

# **PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA**

## **RECUBRIMIENTOS POROSOS CON PROPIEDADES BACTERICIDAS**

**Rodriguez, María Verónica – LU 131978**

Licenciatura en Biotecnología

**Yun, Alejandro Martín – LU 1016777**

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dra. Angelomé, Paula Cecilia, Centro Atómico Constituyentes,**

**Comisión Nacional de Energía Atómica**

**Diciembre 2014**



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

### **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer a todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto final de carrera:

*Dra. Angelomé, Paula: Nuestra tutora, la persona que nos guió a lo largo de todo el proyecto. ¡Gracias por tu paciencia, por haber confiado en nosotros y abrirnos la puerta al mundo de la nanobiotecnología!*

*Lic. Guttlein, Leandro: Gracias por transmitirnos todo tu conocimiento y experiencia en los laboratorios, por guiarnos y apoyarnos a lo largo de todo el proyecto.*

*Lic. Ruiz, Alejandro / Lic. Fernández, Ignacio: Queríamos agradecerles por su ayuda incondicional durante los días de trabajo en UADE Labs.*

*Además, queremos agradecer también al Centro Atómico Constituyentes que nos facilitaron toda la maquinaria y materiales necesarios para el desarrollo de parte de este proyecto.*

**¡GRACIAS A TODOS!**

# RESUMEN

Los materiales compuestos basados en nanopartículas (NPs) metálicas y óxidos mesoporosos se caracterizan por:

- ✓ Las propiedades plasmónicas y la reactividad superficial de las NPs metálicas.
- ✓ La alta superficie específica y la porosidad controlada de los materiales mesoporosos.
- ✓ Las propiedades derivadas de la gran interfase metal-óxido.

Esta combinación única de propiedades hace que su producción haya atraído gran atención de la comunidad científica debido, principalmente, a que se prevén gran cantidad de aplicaciones para este tipo de materiales. Una de las aplicaciones que vale la pena destacar es la liberación de iones  $\text{Ag}^+$ , que actúan como agente bactericida.

- En el presente trabajo de investigación se evaluó el efecto bactericida de NPs de Ag inmovilizadas en soportes de óxidos mesoporosos ( $6\text{nm} < \text{poros} < 12\text{nm}$ ) de silicio y titanio sobre la cepa bacteriana *Escherichia coli* (BL21).

En primer lugar, se llevó a cabo la síntesis de los materiales en los laboratorios del Centro Atómico Constituyentes. Los films se prepararon por *dip-coating* a partir de soluciones, mediante el método conocido como Autoensamblado Inducido por Evaporación (combinación de química sol gel y autoensamblado de moléculas anfifílicas). Luego de la síntesis, los films se trataron térmicamente para estabilizar el óxido y eliminar el agente moldeante. A continuación, se realizó la incorporación de las NPs de Ag mediante reducción química de  $\text{AgNO}_3$  con formaldehído. Los films obtenidos, fueron caracterizados mediante espectroscopía UV-visible, elipsometría, microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía de rayos X dispersiva en energía (EDS). A través de estas técnicas fue posible confirmar la obtención de óxidos porosos y la correcta incorporación de NPs de Ag en ellos.

Finalmente, se desarrolló el protocolo creado para evaluar el efecto bactericida de dichos films sobre una cepa bacteriana inocua de *Escherichia coli* (BL21), en los laboratorios de UADE. Se llevaron a cabo dos estrategias experimentales: por un lado, se incubaron los films controles y films tratamiento (films cargados con NPs de Ag) en soluciones bacterianas (medio LB + inóculo) para luego medir la densidad óptica (600nm) en diferentes intervalos de tiempo y, por otro lado, se incubaron los mismos films en diferentes placas (agar). En el primer caso se pudo evaluar la influencia de las NPs de Ag sobre la cinética de crecimiento bacteriano y con el segundo método fue posible divisar la formación de un halo de lisis alrededor de los films.

Tras realizar todos los experimentos, se pudo observar que las NPs de Ag ejercen su efecto bactericida, incluso estando inmovilizadas en soportes de óxidos de silicio y titanio. Tal efecto se pudo observar de forma más clara en las placas con la formación característica de un halo de lisis alrededor del film, mientras que en las medidas de las densidades ópticas a 600nm, si bien se observó una tendencia a la disminución del crecimiento bacteriano, no se obtuvieron datos con significancia estadística.

Los resultados obtenidos son un primer paso para la elaboración de recubrimientos porosos con propiedades bactericidas, que resultarían de gran utilidad para lograr esterilidad en superficies.

# ABSTRACT

Composite materials based on metal nanoparticles (NPs) and mesoporous oxides are characterized by:

- ✓ The plasmonic properties and surface reactivity of metal NPs.
- ✓ The high specific surface and controlled porosity of the mesoporous materials.
- ✓ The properties derived from the large metal-oxide interface.

Because of the unique combination of properties, its production has attracted attention from the scientific community, mainly because a large number of applications anticipated for these materials. One of the most interesting applications is the release of Ag<sup>+</sup> ions, which act as a bactericide.

In this research project, the bactericidal effect of Ag NPs immobilized on silicon and titanium mesoporous oxide (6 nm <pore <12nm) was evaluated on the bacterial strain *Escherichia coli* (BL21).

Firstly, the material's synthesis was carried out at the laboratories of *Centro Atómico Constituyentes*. The films were prepared by *dip-coating* from suitable solutions using the method known as Evaporation Induced Self-Assembly (combination of sol-gel chemistry and self-assembly of amphiphilic molecules). After synthesis, the films thermally treated in order to stabilize the oxide and eliminate the template. Then the incorporation of Ag NPs was performed by chemical reduction of AgNO<sub>3</sub> with formaldehyde. The obtained films were characterized by UV-visible spectroscopy, ellipsometry, Scanning Electron Microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS). With these techniques, the formation of the porous structure and the correct incorporation of Ag NPs was demonstrated.

Finally, we developed the protocol to evaluate the bactericidal effect of these films on the bacterial strain *Escherichia coli* (BL21) in UADE laboratories. Two experimental strategies were followed: on the one hand, the control films and treatment films (films loaded with Ag NPs) were incubated in bacterial solution (LB medium + inoculum) and the optical density (600nm) was evaluated and, on the other hand, the same films were incubated in different plates (agar). In the first case, we could evaluate the influence of the Ag NPs on bacterial growth kinetics and, for the second method, it was possible to see the formation of a lysis halo around the films.

After all the experiments, it was observed that the Ag NPs exert their bactericidal effect, even when they are immobilized on silicon and titanium oxide substrates. Such effect could be observed more clearly in the plates with the formation of lysis halo surrounding the film. In the case of optical density measurements, a tendency to bacterial growth decrease was observed, but the no statistically significant results were obtained.

The obtained results are the first step towards the production of antimicrobial porous coatings that would be very useful in order to obtain sterile surfaces.

