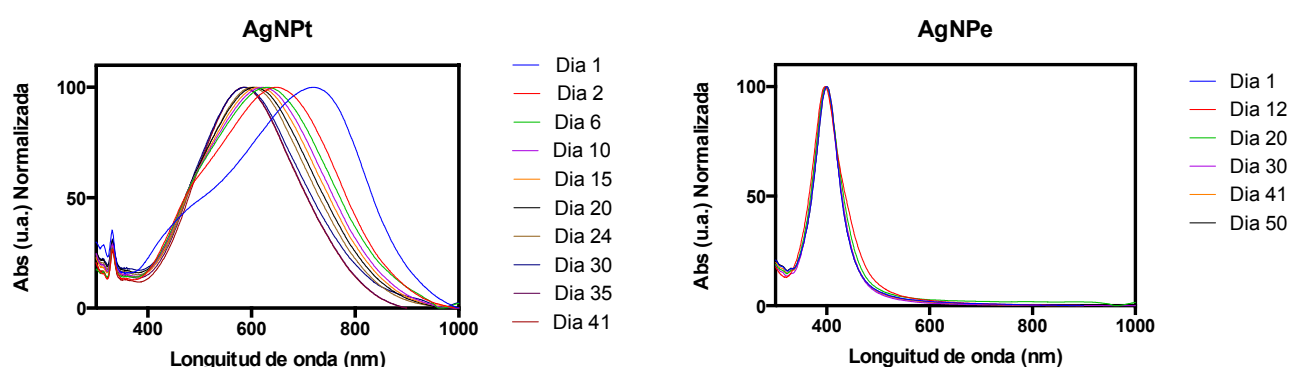


Figura 31. Espectros normalizados para AgNPt (panel izquierdo) y AgNPe (panel derecho), las disoluciones fueron almacenadas a 4°C y analizadas periódicamente.

Cuantificación de la liberación de Ag^+ por AgNPt mediante voltamperometría de *stripping* anódico

La actividad antimicrobiana de las nanopartículas no se limita a un solo elemento, pudiendo la forma, el tamaño, la composición, la liberación de iones o una combinación de todas estas estar involucrada. Mediante la técnica de voltamperometría de *stripping* anódico originalmente se esperaba poder detectar y cuantificar la concentración de Ag^+ resultantes de la oxidación de las nanopartículas, para así poder determinar si son tan solo los iones los responsables de la actividad bactericida, o si existe un efecto propio de la naturaleza nanométrica de las partículas.

Es importante resaltar que el protocolo utilizado llevó un amplio período de optimización debido a que se inició utilizando un electrodo de referencia de Ag|AgCl como indicaba la bibliográfica consultada^{62,63}. Sin embargo los potenciales de oxidación de la plata aparecen a 0.27 V vs Ag|AgCl (Figura 32), quedando por debajo del potencial esperado para la oxidación de la plata. Más aún este valor de potencial se encuentra reportado como el potencial redox del par Ag|AgCl⁶⁴.

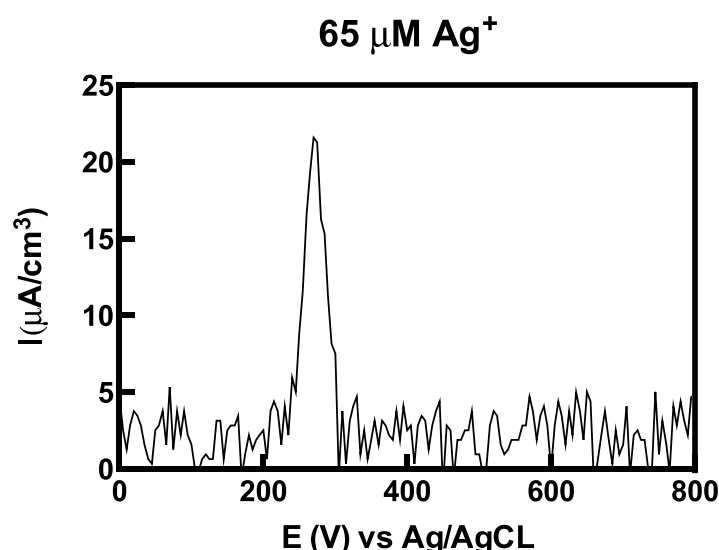


Figura 32. Medida de *stripping* anódico para un concentración de Ag^+ 65 μM usando Ag|AgCl como electrodo de referencia.

Si bien el corrimiento hacia potenciales menores existe y es esperable para sistemas irreversibles con bajas concentraciones de iones, la diferencia era demasiado grande como para deberse a un efecto de UPD (*under potential deposition*)⁶⁵, a un efecto difusional o al tamaño de los *clusters* depositados. Por otro lado al realizar los blancos se pudo incluso evidenciar la presencia de trazas de iones Ag^+ aún después de lavar cuidadosamente el material. Revisando la bibliografía, notamos que este defecto también se observaba en algunos trabajos publicados⁶³. Tomando en cuenta que la única fuente posible de plata era el propio electrodo de Ag|AgCl utilizado de referencia, se reemplazó el mismo por el electrodo normal de hidrógeno. El potencial de oxidación de la plata se corrió a 0.6 V lo cual es coherente con los corrimientos esperados respecto del valor estándar⁶⁶, no observándose ninguna señal en los blancos realizados.

PREPARACION DE LA MUESTRA

Para realizar las medidas de *stripping* debemos contar con soluciones libres de nanopartículas, ya que las mismas podrían interferir con la medida. Después de terminar con el proceso de purificación (como se indica en la sección de Materiales y Métodos), se realiza un espectro a los sobrenadantes para verificar su pureza (Figura 33). En el sobrenadante D encontramos una traza de nanopartículas con un máximo a 400 nm posiblemente producto de pequeñas partículas esféricas que no logran precipitar. Asumiendo una proporción lineal entre la concentración de las partículas y la absorbancia en el rango de 0.1 - 0.001 unidades de absorbancia (u.a.) se calculó el porcentaje de partículas remanentes tomando la absorbancia a 400 nm para el sobrenadante D y el espectro a t_0 previo a la purificación. Se obtiene que el 1.4% del total de AgNP sigue presente después del proceso de purificación.

No se encontró ningún rastro de partículas en el espectro medido del sobrenadante F, lo cual indica que en la primera centrifugación se genera una separación de las partículas según su tamaño, llevando las más grandes al *pellet* y dejando las más pequeñas todavía en suspensión. De esta manera recién luego de una segunda centrifugación se logra un sobrenadante 100% libre de partículas (de acuerdo con las medidas espectrofotométricas).

A partir de las medidas para los agregados de AgNO_3 (Figura 34) se construye la curva de calibración entre la intensidad de la señal electroquímica vs. la concentración de AgNO_3 .