# INDICE

<b>1) INTRODUCCION</b> .....	<b>Pág. 8-9</b>
<b>2) ANTECEDENTES</b> .....	<b>Pág. 10-28</b>
<b>2.1.) Nanomateriales</b> .....	<b>Pág. 10</b>
<b>2.2.) Materiales mesoporosos</b> .....	<b>Pág. 11-17</b>
<b>2.3.) Nanopartículas metálicas</b> .....	<b>Pág. 18-26</b>
<b>2.4.) Microorganismos patógenos</b> .....	<b>Pág. 27-28</b>
<b>3) HIPOTESIS</b> .....	<b>Pág. 29</b>
<b>4) METODOLOGIA</b> .....	<b>Pág. 30-44</b>
<b>4.1.) Síntesis de films y NPs de Ag</b> .....	<b>Pág. 30-37</b>
<b>4.2.) Caracterización de films</b> .....	<b>Pág. 38-39</b>
<b>4.3.) Evaluación del efecto bactericida</b> .....	<b>Pág. 40-44</b>
<b>5) RESULTADOS</b> .....	<b>Pág. 45-70</b>
<b>5.1.) Caracterización de films</b> .....	<b>Pág. 45-46</b>
<b>5.2.) Films cargados con NPs de Ag</b> .....	<b>Pág. 47-57</b>
<b>5.3.) Efecto bactericida: Absorbancia a 600 nm</b> .....	<b>Pág. 58-62</b>
<b>5.4.) Efecto bactericida: Recuento de colonias en placa</b> .....	<b>Pág. 63-64</b>
<b>5.5.) Efecto bactericida: Incubación de films en placa</b> .....	<b>Pág. 65-70</b>
<b>6) CONCLUSIONES</b> .....	<b>Pág. 71-72</b>
<b>7) APLICACIÓN COMERCIAL</b> .....	<b>Pág. 73-81</b>
<b>8) BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>Pág. 84-91</b>

## **1. INTRODUCCION**

La preparación de NPs metálicas tiene gran interés debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, catalíticas, etc. Estas propiedades dependen del tamaño, forma y dispersión de las nanopartículas, que pueden ser controladas a partir del método de síntesis. Entre los parámetros más importantes que influyen en la morfología de las nanopartículas se encuentran: la elección del agente reductor, cantidades relativas y concentraciones de reactivos, temperatura y duración de la reacción.

Su sencilla síntesis y la eficaz actividad antibacteriana observada (amplio espectro), hacen que las NPs de Ag se hayan estudiado en gran medida como materiales antimicrobianos. La incorporación de las NPs de Ag en superficies sólidas, como los films mesoporosos, permiten conseguir una liberación controlada de los iones en un lugar específico<sup>(1)(2)</sup>.

El objetivo general del trabajo es el estudio del efecto bactericida que resulta de la incorporación de NPs de Ag a films delgados de óxidos mesoporosos ( $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$ ), mediante procesos que garanticen la máxima eficiencia posible.

Como objetivos específicos, se analizará la formación de NPs de Ag en función del tiempo para poder determinar la concentración óptima de plata a emplear y el tipo de óxido ideal para utilizar como soporte de las mismas.

En nuestro caso, la metodología empleada para llevar a cabo los diferentes experimentos se dividirá en 3 apartados; en primera instancia se explicarán los procesos desarrollados para la síntesis de los films mesoporosos de  $\text{SiO}_2$  y  $\text{TiO}_2$  y de las NPs de Ag (parte desarrollada en el Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica), luego se analizará la caracterización de los mismos mediante la técnica SEM (Microscopía Electrónica de Barrido), además de determinar la relación óxido/plata por medio de la técnica EDS (Espectroscopía de rayos X dispersiva en energía) y, en última instancia, se detallará el



protocolo empleado para evaluar el efecto bactericida de los films cargados con NPs de Ag sobre la cepa bacteriana inocua *Escherichia coli BL21* (parte desarrollada en los Laboratorios UADE).

A continuación, se describirán los resultados de los diferentes experimentos llevados a cabo y se procederá al análisis de los mismos para poder extraer conclusiones y determinar la veracidad de la hipótesis propuesta (ver apartado 3).

Por otra parte, al final del trabajo se incluye el estudio de una posible aplicación comercial que aprovecha la propiedad bactericida de las NPs de Ag en solución. En concreto, se trata de un spray bactericida, denominado “*Silver Nanospray*”, para uso doméstico en la higiene del hogar.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Nanomateriales**

Los nanomateriales exhiben propiedades físicas y químicas diferentes a las de los materiales tradicionales “*bulk*” debido a que poseen al menos una dirección en el espacio en el rango 1-100 nm. Propiedades como el punto de fusión o la conductividad muestran una dependencia fuerte con el tamaño en la escala nanométrica. Estas propiedades diferenciales convierten a la nanotecnología en una de las áreas de mayor desarrollo del siglo XXI.

Cualquier material tradicional puede obtenerse como nanomaterial mediante dos caminos, *top down* (de arriba hacia abajo) y *bottom up* (de abajo hacia arriba). En el primer caso se reduce el tamaño hasta que alguna de las dimensiones es el orden del nm y en el segundo caso se generan, a partir de precursores moleculares, arreglos con tamaño o periodicidad del orden de los nm<sup>(3)</sup>.

En este trabajo, se utilizaron dos tipos de nanomateriales que se complementan entre sí: óxidos mesoporosos y nanopartículas metálicas. Ambos se obtuvieron mediante técnicas *bottom up*, utilizando precursores moleculares (alcóxidos y sales metálicas). En las próximas secciones se describe el desarrollo histórico de estas dos familias de materiales así como los métodos de síntesis utilizados para obtenerlos.

## 2.2. Materiales mesoporosos <sup>(1)(2)</sup>

De acuerdo a la IUPAC, los materiales porosos pueden dividirse en tres categorías de acuerdo al diámetro de poro ( $d$ ) que presenten: microporosos ( $d < 2\text{nm}$ ), **mesoporosos** ( $2 < d < 50\text{nm}$ ) y macroporosos ( $d > 50\text{nm}$ ).

Hasta principios de los años 90, los materiales porosos más ampliamente estudiados eran la familia de aluminio silicatos cristalinos conocidos como zeolitas<sup>(4)</sup>, preparados utilizando moléculas como molde. Las posibles aplicaciones de este tipo de materiales estaban limitadas debido al tamaño de poro que presentan (menos de 2 nm). En 1992, un grupo de la *Mobil Oil Corporation* reportó la síntesis de los primeros materiales mesoporosos ordenados: la familia de sílices M41S (MCM-41, MCM-48, etc.)<sup>(5)</sup>. La síntesis de estos materiales se realiza en medio acuoso por precipitación e involucra la hidrólisis-condensación de un precursor inorgánico en presencia de un surfactante catiónico, que actúa como agente moldeante. Este último se organiza en arreglos supramoleculares por lo que los sólidos así obtenidos presentan alta área específica ( $\approx 1000\text{m}^2/\text{g}$ ) con un tamaño de poro monodisperso mayor al de las zeolitas: entre 2 y 10 nm, de acuerdo a las condiciones de síntesis.

Poco después de este trabajo pionero se realizaron estudios de los mecanismos involucrados en la formación de estos materiales<sup>(6-8)</sup> y se sumaron los primeros ejemplos de óxidos distintos de  $\text{SiO}_2$ <sup>(9)</sup>. Unos años más tarde, se reportaron los primeros ejemplos de óxidos mesoporosos de metales de transición<sup>(10-12)</sup>.

A los surfactantes catiónicos utilizados en las primeras síntesis se sumaron moldes aniónicos<sup>(9)</sup> y no iónicos, como aminas<sup>(13)</sup>, copolímeros dibloque<sup>(14,15)</sup> y copolímeros tribloque<sup>(14,16)</sup> basados en polióxido de etileno. Si bien algunos de los materiales obtenidos no presentaban orden de poros a largo alcance, otros resultaron altamente ordenados. Entre estos últimos se cuenta la sílice SBA-15, desarrollada por investigadores de la Universidad de Santa Bárbara utilizando como molde al copolímero tribloque Pluronic P123<sup>(16)</sup>. Este material

presentaba un tamaño de poro y espesor de pared significativamente mayor que los obtenidos hasta el momento, por lo que el estudio de sistemas similares y de sus posibles aplicaciones se expandió rápidamente.