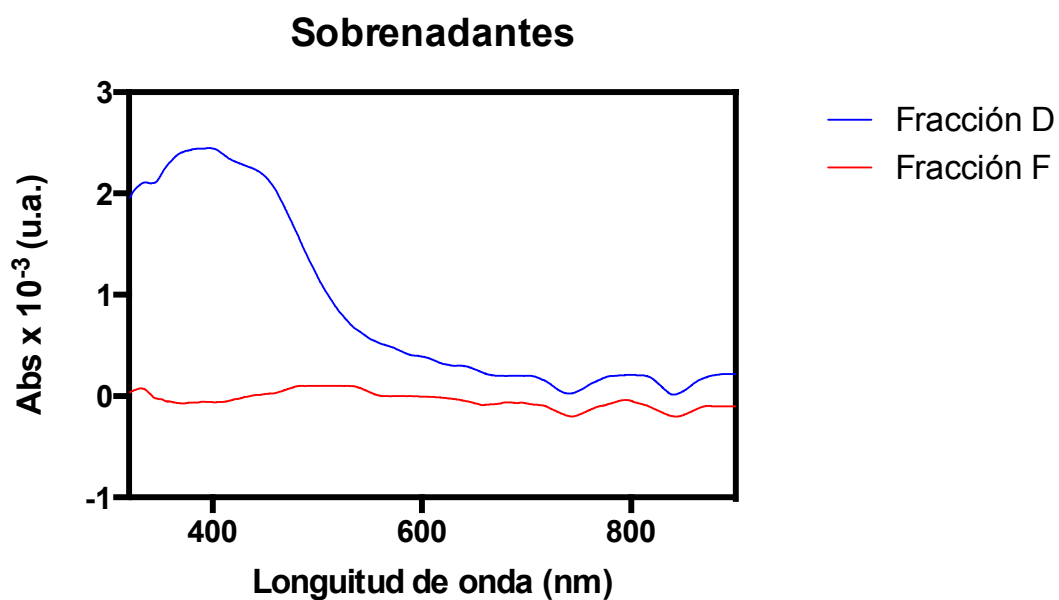


Figura 33. Espectros de las Fracciones D y F después del proceso de purificación.

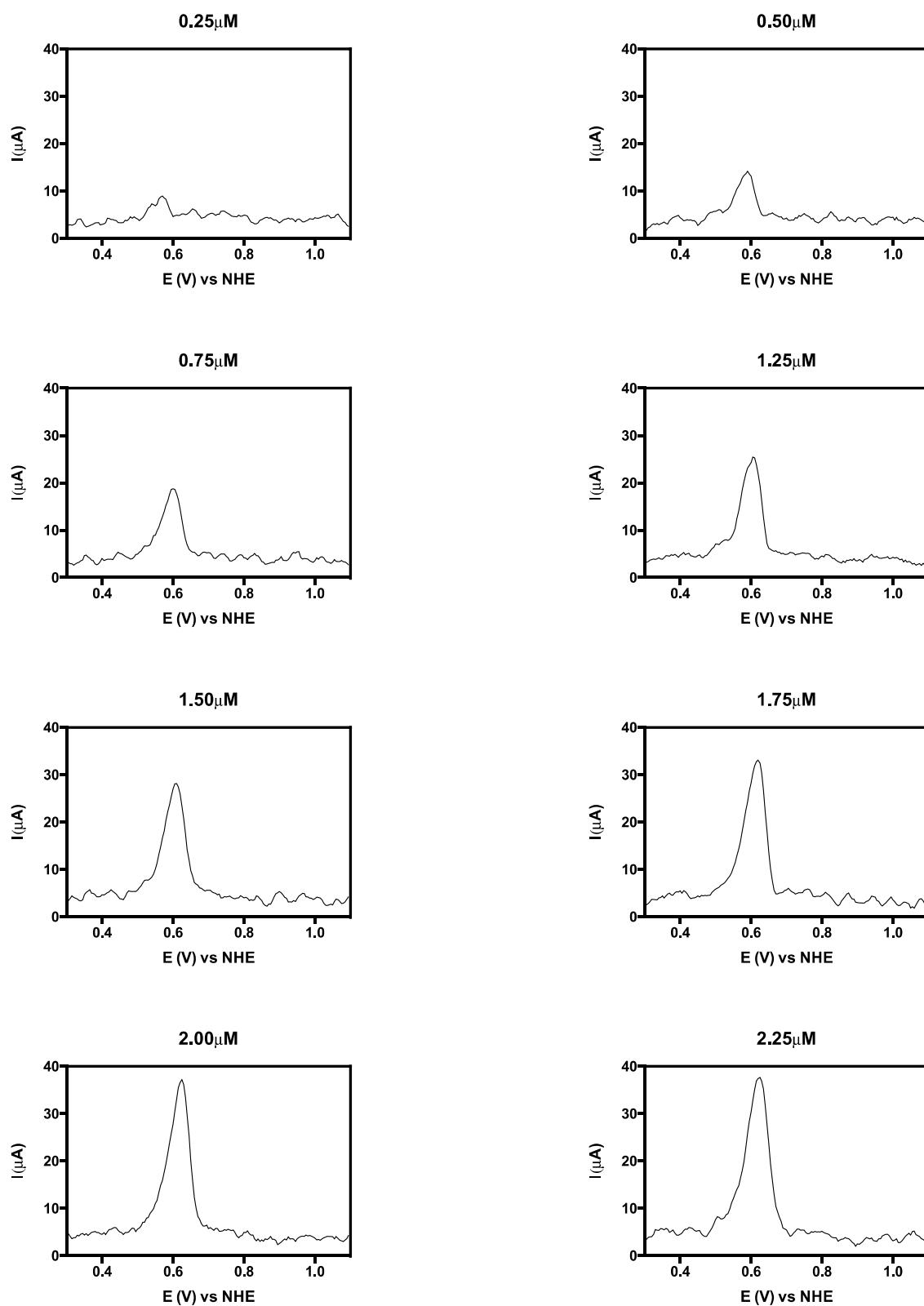


Figura 34. Medidas de *stripping* anódico para los agregados sucesivos de 5 μL de AgNO_3 500 μM .

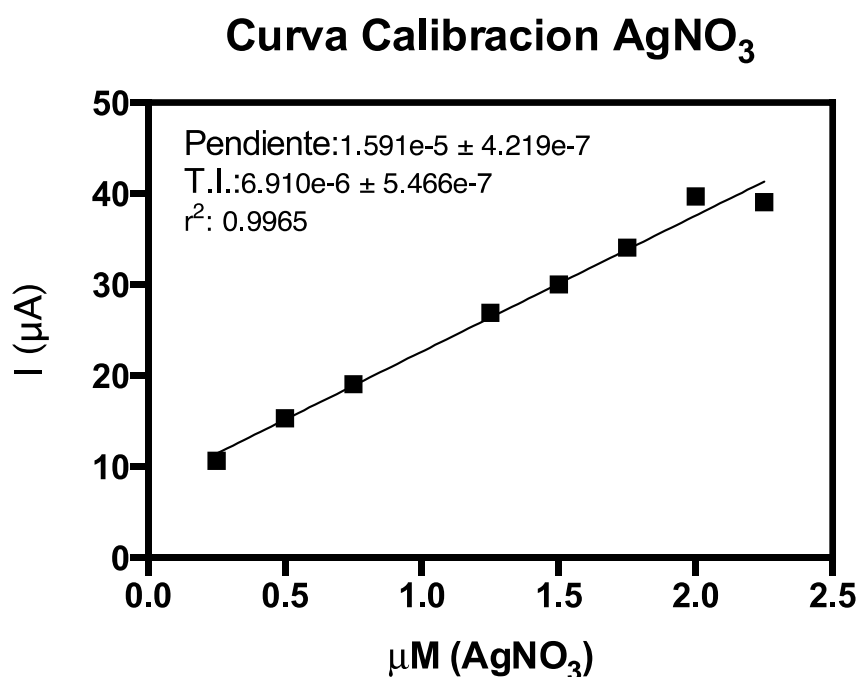


Figura 35. Curva de calibración empleada para la cuantificación de los iones plata en solución. El gráfico muestra un comportamiento lineal entre la intensidad del pico de oxidación y la concentración de los iones plata con un buen índice de ajuste ($r^2=0.9965$).

Analizando las medidas de los sobrenadantes, empezando por la fracción D (Figura. 36), se obtuvieron para dos tomas independientes, picos de 13.75 y 15.00 μA , cuyo promedio interpolando en la curva de calibración y ajustando por la dilución al medio, determina que la concentración de Ag^+ sea de 0.90 μM . Teniendo en cuenta que la concentración original de AgNO_3 en la síntesis de las nanopartículas era de 0.1mM (y considerando que toda esta cantidad se reduce completamente), el 1.4% de este valor corresponde al remanente de plata que no alcanza a separarse en el primer centrifugado. Esta cantidad equivale a una concentración de iones plata de aproximadamente 1.4 μM . En resumen, el remanente de nanopartículas no es en realidad despreciable, siendo posible que en un medio ácido la mayor parte de las mismas sufran un proceso de disolución que interfiere con las medidas electroquímicas. Teniendo esto en cuenta se decidió realizar una segunda centrifugación.

Las medidas sobre la fracción F, centrifugadas por segunda vez, no mostraron señal alguna de la presencia de iones. Teniendo en cuenta este resultado junto con lo

expuesto sobre la baja estabilidad de las partículas, vemos que las mismas evolucionan de morfología sin pérdida de átomos detectable. Este fenómeno se explica apoyándose en la termodinámica, donde el sistema intenta disminuir su energía mediante la evolución a formas más estables. Resulta evidente que los átomos en los vértices de los triángulos son termodinámicamente más desfavorables que aquellos encontrados en el centro de la partícula, por lo que podríamos estar ante un fenómeno de reordenamiento atómico donde los átomos más inestables migren de posición dentro de la partícula para encontrar un estado de menor energía. En 1896 basándose en hechos empíricos, Ostwald⁶⁷ propuso una teoría que plantea el desacople de un átomo de una red cristalina, para re-ensamblarse en otra con el solo fin de disminuir su energía en un proceso puramente termodinámico. Esto supone que pequeñas partículas de átomos sean disueltas para ensamblarse en grandes partículas. Recientemente, en 2015, este fenómeno fue reportado y capturado en video¹ a través de imágenes TEM de alta resolución por Chung *et al.*⁶⁸. Quienes proponen que la barrera de activación para el proceso de desacople de la red cristalina es incluso menor a la energía necesaria para ensamblar el cristal^{15,61,69}.

¹Ver video en: <https://www.youtube.com/watch?v=q-JvrkFVGNw>

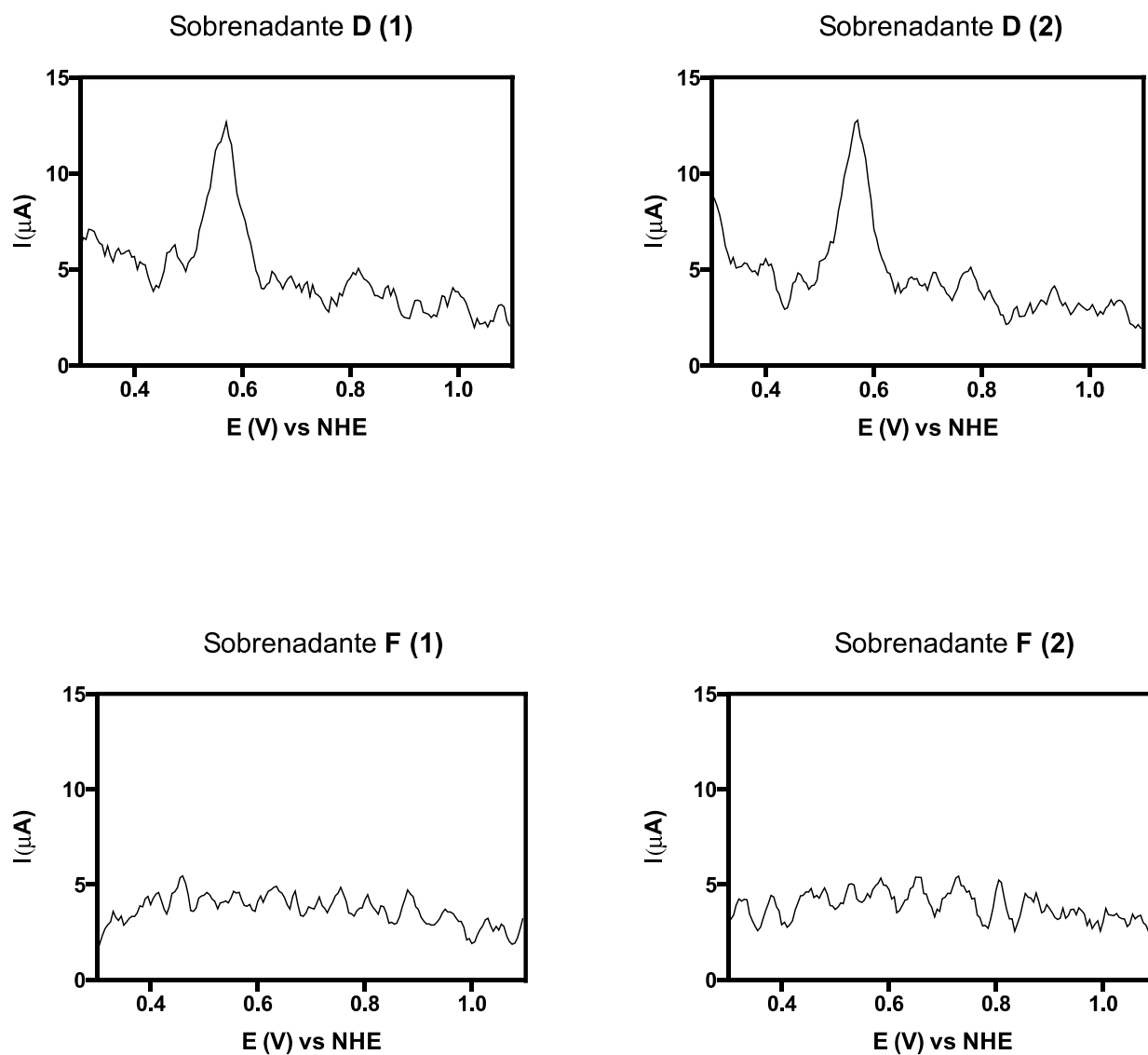


Figura 36. Medidas de *stripping* anódico por duplicado para las fracciones D y F del purificado de AgNPt.