Además, se desarrollaron nuevas formas de procesamiento, a los polvos obtenidos en un principio se sumaron poco después: monolitos<sup>(15)</sup>, fibras<sup>(17,18)</sup>, esferas<sup>(17)</sup> y estructuras jerárquicas<sup>(23)</sup>. Un ejemplo particularmente interesante de procesamiento de materiales mesoporosos es la obtención de films delgados, que permiten ampliar sustancialmente el rango de posibles aplicaciones de este tipo de compuestos. Los primeros films mesoporosos se obtuvieron dejando evaporar las soluciones que daban lugar a los polvos mediante *spin-coating*<sup>(20,21)</sup> o en las interfases agua-sustrato<sup>(22,23)</sup> y agua-aire<sup>(24)</sup>. Más adelante, se obtuvieron films mediante técnicas de evaporación controlada<sup>(25)</sup> y *dip-coating*<sup>(26-28)</sup>. Esta última técnica de preparación permitió el desarrollo del *Autoensamblado Inducido por Evaporación*<sup>(29)</sup>, que permitió obtener films delgados mesoporosos de manera altamente reproducible, tal como se describirá más adelante.

Desde fines de los noventa hasta la actualidad, la variedad de materiales mesoporosos reportados ha aumentado considerablemente. Si bien el mayor desarrollo se ha dado en la producción de SiO<sub>2</sub> mesoporoso, es posible obtener óxidos de metales de transición, mixtos e híbridos, carbón y metales mesoporosos con muy diversas estructuras tridimensionales de poros.

### 2.2.1. Preparación de óxidos mesoporosos

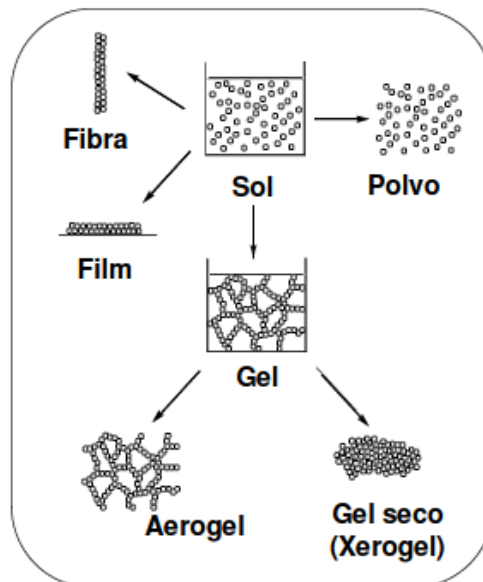
La síntesis de óxidos mesoporosos combina el autoensamblado de surfactantes con las reacciones de tipo sol-gel, es decir la hidrólisis y condensación de precursores inorgánicos.

**A) Precursores y reacciones sol-gel** (30-32)

Un sol es una suspensión coloidal estable de partículas en un líquido y un gel es una estructura porosa tridimensional continua de sólido interconectada con una fase líquida también continua. El proceso sol-gel puede definirse como una ruta que permite obtener un cerámico con una etapa intermedia que incluye los estados sol y/o gel. Este tipo de síntesis se realiza a temperaturas moderadas y en solventes acuosos u orgánicos (principalmente alcoholes). Estas condiciones de síntesis “suaves” hacen que sea posible:

- Obtener fases amorfas o cristalinas metaestables,
- incorporar moléculas orgánicas o biológicas al material final y
- procesar los materiales obtenidos de muy diversas maneras.

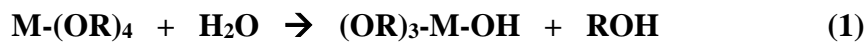
Pueden obtenerse mediante esta técnica óxidos, materiales híbridos orgánico-inorgánicos y otros compuestos procesados como films, polvos, fibras, etc (Figura 1). La combinación de las distintas particularidades de esta técnica explican la gran cantidad de usos y aplicaciones que presentan los productos obtenidos mediante la misma.



**Figura 1. Posibles formas de procesar un material obtenido mediante la técnica sol-gel**

La formación de un óxido por el método sol-gel implica conectar centros metálicos mediante puentes oxo o hidroxilo para generar (hidroxilo)polímeros de metal en solución. Para ello se hace reaccionar un precursor  $MX_n$  con agua, donde M es el elemento del cual se quiere obtener el óxido y X es un anión inorgánico o un grupo  $-OR$ .

El primer paso de la reacción es la *hidrólisis* de un grupo alcóxido (o de un anión) para dar lugar a un hidroxocompuesto, tal como se ejemplifica en la ecuación (1) para el caso de un alcóxido:



Luego, las especies hidroxiladas pueden reaccionar entre sí, dando lugar a reacciones de *condensación*, cuyos productos son oligómeros y, eventualmente, partículas de óxido (ecuación 2):

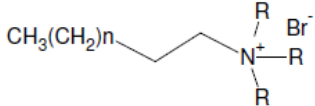
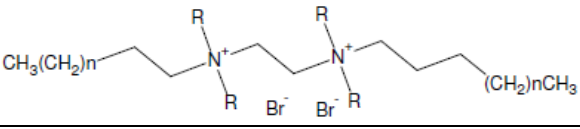

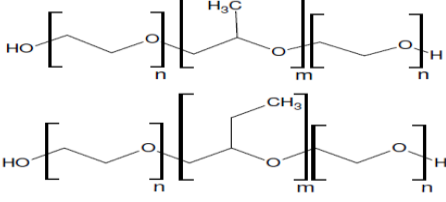
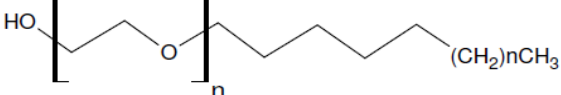
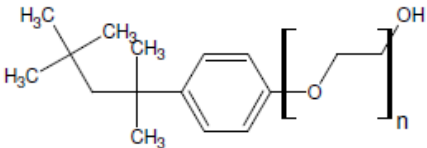
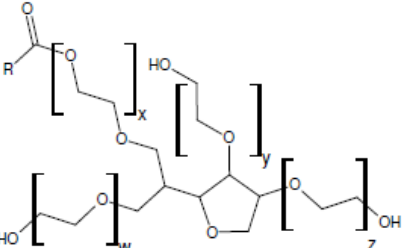


En el caso de los alcóxidos de silicio, la hidrólisis es lenta y puede catalizarse en medio ácido o básico; la velocidad de condensación se minimiza a valores de pH entre 1 y 3. Para precursores de metales de transición, ambas reacciones son procesos rápidos y se requieren medios extremadamente ácidos o la presencia de complejantes para evitar la condensación extendida.

Por último, es importante notar que la velocidad de las reacciones de hidrólisis-condensación puede controlarse mediante el ajuste de ciertas condiciones de reacción (tipo de precursor, solvente, pH, etc.). Un control preciso de estas variables permite definir el tamaño, la forma y la química superficial de los polímeros inorgánicos y, por ende, permite controlar con precisión las propiedades del material final.

**B) Autoensamblado de surfactantes**

Existe una gran variedad de agentes moldeantes que pueden ser utilizados para obtener óxidos mesoporosos (Tabla 1) <sup>(5)</sup>.