Ensayos Microbiológicos

Como se observa en la figura 37 A, el control negativo muestra que las bacterias crecen en las condiciones normales de cultivo. Por su parte se emplearon tres controles positivos: uno con ampicilina y dos con iones plata con concentraciones de $[Ag^+] = 0.1 \text{ mM}$ y $1 \text{ }\mu\text{M}$, observándose en todos los casos el halo de inhibición característico del efecto antibacteriano.

El uso de AgNPs para inhibir el crecimiento microbiano se encuentra ampliamente reportado^{1-3,70-72}. Sin embargo, para nuestra sorpresa, los resultados demuestran un efecto nulo de las AgNPt y AgNPe sobre la cepa de *E. Coli* utilizada (Figura 36). Este resultado se atribuye a la falta de liberación de iones plata por las AgNPs como se evidenciaba en los experimentos electroquímicos. Este resultado concuerda con los experimentos de Yang *et al.*⁷³, quienes estudian la influencia del medio y los surfactantes para la disolución de las nanopartículas. En sus estudios demuestran cómo nanopartículas recubiertas con citrato presentan una fracción de disolución menor a 0.001, mientras que otras AgNP recubiertas con surfactantes de menor afinidad por la plata, como la goma arábica, sobrepasan una fracción de disolución de 0.2. Si tenemos en cuenta que las AgNPe presentaron una mayor estabilidad que las AgNPt y que estas no fueron capaces de liberar cantidades de Ag^+ detectables, podemos predecir un resultado similar para las AgNPe.

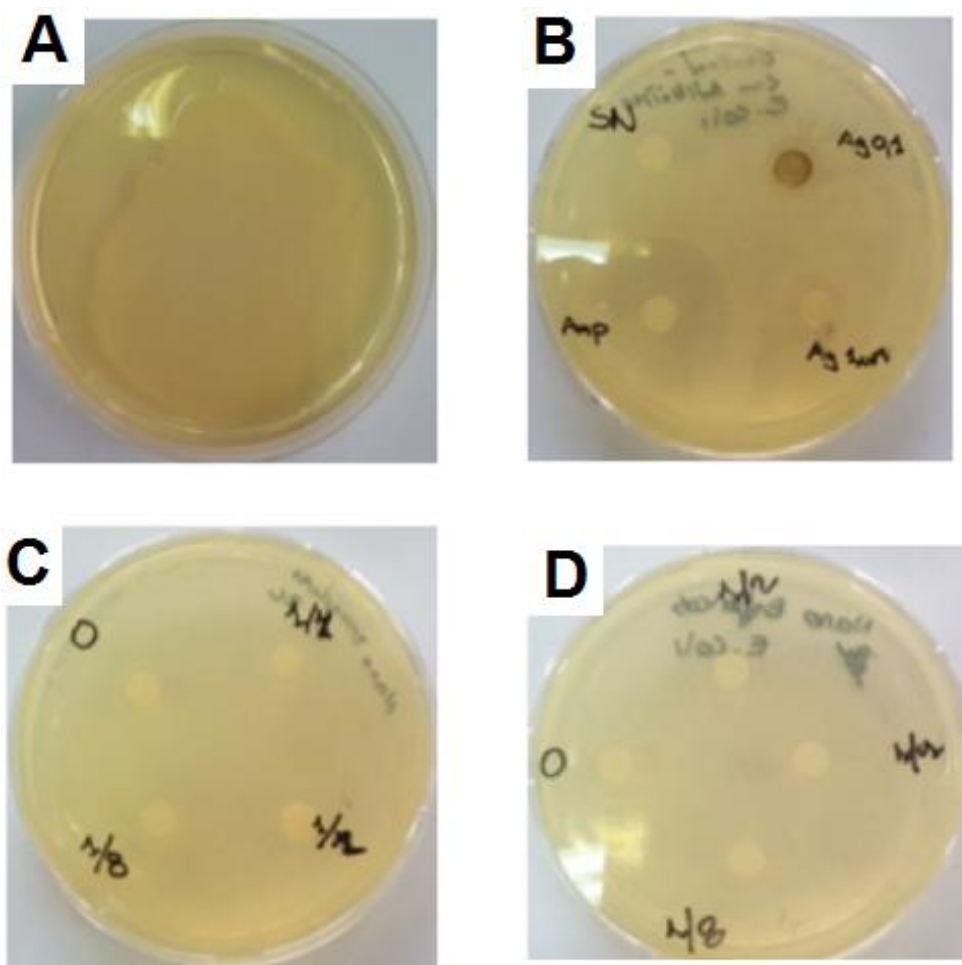


Figura 37. Actividad antibacteriana de las nanopartículas esféricas y triangulares por difusión en agar: Control Positivo de crecimiento (A). Control Negativo sin agente antibacteriano (SN) y aplicando distintas concentraciones de Ag 0.1 mM, 1 μ M y con ampicilina (Amp) (B). Nano partículas triangulares en diluciones 0, 1/2, 1/4, 1/8 (C). Nano partículas esféricas con almidón en diluciones 0, 1/2, 1/4, 1/8 (D).

Claramente la escala nanométrica por sí sola no es suficiente para determinar la efectividad bactericida de las partículas. Esto sigue la línea de trabajo de Carlson⁴⁵ donde se demuestra la importancia de la composición de las partículas además del tamaño, y de otros autores que postulan que directamente en realidad el verdadero efecto bactericida queda limitado a la liberación de Ag^+ como únicos responsables y que el tamaño o morfología de las partículas influye simplemente en el aumento del área expuesta que facilita la redisolución del metal por los agentes oxidantes del medio.

Dado que concentraciones tan bajas como $1 \mu\text{M}$ de AgNO_3 son suficientes para producir un notorio halo de inhibición, se confirma que efectivamente la concentración de iones ($0.9 \mu\text{M}$) medida en la fracción D provenían de la disolución del remanente de la plata durante la centrifugación, dado que no estaban en solución a la hora de realizar el cultivo bacteriano; puesto que de otro modo se debería haber observado un halo de inhibición en la tira embebida de nanopartículas.

Los resultados muestran que ambos tipos de nanopartículas no fueron efectivos como agentes antibacterianos, lo cual sugiere que el tamaño no es el único factor a tener en cuenta para que se liberen de forma efectiva iones, que en última instancia serían los responsables de la actividad antibacteriana. El fuerte poder estabilizante del almidón y el gran tamaño que presentan las nanopartículas triangulares, podrían estar incidiendo en la capacidad del oxígeno de liberar iones. Por otra parte es relevante mencionar que la concentración de las nanopartículas no fue un factor clave ya que no se observó ningún halo de inhibición, incluso empleando una fracción de AgNPt concentradas en un vector de 50 por centrifugación (Figura S2).

II.4 Conclusiones

La formación de AgNPt se da en dos etapas, primero se crean núcleos con forma esférica que luego, en una segunda etapa, avanzan hacia su forma triangular plana en un mecanismo complejo de reacciones opuestas generado por el borohidruro de sodio y el peróxido de hidrógeno. La alta reactividad de las nanopartículas de plata por el H_2O_2 abre la posibilidad a la creación de un sensor colorimétrico, rápido, económico y sensible.

Las AgNP_e sintetizadas son altamente estables, mientras que las AgNPt presentan una evolución de la forma con el transcurso del tiempo. Confirmamos que las AgNPt no liberan Ag^+ , por lo que el truncamiento de los vértices de los nanotriángulos seguiría un mecanismo de ordenamiento interno de los átomos.

Los resultados apoyan el paradigma que plantea que la acción antimicrobiana depende exclusivamente de la liberación de Ag^+ , lo cual pone en evidencia que el

efecto del tamaño de la partícula estaría vinculado simplemente con la cantidad de plata expuesta a la oxidación.

II.5 Perspectivas futuras

No podemos evitar pensar en las razones por las cuales las AgNPs no fueron capaces de detener el crecimiento bacteriano, siendo que está claramente reportado su efecto antibacteriano. Nuestras principales conclusiones sostienen que la liberación de iones plata es el factor clave para su funcionamiento, por lo tanto los experimentos futuros tendrán como objetivo buscar agentes de recubrimiento más débiles que permitan el acceso de los oxidantes hasta la superficie de la AgNP para su disolución. Otro enfoque apuntaría hacia la posibilidad de agregar al coloide un oxidante débil, incluso un agente de recubrimiento que se “active” ante la presencia de determinados microorganismos, de forma que se desencadene un mecanismo de oxidación sobre la nanopartícula para que la misma libere iones plata solo cuando sea necesario. También es necesario investigar sobre los agentes químicos y físicos que se encuentren naturalmente presentes en los ambientes capaces de disolver lentamente la partícula para permitir una liberación de iones sostenida y prolongada en el tiempo. Además, está reportado que las AgNP son sensibles a la concentración de NaCl ⁷⁴ y pH ⁷⁵, por lo que los estudios futuros también deberían contemplar el efecto particular de estos agentes.

Por su lado, la posibilidad de crear un sensor colorimétrico rápido y económico de peróxido de hidrógeno con AgNPt, genera una rama completamente nueva de estudio, donde los principales desafíos serán aumentar la sensibilidad y la selectividad del método, así como también estudiar el efecto de los agentes de recubrimiento, el pH, y la concentración de sales en solución..

Anexos

Anexo 1

Puesta a punto de la técnica de Stripping Anódico

Estudio de las Velocidades de Barrido

La puesta a punto de la técnica de *stripping anódico* llevo un amplio periodo de optimización, un aspecto muy importante de este ensayo es la velocidad de barrido como se explica en la sección 6.4, para ello, se analizaron 4 velocidades de barrido: 10, 100, 125 y 200 mV/s, (Figura S1). Para una concentración fija de AgNO_3 0.5 M, un tiempo de deposición de 2 minutos, usando un electrodos de carbono vítreo, Ag|AgCl y Pt como trabajo, referencia y auxiliar respectivamente, H_2SO_4 0.1 M como electrolito soporte y un volumen de celda de 10 mL. Los resultados muestran que para una misma concentración de iones Ag^+ , la velocidad 125 mV/s mostro un incremento de poco más del doble de señal. Por lo tanto se prosiguió usando este parámetro.

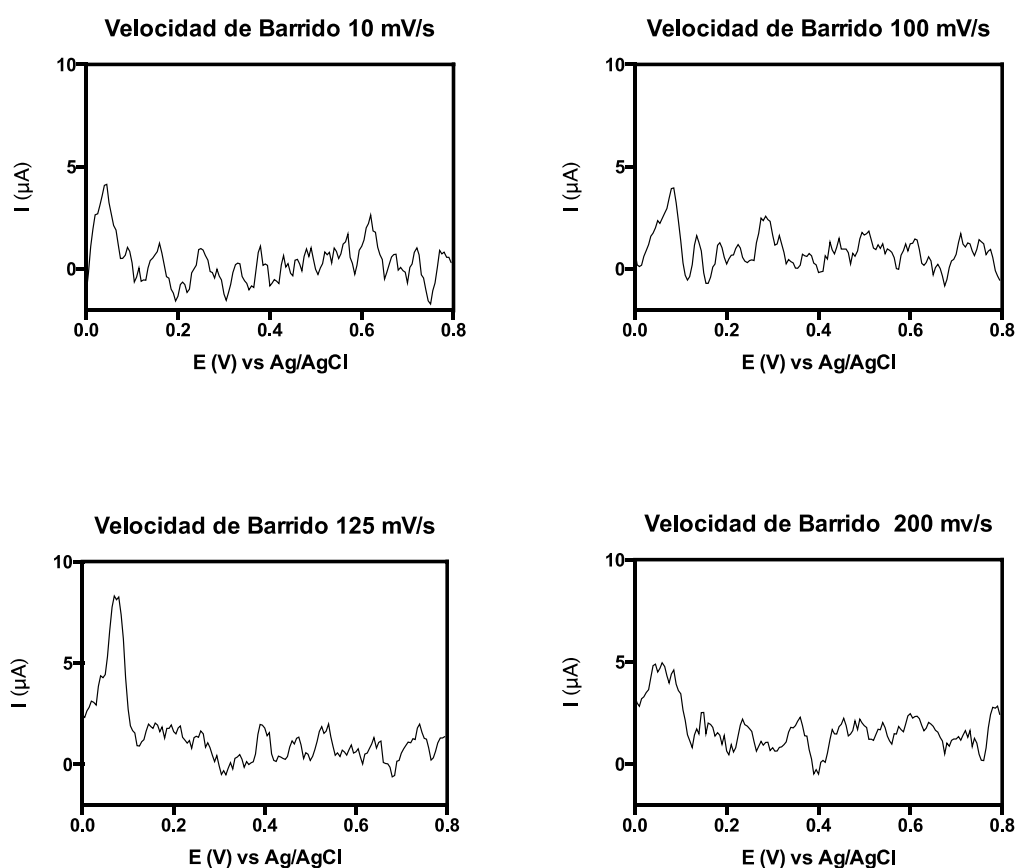


Figura S1. Estudio de las velocidad de barrido para una concentración de $[\text{Ag}^+] = 5 \text{ M}$, con velocidades de 10, 100, 125 y 200 mV/S, en NaCl [0.1 M].