Nombre (nombre comercial)	Estructura
Sales de alquil amonio cuaternaria	
Surfactantes Gemini	
Surfactantes aniónicos	 <p>A = COO<sup>-</sup>, OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>            B = H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup></p>
Copolímeros tribloque (Pluronic y otros)	
Alquilpoli (óxidos de etileno) (Brij)	
Polialquil fenoles (Triton)	
Esteres de sorbitano (Tween)	

**Tabla 1: Agentes moldeantes utilizados para la obtención de óxidos mesoporosos.**

Los agentes moldeantes presentan uno o más dominios hidrofóbicos y uno o más dominios hidrofílicos. En un estado de baja concentración estos compuestos se encuentran solubilizados en el medio, sin presentar interacción entre ellos. Al aumentar su concentración en un medio polar, cada parte de la molécula comienza a interactuar buscando formas más estables: las secciones hidrofóbicas se repliegan entre sí solubilizándose mutuamente, y dejando expuestas a las secciones hidrofílicas. Esta nueva configuración se denomina *micela* y la concentración a la cual comienzan a aparecer se conoce como *concentración micelar crítica (cmc)*. A medida que la concentración se incrementa, estas micelas pueden comenzar a interactuar entre sí dando lugar a uno o más arreglos regulares, conocidos como cristales líquidos liotrópicos. Este proceso se denomina autoensamblado (Figura 2).

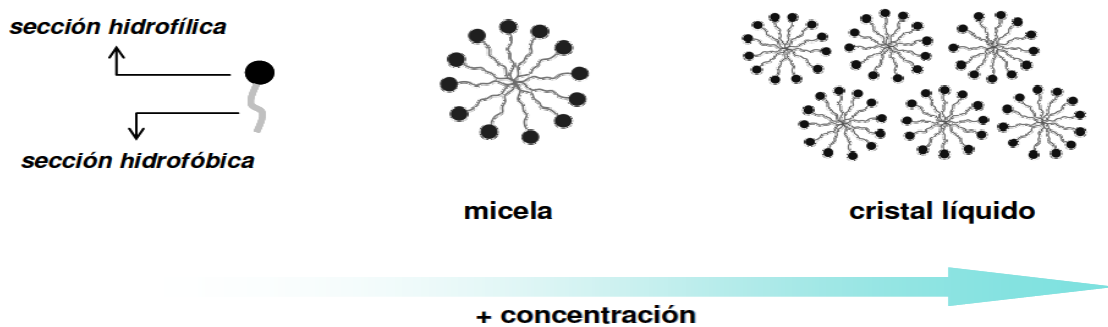


Figura 2. Proceso de autoensamblado.

### B.1.) Autoensamblado Inducido por Evaporación (AEIE)

En 1997, el grupo Brinker presentó la síntesis de films delgados mesoporosos mediante *dip coating*, a partir de soluciones diluidas de agente moldeante, precursor y agua en un solvente volátil<sup>(33,34)</sup>. Este método, que se denominó *Autoensamblado Inducido por Evaporación* (AEIE) fue, a partir de ese momento, el más utilizado para obtener films delgados mesoporosos de las más diversas composiciones y estructuras. Un esquema de lo que ocurre durante el AEIE puede observarse en la Figura 3.



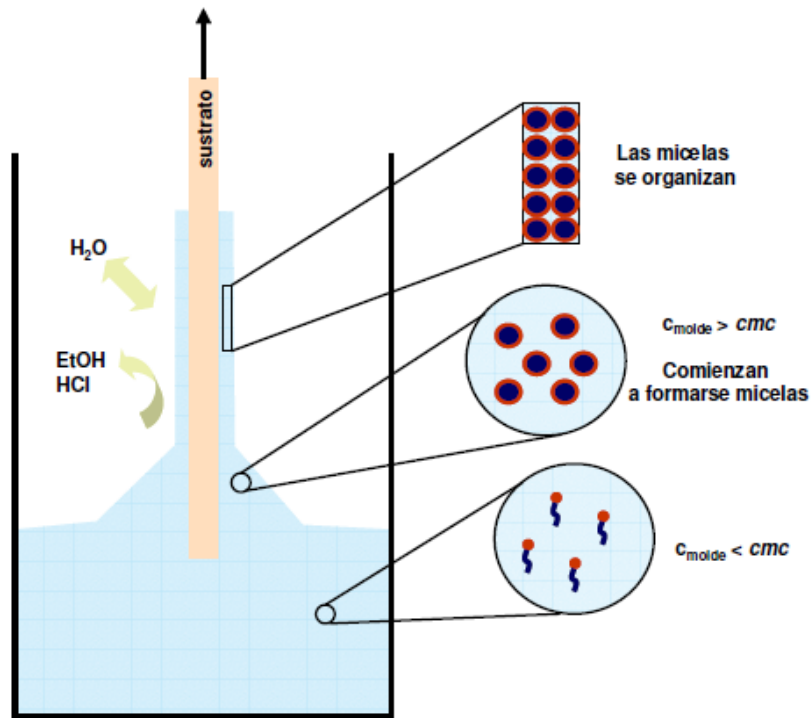


Figura 3. Proceso de obtención de films mesoporosos mediante *Autoensamblado Inducido por Evaporación*.

Para preparar un óxido mediante AEIE se parte de una solución de un precursor inorgánico y un agente moldeante en una mezcla agua/alcohol (u otro solvente volátil), en la cual la concentración del molde es menor a la *cmc* (es decir, la solución de partida no presenta micelas). A medida que el solvente se evapora, la concentración del agente moldeante aumenta en forma progresiva hasta que comienza el autoensamblado en micelas y, a mayores concentraciones, en cristales líquidos.

Para que el material obtenido resulte homogéneo es fundamental suprimir la condensación extendida del precursor inorgánico durante la etapa de evaporación. Esto se logra manteniendo el pH del medio controlado ( $[H^+] \approx 0.01M$  para Si y  $[H^+]/[M] \approx 1-4$  para metales de transición). Una vez que se ha alcanzado el orden, el material se comporta como un cristal líquido e, idealmente, es el momento en que debería comenzar la condensación extendida para dar lugar al óxido final.

### **2.3. Nanopartículas metálicas**

Las nanopartículas metálicas presentan un tamaño comprendido entre 1 a 100 nm, una escala en la que la superficie y las interfases son claves. Entre las características más destacables podemos citar:

- ✓ Predominan las fuerzas electrostáticas, de tipo Van der Waals (interacciones dipolares, puentes de H) y magnéticas.
- ✓ Propiedades plasmónicas y alta reactividad superficial
- ✓ Alta superficie específica (superficie que expone un material por unidad de masa)
- ✓ Gran relación superficie/volumen
- ✓ Las nanopartículas en solución se comportan como un coloide (dispersión de partículas o macromoléculas en un medio continuo).

Actualmente, las nanopartículas metálicas presentan múltiples aplicaciones y se encuentran presentes en una gran cantidad de productos comerciales<sup>(35)</sup>. De las NPs metálicas disponibles, las de Ag son las más usadas. Se estima que hay por lo menos 600 productos disponibles actualmente en todo el mundo que contiene algún tipo de nanomaterial basado en plata. Algunos de los productos que presentan NPs de Ag son: ropa deportiva para combatir las bacterias causantes de los malos olores, pinturas que son capaces de eliminar agentes patógenos del aire, recubrimientos de materiales de uso sanitario, purificadores de agua, etc.

En los últimos años se han realizado diversos estudios que analizan la posible toxicidad de estos materiales, sin embargo, los resultados encontrados hasta el momento no son concluyentes<sup>(35)</sup> y en algunos casos se ha encontrado que pueden ser incluso beneficiosas para la salud por lo que se espera que su uso se incremente en los próximos años.

En este trabajo, se emplearon NPs de Ag para explotar la propiedad bactericida que caracteriza a dicho metal. Esta acción consiste en inhibir las enzimas implicadas en el proceso respiratorio de óxido-reducción celular de las bacterias, provocando su muerte en pocos minutos. Un aspecto importante es que el microorganismo es incapaz de desarrollar mecanismos de resistencia como ocurre con los antibióticos u otros orgánicos. Otras ventajas que caracterizan a las NPs de Ag son la mayor durabilidad (ya que no se evapora a diferencia de aditivos orgánicos) y la resistencia a elevadas temperaturas.