Tiempos de deposición

El tiempo de deposición es una variable crucial, debido a que un tiempo de deposición escaso podría alejarnos de los límites de detección deseados y tiempos muy extensos además de dificultar el experimentos por razones prácticas, podría depositar múltiples capas en el electrodo, disminuyendo la exactitud del experimento. Por lo tanto se probaron 3 escenarios posibles para tiempos de 120, 300 y 420 s, para una concentración fija de AgNO_3 0.4 M, usando un electrodos de carbono vítreo, H_2/H^+ y Pt como trabajo, referencia y auxiliar respectivamente, H_2SO_4 0.1 M como electrolito soporte y un volumen de celda de 10 mL. Los experimentos muestran que con un tiempo de deposición de 300 segundos se consigue el pico con mayor intensidad y mejor definición.

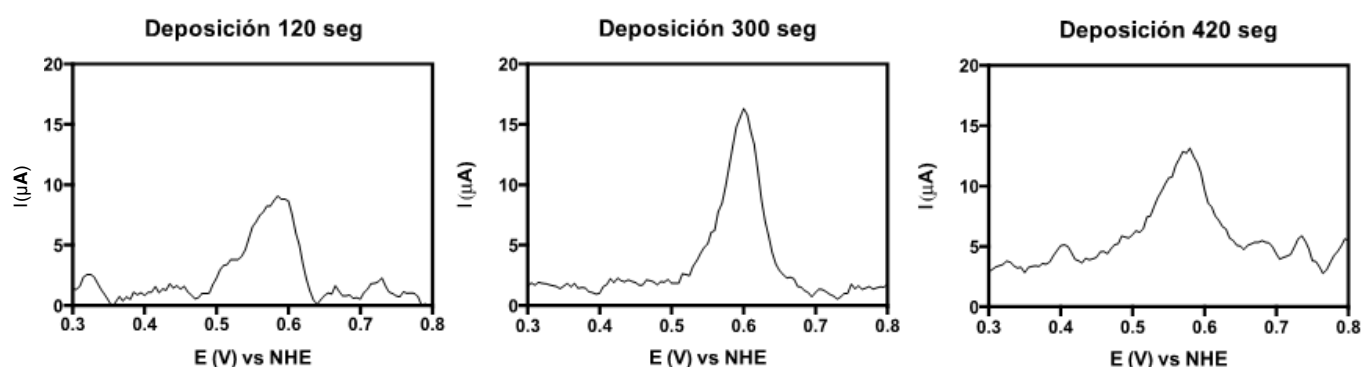


Figura S2. Estudio de las velocidad de barrido para una concentración de $[\text{Ag}^+] = 5 \text{ M}$, con velocidades de 10, 100, 125 y 200 mV/S, en H_2SO_4 0.1 M.

Anexo 2

Ensayo Biológico

En el intento de conseguir que las AgNPs tuvieran efectos sobre las bacterias, se las concentró en un factor de 50. Para las AgNPt, se toma 1 mL de solución, se centrifuga a 13.000 rpm durante 40 minutos, se eliminan 980 μ L del sobrenadante, y el pellet se resuspende en 20 μ L de agua, agitando en vortex. Luego se vierten 5 μ L del concentrado en el disco de papel de filtro y se coloca sobre la placa de agar con la E. Coli. Para las AgNPe, se colocan 5 μ L de la disolución de síntesis y se deja secar a temperatura ambiente durante 5 min repitiéndose el proceso 2 veces para tener un concentrado mayor de partículas en el disco de papel.

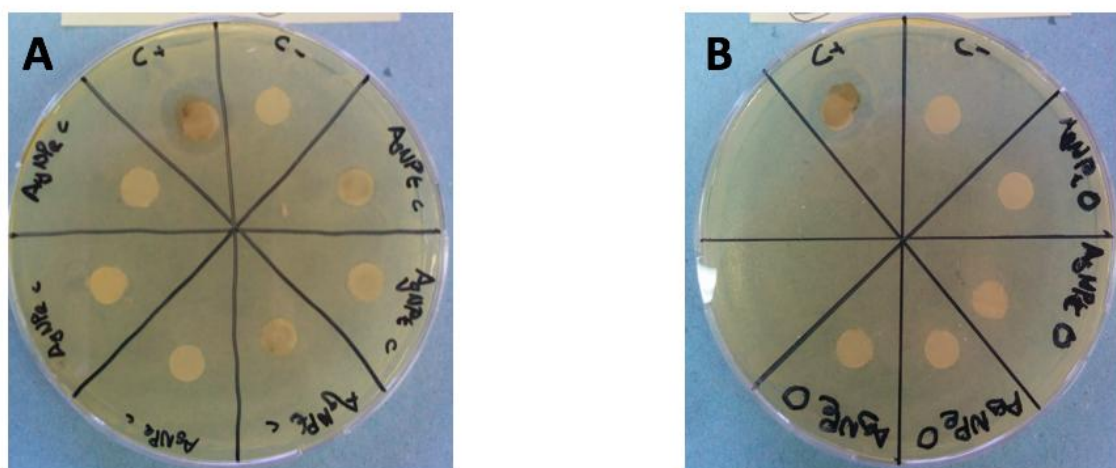


Figura S3. Actividad antibacteriana de las nanopartículas esféricas y triangulares por difusión en agar A y B Cultivo de E. Coli. C+, control positivo con AgNO_3 100 mM. C-, control negativo con agregado de LB. AgNPt c, se centrifuga las AgNPt durante 40 min a 13.000 rpm en eppendorf de 1 mL, se descartan 980 μ L del sobrenadante y se colocan en el disco 5 L del pellet. AgNPe c, Se depositan 5 μ L de AgNPe, se deja secar durante 5 minutos, y se repite el proceso 2 veces más. AgNPt 0 y AgNPe 0. La solución de NP fue usada sin concentrar. Todos los resultados son realizados por triplicado.