### 2.3.1. Propiedades plasmónicas de las NPs metálicas

Entre las propiedades de las NPs metálicas destaca la aparición de plasmones superficiales localizados, cuya naturaleza es una consecuencia de las dimensiones de las NPs y de su alta superficie específica.

Los plasmones superficiales o *resonancias plasmónicas*, son modos de oscilación coherente de los electrones de conducción de los metales acoplados al campo electromagnético incidente<sup>(36)</sup>. Este fenómeno ocurre en la superficie de los metales en contacto con un material dieléctrico (no conductor), por lo que se hace muy notorio en el caso de films de espesores nanométricos y nanopartículas.

En el caso de las NP de algunos metales (Au, Ag, Cu y metales alcalinos), la frecuencia de resonancia tiene lugar en la región visible del espectro electromagnético, dando así lugar a coloides (soluciones de NPs) de colores muy intensos<sup>(37)</sup>.

La respuesta óptica de las NP está fuertemente determinada por su estructura electrónica, y ésta, a su vez, por el tamaño y la forma, sus interacciones mutuas e incluso su orientación relativa (en el caso de partículas anisotrópicas). A su vez, aunque en menor medida, estas propiedades se ven afectadas por la constante dieléctrica del medio en el que se encuentran las partículas (ya sea un solvente o un material encapsulante)<sup>(38)</sup>.

En la práctica, este fenómeno se estudia mediante espectrofotometría, estudiando las bandas de absorción de las NP. La forma, ancho y posición del máximo de estas bandas plasmónicas depende de las características de las NPs y el medio en el que se encuentran.

A continuación, se comentan algunos de los factores que afectan la posición y la forma de la banda plasmónica.

- ✓ **COMPOSICION** → Para forma y tamaños fijos, la posición de la banda plasmónica depende de la composición de la nanopartícula. En la Figura 4 se ejemplifica esto para el caso de nanopartículas de Au y Ag de la misma forma y tamaño<sup>(38)</sup>.

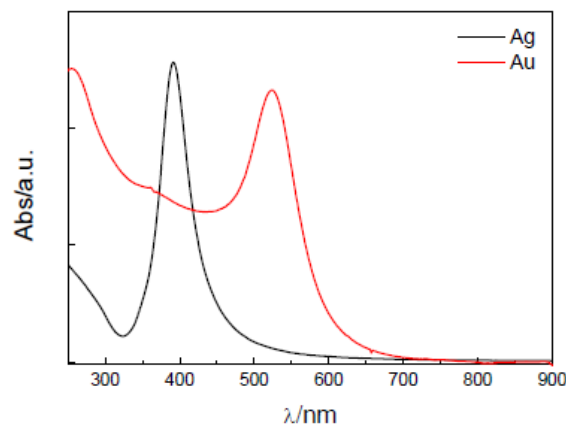


Figura 4. Espectro de absorción de nanopartículas esféricas de Au y Ag (diámetro = 15nm).

- ✓ **TAMAÑO** → Cuando las partículas metálicas son esféricas y muy pequeñas en comparación con la longitud de onda de la radiación incidente, sólo es posible que se produzca una resonancia dipolar, es decir, la frecuencia de la resonancia plasmónica superficial de nanoesferas es prácticamente constante. Sin embargo, las esferas de mayor tamaño presentan pérdidas, como consecuencia de un incremento del efecto de dispersión de luz superficial; estas pérdidas provocan la disminución en la eficiencia de la resonancia y, por tanto, un ensanchamiento y desplazamiento de la banda plasmónica hacia energías menores (longitudes de onda mayores)<sup>(39)</sup>.

- ✓ **FORMA** → Para partículas anisotrópicas pueden existir dos o más modos de oscilación de los electrones que se pueden excitar, es decir, pueden presentar más de una banda plasmónica. Como resultado, cuanto más compleja es la forma de una NP, más complejo resulta el espectro de absorción que presenta.
  
- ✓ **MEDIO EFECTIVO** → Los cambios en el índice de refracción alrededor de las partículas provocan una variación de la posición de la banda plasmónica. El máximo de la banda se desplaza a mayores longitudes de onda cuando el índice de refracción del medio que rodea a la partícula aumenta.  
Este cambio de índice de refracción puede deberse a: cambio de solvente, crecimiento de una capa no metálica alrededor de la partícula o adsorción de moléculas (orgánicas, biológicas) en la superficie de la partícula.
  
- ✓ **AGREGACION** → La variación de la respuesta plasmónica es especialmente notoria cuando varias nanopartículas se encuentran próximas entre sí, dado que esto provoca el acoplamiento entre sus respectivos campos cercanos, generando un nuevo modo plasmónico y, por ende, una nueva banda plasmónica.

### 2.3.2. Preparación de NPs de Ag

Las nanopartículas metálicas pueden ser sintetizadas mediante diversos métodos<sup>(40)</sup>, sin embargo, la reducción química es uno de los métodos más empleados. Dentro de los parámetros que influyen en la morfología de la NPs se encuentran la elección del agente reductor, las cantidades relativas y las concentraciones de reactivos, la temperatura y la duración de la reacción.

En solución, el método de reducción química empleando nitrato de plata como material de partida y algún reductor, como por ejemplo borohidruro de sodio, citrato sódico o hidroxilamina, permite obtener dispersiones coloidales de plata, estables y con coloración amarilla (máximo de absorción alrededor de 400 nm). El mismo agente reductor puede actuar como estabilizante, o pueden agregarse otras moléculas que ayuden a la estabilidad del coloide formado.

En este trabajo se empleó este método de reducción controlada, realizando la reacción dentro de los poros del óxido, y empleando formaldehído como agente reductor.

La síntesis controlada de materiales compuestos formados por NPs metálicas, incluidas en una matriz porosa, constituye un campo muy activo de investigación, debido a las propiedades interesantes que presentan los compuestos obtenidos<sup>(41,42)</sup>, entre las que se destacan:

- ✓ Las propiedades plasmónicas y la reactividad superficial de las NPs metálicas.
- ✓ La alta superficie específica y la porosidad controlada de los materiales mesoporosos.
- ✓ Las propiedades derivadas de la gran interfase metal-óxido.

Además, el hecho de contar con NP inmovilizadas en un material robusto como son los óxidos porosos (particularmente los films delgados) hace mucho más sencilla su utilización, en múltiples campos.

Los métodos de síntesis de NP dentro de materiales mesoporosos más utilizados se pueden agrupar en cuatro categorías<sup>(43)</sup>. La primera, involucra la impregnación de los mesoporos con una sal del metal de interés y la posterior reducción (térmica, química o fotoquímica) o reacción con un reactivo apropiado, para producir NP o nanocables metálicos o semiconductores. El segundo método implica la adición de una sal metálica o un reactivo organometálico durante la síntesis del material mesoporoso; la formación de las NP en el interior de los poros o paredes de la matriz ocurre luego por reducción química o durante el

tratamiento térmico. El tercer método se basa en la encapsulación de NP pre-fabricadas durante la síntesis del material mesoporoso. Por último, si se funcionalizan las paredes de los óxidos mesoporosos con ciertos grupos orgánicos (como tioles y aminos), la interacción química de estas moléculas con compuestos metálicos es la fuerza impulsora para la incorporación de especies metálicas dentro de los poros<sup>(44)</sup>.