Referencias

1. Shukla, M. K., Singh, R. P., Reddy, C. R. K. & Jha, B. Synthesis and characterization of agar-based silver nanoparticles and nanocomposite film with antibacterial applications. *Bioresource. Technol.* **107**, 295–300 (2012).
2. Guzman, M., Dille, J. & Godet, S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomed-Nanotechnol.* **8**, 37–45 (2012).
3. Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009).
4. Durán, N., Marcato, P. D., De Souza, G. I. H., Alves, O. L. & Esposito, E. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *J. Biomed. Nanotechnol.* **3**, 203–208 (2007).
5. Kokura, S., Handa, O., Takagi, T., Ishkawa, T., Naito, Y. & Yoshikawa, T. Silver nanoparticles as a safe preservative for use in cosmetics. *Nanomed-Nanotechnol* **6**, 570–574 (2010).
6. Gangadharan, D., Harshvardan, K., Gnanasekar, G., Dixit, D., Popat, K. M. & Anand, P. S. Polymeric microspheres containing silver nanoparticles as a bactericidal agent for water disinfection. *Water Res.* **44**, 5481–5487 (2010).
7. Praskalo-Milanovic, J. Z., Kostic, M. M., Dimitrijevic-Brankovic, S. I. & Skundric, P. D. Silver-loaded lyocell fibers modified by tempo-mediated oxidation. *J. Appl. Polym. Sci.* (2010). doi:10.1002/app.32128
8. Geranio, L., Heuberger, M. & Nowack, B. The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 8113–8118 (2009).
9. <http://nanocomposix.com/pages/plasmonics> (2015).
10. Mie, G. A contribution to the optics of turbid media, especially colloidal metallic suspensions. *Ann. Phys.(Leipzig)* **4**, 3 (1908).
11. BohrenHuffmann. Mie Plot. at <http://www.philiplaven.com/mieplot.htm>
12. Zou, S., Zhao, L. & Schatz, G. C. Extinction spectra of silver nanoparticle arrays. 1–8 (2003) <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/>.
13. Brioude, A. & Pileni, M. P. Silver nanodisks: optical properties study using the discrete dipole approximation method. *J. Phys. Chem. B* **109**, 23371–23377 (2005).
14. Germain, V., Brioude, A., Ingert, D. & Pileni, M. P. Silver nanodisks: size selection via centrifugation and optical properties. *J. Chem. Phys.* **122**, 124707–9 (2005).
15. Botasini, S. Tesina de grado, Licenciatura en Bioquímica. 1–61 (2014).
16. Elechiguerra, J. L., Reyes-Gasga, J. & Yacaman, M. J. The role of twinning in shape evolution of anisotropic noble metal nanostructures. *J. Mater. Chem.* **16**, 3906–14 (2006).
17. Tsai, S. C. & Song, Y. L., Yang, C. C., Chiu, W. Y. & Lin, H. M. Ultrasonic spray pyrolysis for nanoparticles synthesis. *J. Mater. Sci.* 1–11 (2004).

18. Mafuné, F., Kohno, J.Y., Takeda, Y., Kondow, T. & Sawabe, H. Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* **104**, 9111–9117 (2000).
19. Zhu, J., Liu, S., Palchik, O., Koltypin, Y. & Gedanken, A. Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles by pulse sonoelectrochemical methods. *Langmuir* **16**, 6396–6399 (2000).
20. Malarkodi, C., Rajeshkumar, S., Paulkumar, K., Vanaja, M., Jobitha, G. D. G. & Annadurai, G. Bactericidal activity of bio mediated silver nanoparticles synthesized by *Serratia nematodiphila*. *Drug Invention Today* **5**, 119–125 (2013).
21. Tamboli, D. P. & Lee, D. S. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *J. Hazard. Mater.* **260**, 878–884 (2013).
22. Zhang, Q., Li, N., Goebel, J., Lu, Z. & Yin, Y. A systematic study of the synthesis of silver nanoplates: is citrate a ‘magic’ reagent? *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 18931–18939 (2011).
23. Botasini, S., Dalchiele, E. A., Benech, J. C. & Méndez, E. Stabilization of triangular and heart-shaped plane silver nanoparticles using 2-thiobarbituric acid. *J. Nanopart. Res.* **13**, 2819–2828 (2010).
24. Wu, J., Qi, L., You, H., Gross, A., Li, J. & Yang, H. Icosahedral platinum alloy nanocrystals with enhanced electrocatalytic activities. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 11880–11883 (2012).
25. Glusker, J. P., Lewis, M. & Rossi, M. Crystal structure analysis for chemists and biologists. Wiley-VCH Publishers (1994).
26. Kilin, D. S., Prezhdo, O. V. & Xia, Y. Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles: ab initio study of preferential surface coordination with citric acid. *Chem. Phys. Lett.* **458**, 113–116 (2008).
27. Pastoriza-Santos, I. & Liz-Marzán, L. M. Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. *J. Mater. Chem.* **18**, 1724–15 (2008).
28. Millstone, J. E., Hurst, S. J., Métraux, G. S., Cutler, J. I. & Mirkin, C. A. Colloidal gold and silver triangular nanoprisms. *Small* **5**, 646–664 (2009).
29. Aherne, D., Ledwith, D. M., Gara, M. & Kelly, J. M. Optical properties and growth aspects of silver nanoprisms produced by a highly reproducible and rapid synthesis at room temperature. *Adv. Funct. Mater.* **18**, 2005–2016 (2008).
30. Rocha, T. C. R. & Zanchet, D. Structural defects and their role in the growth of Ag triangular nanoplates. *J. Phys. Chem. C* **111**, 6989–6993 (2007).
31. Batchelor-Mc Auley, C., Tschulik, K., Neumann, C. C. M., Laborda, E. & Compton, R. G. Why are silver nanoparticles more toxic than bulk silver? towards understanding the dissolution and toxicity of silver nanoparticles. *Int. J. Electrochem. Sci.* **9**, 1132–1138 (2014).
32. Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H. & Park, Y. H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microb.* **74**, 2171–2178 (2008).
33. Who collaboratin center for drug statistics methodology. http://www.whocc.no/atc_ddd_methodology/who_collaborating_centre/. (2013).