De los métodos descriptos, la síntesis de NPs dentro de los mesoporos por reducción química resulta muy versátil ya que, al formarse las partículas dentro de los poros, se consigue un control preciso del tamaño, el cual puede variarse modificando las condiciones de reacción. Además, las partículas quedan protegidas de la oxidación, al quedar recubiertas por el óxido.

El grupo de trabajo perteneciente a la Gerencia Química de la Comisión Nacional de Energía Atómica cuenta con una gran experiencia en la síntesis y caracterización de óxidos mesoporosos. Han llevado a cabo múltiples experimentos relacionados y cuentan con una gran cantidad de publicaciones en el área. En lo que se refiere a antecedentes de este trabajo, estudiaron la incorporación de NPs de Ag en films de  $\text{TiO}_2$  mediante reducción química con soluciones diluidas de formaldehído y cuantificaron la funcionalización de la superficie y porosidad mediante espectroscopía de rayos X y energía dispersiva<sup>(45)</sup>. También realizaron la síntesis e incorporación de NPs de Ag en films de óxidos mesoporosos mediante fotoreducción química, mediante litografía UV<sup>(46)</sup>. Y además, estudiaron la conductividad eléctrica de las NPs de Ag embebidas en films mesoporosos de  $\text{TiO}_2$  mediante el método AFM<sup>(47)</sup>.

Sin embargo, no realizaron estudios relacionados con las aplicaciones bactericidas de este tipo de materiales.

### 2.3.3. Propiedades bactericidas

Aunque las propiedades antimicrobianas de la plata se conocen desde hace siglos, recientemente se ha comenzado a comprender los mecanismos por los que este metal inhibe el crecimiento bacteriano. Se piensa que los átomos de Ag se unen a los grupos tiol (-SH) de las enzimas, provocando su desactivación. También se cree que la plata puede participar en reacciones de oxidación catalítica que resultan en la formación de enlaces disulfuro, lo que afecta la estructura y función de enzimas celulares, tales como los necesarios para la respiración celular. ¿Cómo se produce la entrada a la célula? Se piensa que la entrada de los iones  $Ag^+$  al interior de la célula se produce a través de proteínas transmembrana que normalmente están involucradas en el transporte de distintos iones<sup>(48)</sup>.

Se sabe que la Ag ejerce un efecto bactericida tanto contra bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. La diferencia radica en que las primeras son menos susceptibles a los iones  $Ag^+$ ; la pared celular de las bacterias Gram-positivas son más gruesas, contienen más peptidoglicano cuya carga es negativa. Esto permite la retención de una mayor cantidad de Ag en la pared celular, impidiendo la entrada al interior celular.

### 2.3.4. Antecedentes sobre efecto bactericida de NPs de Ag

En la literatura se encuentran varios ejemplos acerca del uso de NPs de Ag como bactericidas. A continuación se comentan algunos ejemplos relevantes:

- En el año 2000, se reportaron estudios de la inhibición de iones de plata contra dos cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*<sup>(49)</sup>. En este estudio se pudo concluir que los iones  $Ag^+$  penetran por la pared celular en donde se da la reacción de ADN con las proteínas de tiol, ocasionando el bloqueo del proceso de replicación y/o muerte celular.



- Se investigó la síntesis y actividad antimicrobiana de la plata con los aminoácidos histidina y triptofano<sup>(50)</sup>, mediante el método de doble dilución en serie, mostrando una gran actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas. En estudios adicionales, se demostró el uso de nitrato de plata para el tratamiento de patógenos periodontales, encontrando que el nitrato de plata es más eficaz que los antibióticos, para el tratamiento de la cavidad oral de las infecciones periodontales<sup>(51)</sup>.
- Investigadores japoneses estudiaron la actividad de la zeolita de plata frente a *Escherichia coli* y se comparó su actividad bactericida con nitrato de plata, utilizando para su estudio la cepa OW6, cepa CSH7 y UM1, observándose una buena actividad antimicrobiana frente a las cepas<sup>(52)</sup>.
- Se reportó la síntesis de nanopartículas por métodos novedosos (condensación de gas inerte y co-condensación) y probaron la eficacia antibacteriana de las nanopartículas frente a *Escherichia coli* en medio líquido y sólido. Se observó que las nanopartículas exhiben actividad antibacteriana a bajas concentraciones. Las nanopartículas resultaron ser citotóxicas para las células bacterianas a una concentración de 8 µg/cm<sup>2</sup><sup>(53)</sup>.
- Para el año 2006, se reportó un protocolo de un solo paso, con la reducción del catión complejo  $[Ag(NH_3)_2]^+$  por cuatro sacáridos para la síntesis de nanopartículas de plata. A partir de este estudio se encontró una alta actividad antimicrobiana y bactericida de las NPs de Ag tanto en las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se observó que la actividad antimicrobiana de las NPs de Ag dependía de su tamaño, observándose que NPs de 25 nm poseían una mayor actividad antimicrobiana. Además se observó que las NPs de plata podían ser tóxicas para las células bacterianas en concentraciones menores de 1,69 mg/mL de Ag<sup>(54)</sup>.

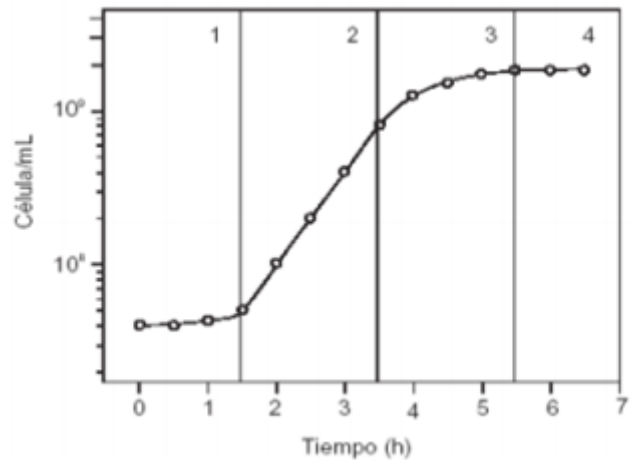
Como se puede observar, se han realizado múltiples trabajos que evalúan el efecto antimicrobiano de las NPs de Ag, sin embargo, se cuenta con poca información acerca del uso como bactericidas de NPs de Ag soportadas en óxidos mesoporosos. A continuación se citan dos trabajos que llevaron a cabo experimentos similares a los que se proponen en nuestro trabajo:

- Se sintetizaron films mesoporosos de  $\text{TiO}_2$  e incorporaron NPs de Ag por la vía de fotorreducción<sup>(55)</sup>. En este trabajo se describió también el estudio del comportamiento de la liberación de iones de plata desde la película mesoporosa. La actividad antibacteriana de los films se estudió mediante un método de etiqueta de fluorescencia utilizando como modelo la bacteria *Escherichia coli*. Los films de  $\text{TiO}_2$  mostraron una gran eficiencia antimicrobiana, tras el dopaje con Ag.
  
- Se estudió la síntesis de nanocristales de plata encapsulados en nanopartículas de sílice mesoporosa y probaron la eficacia antimicrobiana de los materiales frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas<sup>(56)</sup>. Estos nanocristales de plata fueron utilizados como semillas para el crecimiento de NPs de sílice, así como la fuente de iones de plata antimicrobianas. Debido a la accesibilidad y la red porosa de la capa protectora de sílice, los nanocristales incrustados eran capaces de oxidar lentamente los iones de plata. Además, el componente de sílice proporcionaba un soporte estable y duradero.