34. Furr, J. R. & Andrews, A. Antibacterial activity of Actisorb Plus, Actisorb and silver nitrate. *J. of Hosp. Infect.* 1–8 (1994).
35. Yakabe, Y. & Yasunaga, T. Kinetic studies of the interaction between silver ion and deoxyribonucleic acid. *Chem. Lett.* **9**, 373–376 (1980).
36. Hussain, S., Meneghini, E., Moosmayer, M., Lacotte, D. & Anner, B. M. Potent and reversible interaction of silver with pure Na, K-ATPase and Na, ATPase-liposomes *Biochim. Biophys. Acta* **1190**, 402–408 (1994).
37. De Nicola, M., Bellucci, S., Traversa, E., De Bellis, G. Micciulla, F. & Ghibelli, L. Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential. *J. Phys.: Condens. Matter.* **20**, 474204 (2008).
38. Requejo, R., Hurd, T. R., Costa, N. J. & Murphy, M. P. Cysteine residues exposed on protein surfaces are the dominant intramitochondrial thiol and may protect against oxidative damage. *FEBS J.* **277**, 1465–1480 (2010).
39. Sarkar, S., Jana, A. D., Samanta, S. K. & Mostafa, G. Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property. *Polyhedron* **26**, 4419–4426 (2007).
40. Montazer, M., Alimohammadi, F., Shamei, A. & Rahimi, M. K. In situ synthesis of nano silver on cotton using Tollens™ reagent. *Carbohydrate Polymers* **87**, 1706–1712 (2012).
41. Gorenšek, M. & Recelj, P. Nanosilver Functionalized Cotton Fabric. *Text. Res. J.* **77**, 138–141 (2007).
42. Paladini, F. M. Pollini, M., Deponti, D., Di Giancamillo, A., Peretti, G. & Sannino, A. Effect of silver nanocoatings on catheters for haemodialysis in terms of cell viability, proliferation, morphology and antibacterial activity. *J. Mater. Sci: Mater. Med.* **24**, 1105–1112 (2013).
43. Jain, J. Arora, S., Rajwade, J. M., Omray, P., Khandelwal, S. & Paknikar, K. M. Silver nanoparticles in therapeutics: development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Mol. Pharmaceutics* **6**, 1388–1401 (2009).
44. Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. *Appl. Environ. Microb.* **73**, 1712–1720 (2007).
45. Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L. & Schlager, J. J. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* **112**, 13608–13619 (2008).
46. Foley, S., Crowley, C., Smaih, M., Bonfils, C., Erlanger, B. F., Seta, P. & Larroque, C. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. bioph. Res. Co.* **294** 116–119 (2002).
47. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. & Clarck, D. P. *Biología de los Microorganismos*, 12ª edición. (2014).
48. Maida, C. M., Millici, M. E., Trovato, L., Oliveri, S., Amodio, E., Spreghini, E., Scalise, G. & Barchiesi, F. Evaluation of the disk diffusion method compared to the microdilution method in susceptibility testing of anidulafungin against filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 4071–4074 (2008).
49. Bonev, B., Hooper, J. & Parisot, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J. Antimicrob.*

- Chemoth.* **61**, 1295-1301 (2008).
50. Mirceski, V., komorsky-Lovric, S. & Lovric, M. Square-wave voltammetry. *Springer* 1–202 (2008).
 51. Bard, A. J. & Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods* 2nd Ed. 1–850 (2001).
 52. Pingarron, J. M. & Sanchez, P. *Química electro analítica: fundamentos y aplicaciones* Ed. Síntesis 1-384 (1999).
 53. Brydson, R. Aberration-corrected analytical transmission electron microscopy. *RMS-Wiley Imprint* 1–297 (2013).
 54. Williams, D. B. *Transmission Electron Microscope*. *Springer* 1–15 (1996).
 55. Berne, B. J. & Pecora, R. *Dynamic Light Scattering*.
 56. Malvern Instruments Ltd. *Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes*.
 57. Mie, G. Consideraciones sobre la óptica de los medios turbios, especialmente soluciones coloidales; por Gustav Mie. *Annalen Der Physik* **25**, 377-445 (1908).
 58. Botasini, S. & Méndez, E. On the purity assessment of solid sodium borohydride. *Journal of Power Sources* **197**, 218–223 (2012).
 59. Jiang, X. C., Chen, C. Y., Chen, W. M. & Yu, A. B. Role of citric acid in the formation of silver nanoplates through a synergistic reduction approach. *Langmuir* **26**, 4400–4408 (2010).
 60. Jiang, X. C., Chen, V. M., Chen, C. Y., Xiong, S. X. & Yu, A. B. Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach. *Nanoscale. Res. Lett.* **6**, 32 (2010).
 61. Jiang, Zeng & Yu. Thiol-frozen shape evolution of triangular silver nanoplates. *Langmuir* **23**, 2218–2223 (2007).
 62. Jahandari, S., Taher, M. A., Fazelirad, H. & Sheikhshoai, I. Anodic stripping voltammetry of silver(I) using a carbon paste electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. *Microchim. Acta* **180**, 347–354 (2013).
 63. Javanbakht, M., Divsar, F., Badiei, A., Fatollahi, F., Khaniani, Y., Ganjali, M. R., Norouzi, P., Chaloosi, M. & Ziarani, G. M. Determination of picomolar silver concentrations by differential pulse anodic stripping voltammetry at a carbon paste electrode modified with phenylthiourea-functionalized high ordered nanoporous silica gel. *Electrochim. Acta* **54**, 5381–5386 (2009).
 64. Botasini, S. & Méndez, E. Silver nanoparticle aggregation not triggered by an ionic strength mechanism. *J. Nanopart. Res.* **15**, 1526–1533 (2013).
 65. Carbó, A. D. *Electrochemical dictionary*. Allen J. Bard, György Inzelt, Fritz Scholz (eds). *J. Solid State Electrochem.* **13**, 505–506 (2008).
 66. Ivanova, O. S. & Zamborini, F. P. Size-dependent electrochemical oxidation of silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 70–72 (2010).
 67. Voorhees, P. W. The theory of ostwald ripening. *J. Stat. Phys* 1–22 (2015).
 68. Chung, S. Y., Kim, Y. M., Choi, S. Y. & Kim, J. G. Capturing heterogeneous nucleation of nanoscale pits and subsequent crystal shrinkage during ostwald ripening of a metal phosphate. *ACS Nano* **9**, 327–335 (2015).
 69. Jiang, X., Zeng, Q. & Yu, A. A self-seeding coreduction method for shape

- control of silver nanoplates. *Nanotechnol.* **17**, 4929–4935 (2006).
70. Mohanty, S., Mishra, S., Jena, P., Jacob, B., Sarkar, B. & Sonawane, A. An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomed-Nanotechnol.* **8**, 916–924 (2012).
 71. Bankura, K. P., Maity, D., Mollick, M. M. R., mondal, D., Bhowmick, B., Bain, M. K., Chakraborty, A., Sarkar, J., Acharya, K. & Chattopadhyay, D. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of dextran stabilized silver nanoparticles in aqueous medium. *Carbohydr. Polym.* **89**, 1159–1165 (2012).
 72. Van Dong, P. & Kasbohm, J. Chemical synthesis and antibacterial activity of novel-shaped silver nanoparticles. *Int. Nano Lett.* 1–9 (2012).
 73. Yang, X., Gondikas, A. P., Marinakos, S. M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H. & Meyer, J. N. Mechanism of silver nanoparticle toxicity Is dependent on dissolved silver and surface coating in caenorhabditis elegans. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 1119–1127 (2012).
 74. Bae, C. H., Nam, S. H. & Park, S. M. Formation of silver nanoparticles by laser ablation of a silver target in NaCl solution. *Appl. Surf. Sci.* 1–7 (2002).
 75. Csapó, E., Patakfalvi, R., Hornok, V., Tóth, L. T., Sipos, Á., Szalai, M. C. & Dékány, I. Effect of pH on stability and plasmonic properties of cysteine-functionalized silver nanoparticle dispersion. *Colloid. and Surface B: Biointerphases* **98**, 43–49 (2012).