**2.4. Microorganismos patógenos (E. Coli)**

*Escherichia coli* es una de las especies bacterianas más estudiadas (familia *Enterobacteriaceae*), no sólo por su capacidad patogénica sino también como modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales, etc. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal a las pocas horas de vida del niño, y establece con el huésped una relación estable de mutuo beneficio. Sin embargo, *Escherichia coli* puede ser causa de enfermedades endógenas en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal. Sin embargo, las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas que se transmiten por vía oral o fecal de persona a persona o a través del agua y alimentos<sup>(57)</sup>.

*Escherichia coli* presenta cuatro fases de crecimiento: fase la adaptación, fase logarítmica o exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Figura 5). En la fase de adaptación (1), las células se adaptan al nuevo ambiente, las cuales dependen de las condiciones en que estaban antes de introducirlas al medio. En la fase logarítmica o exponencial (2), las células comienzan a crecer y dividirse. Cuando un nutriente del medio se acaba la bacteria alcanza la fase estacionaria (3) en la cual ya no hay crecimiento neto.



**Figura 5. Curva de crecimiento de *Escherichia coli*.**

A la hora de manipular agentes microbianos, es fundamental mantener ciertas condiciones de esterilidad (ambiente, superficies, materiales, etc.) para evitar posibles contaminaciones. A continuación se detallan los métodos de esterilización más frecuentes (Tabla 2).

<b>MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN</b>	
Por calor	Calor seco (Hornos eléctricos o a gas)
	Calor húmedo (Autoclave)
Por radiación	No ionizante (UV)
	Ionizante (Gamma)
Agentes químicos	Gases (Carbonide)
	Alcohol (Alcohol 70% + UV)

**Tabla 2. Métodos de esterilización más empleados.**

En este trabajo se propone preparar superficies bactericidas novedosas, alternativas a estos métodos.

### **3. HIPOTESIS**

Con el presente trabajo se pretende demostrar las propiedades bactericidas de las NPs de Ag incluidas dentro de diversos films delgados de óxidos mesoporosos. Si bien se conoce que este metal presenta propiedades antimicrobianas *per se*, existe escasa investigación acerca de su actividad como parte de un material compuesto metal-óxido poroso.

Para ello, el proyecto se llevó a cabo en dos partes; en primer lugar se realizó la síntesis de films de óxidos mesoporosos y la inclusión de las NPs de Ag en los poros del soporte y, en segundo lugar, se llevó a cabo experimentos para determinar si las NPs de Ag ejercen actividad antimicrobiana.

En la primera etapa se buscó obtener las mejores condiciones de incorporación de NPs de Ag, con el objetivo de mejorar los materiales obtenidos previamente en el grupo de trabajo. En la segunda etapa, se buscó determinar el efecto del tipo de matriz (óxido, tamaño de poro y espesor del film) en la capacidad bactericida de la plata, utilizando como comparación a las partículas en solución.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Síntesis de films mesoporosos y NPs de Ag

En la figura 6 se muestran los pasos del proceso que lleva a la obtención de film delgados mesoporosos, que se describirán en las secciones siguientes:

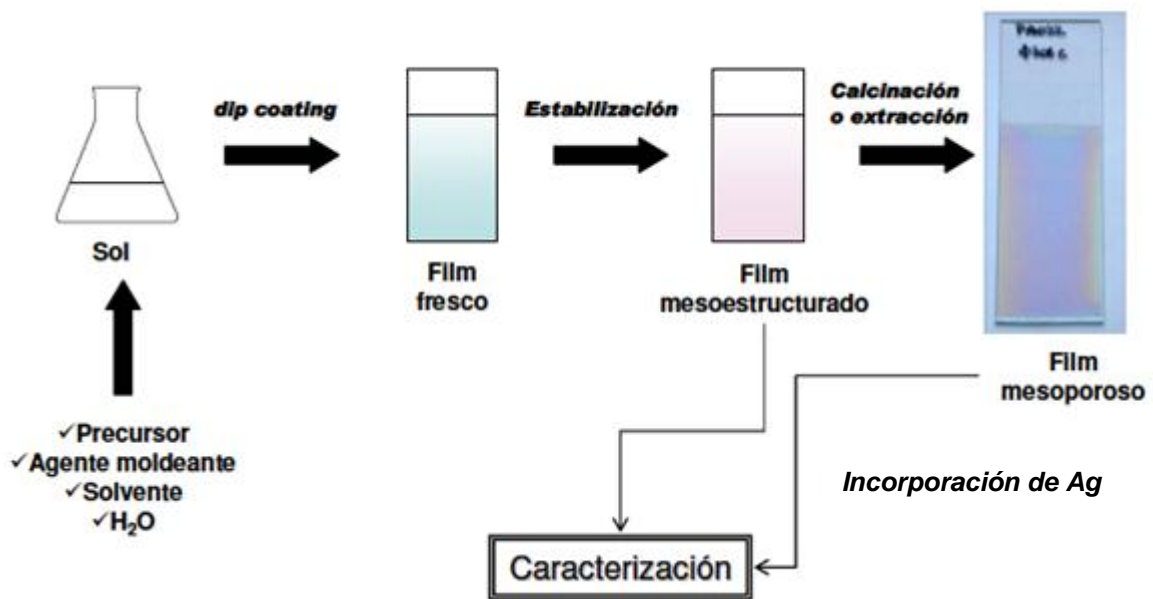


Figura 6. Esquema general del proceso de obtención de films delgados mesoporosos.

- 1) Se prepara la solución precursora, que contiene el precursor del óxido, el agente moldeante, el solvente y agua. La solución así preparada es un *sol* y se utiliza directamente para preparar los films.
- 2) Se limpian los sustratos sobre los cuales se depositarán las películas. El sustrato se coloca en el soporte del *dip coater*, se sumerge en la solución precursora y se extrae a velocidad controlada.
- 3) El film fresco se somete a un tratamiento de estabilización y consolidación. Se obtiene un film mesoestructurado.

- 4) El film mesoestructurado se somete a un proceso de extracción del surfactante con un solvente adecuado, o a calcinación a temperaturas moderadas.
- 5) Los films así obtenidos se pueden modificar con nanopartículas metálicas.
- 6) Los materiales obtenidos se caracterizan por las diferentes técnicas descriptas más adelante.

#### 4.1.1. Preparación y caracterización de los soles

A lo largo de este trabajo se prepararon diversos tipos de soles, para dar lugar a diferentes tipos de óxidos (SiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>). Sin embargo, la composición de todos los soles incluyó siempre:

- Un precursor del metal que forma el óxido.
- Un agente moldeante, que da lugar a los poros (Brij58 o F127).

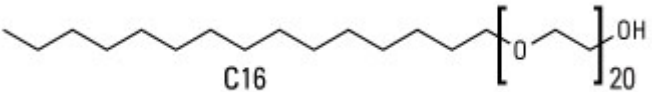
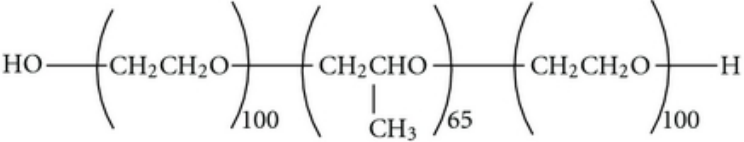
Nombre comercial	Estructura
Brij58	
F127	

Tabla 3. Agentes moldeantes utilizados en el trabajo.

- Un solvente volátil (etanol).
- Agua, que actúa como reactivo para la formación del óxido.

Todas las drogas utilizadas fueron de calidad pro análisis o superior y fueron utilizadas como se recibieron. El agua utilizada fue obtenida a partir de un equipo *E-pure* (Millipore) y presentó una resistencia de  $18\text{M}\Omega\text{cm}^{-1}$ . Las cantidades de reactivos a incorporar se midieron mediante pesada en balanza analítica, para minimizar los errores debidos a la dificultad de medir con exactitud pequeños volúmenes.

Los soles se prepararon mezclando, bajo agitación continua, en primer lugar el precursor con el solvente, luego el agente moldeante y finalmente el agua. Es a partir de este último agregado que pueden comenzar las reacciones de hidrólisis y condensación, por lo que se considera éste como el tiempo de inicio de la reacción sol-gel.

La agitación del sol es fundamental, ya que es necesario minimizar la presencia de gradientes de concentración en la solución, que podrían provocar reacciones no deseadas (por ejemplo, la hidrólisis no controlada del precursor).

Los soles se mantuvieron a  $-18^{\circ}\text{C}$  a lo largo de toda su vida útil, llevándose a temperatura ambiente únicamente para la preparación de los films. De esta manera, las velocidades de las reacciones de hidrólisis y condensación del precursor disminuyen de tal manera que pueden considerarse nulas.

A continuación se detallan los reactivos empleados para la preparación de los soles de titanio y silicio (Tabla 4):

Agentes moldeantes	Copolímero tribloque Pluronic F127 (Sigma) Copolímero dibloque Brij58 (Merck)
Solvente	Etanol absoluto (Biopack), H <sub>2</sub> O (Biopack)
Precursor del metal	TiCl <sub>4</sub> y Si(OEt) <sub>4</sub> (Merck)
Solución de HCl	HCl (Merck)

**Tabla 4. Reactivos utilizados para la preparación de los soles**



La proporción molar de los reactivos variaron según el tipo de estructura que se deseó obtener. En la tabla 5 se muestran las proporciones molares de los soles utilizados a lo largo de este trabajo; estas proporciones han sido establecidos por el grupo de investigación de CNEA en base a experimentos anteriores, con resultados favorables<sup>(1,2)</sup>.

	<i>SiO<sub>2</sub>-Brij58</i>	<i>SiO<sub>2</sub>-F127</i>
<i>TEOS</i>	1	1
<i>EtOH</i>	40	40
<i>HCl</i>	0,008	0,008
<i>H<sub>2</sub>O</i>	10	10
<i>Surfactante</i>	0,05	0,005
<i>Distancia interporo</i>	6 nm	12 nm

	<i>TiO<sub>2</sub>-Brij58</i>	<i>TiO<sub>2</sub>-F127</i>
<i>TiCl<sub>4</sub></i>	1	1
<i>EtOH</i>	40	40
<i>H<sub>2</sub>O</i>	10	10
<i>Surfactante</i>	0,05	0,005
<i>Distancia interporo</i>	6 nm	12 nm

Tabla 5. Proporción molar de reactivos empleados en la preparación de los soles

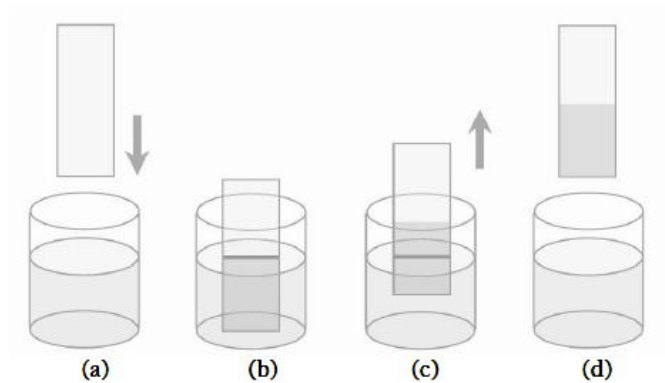
#### 4.1.2. Preparación de los films

A continuación se detalla el procedimiento de preparación de films así como el tratamiento que recibieron tras la síntesis.

Como soporte para la preparación de los films se utilizaron los tradicionales portaobjetos de vidrio (75x25x1mm). Fueron lavados con detergente y agua corriente, agua destilada y

agua E-pure, en ese orden. Finalmente fueron secados al aire o en estufa. Inmediatamente antes de preparar el film se los limpió con acetona, para garantizar la buena adhesión del mismo. En todos los casos, los sustratos se manipularon cuidadosamente utilizando pinzas y/o guantes, para evitar la contaminación por el contacto con la piel, que impide que el film se adhiera en forma pareja.

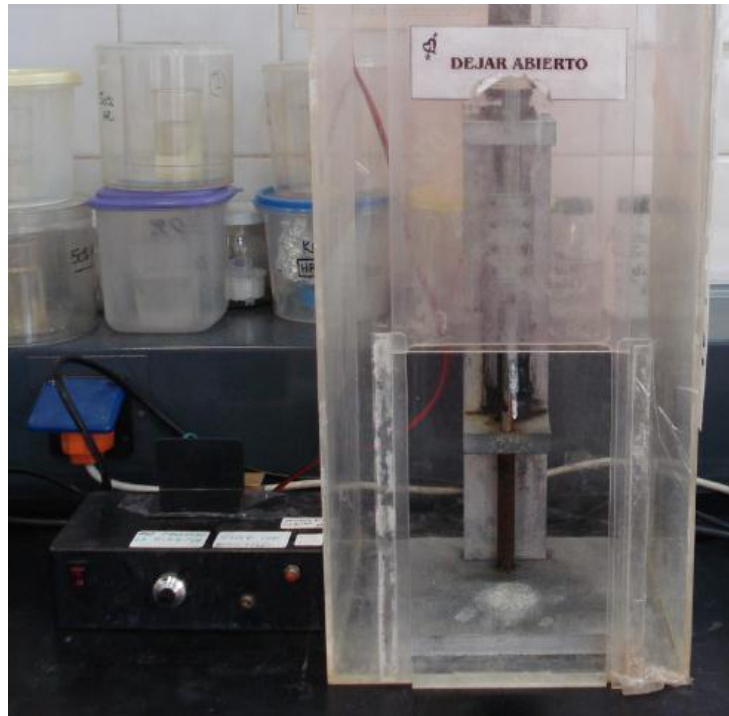
La preparación de los films se realizó mediante la técnica *dip-coating*, la cual consiste en sumergir la pieza a recubrir en una solución (en este caso, el sol), retirar la pieza y dejar evaporar el solvente para que se forme el recubrimiento por reacción de las especies presentes en la solución. Las etapas de dicho proceso se muestran en la figura 7.



**Figura 7. Esquema del proceso de *dip-coating*: a) Inmersión en la solución, b) la zona a recubrir queda inmersa en la solución, c) inicio de la deposición, d) el film delgado se forma por evaporación del solvente y reacción de las especies presentes en la solución.**

La velocidad de extracción del soporte y la humedad relativa del ambiente son factores que determinan tanto el tipo de mesoestructura obtenida como el espesor del film, por lo que deben ser cuidadosamente controlados.

En la figura 8 se muestra el equipo utilizado para la preparación de los films.



**Figura 8. Equipo para realizar *dip-coating*. A la izquierda, fuente de tensión; a la derecha, equipo en su caja, que lo mantiene a humedad y temperatura controlada.**

Para la preparación del film, el portaobjeto fue fijado a la cabeza móvil mediante una pinza y bajo él se dispuso un vaso de precipitado con el sol elegido. El equipo permite realizar films a velocidad constante, que puede variarse entre 0.2 y 4 mm/s. En este trabajo se emplearon tres velocidades de síntesis: 1, 2 y 4 mm/s.

### **Tratamiento post-preparación**

Para “congelar” la estructura obtenida y evitar su deterioro durante la eliminación del agente moldeante, se ha determinado la necesidad de exponer a los films a una serie de pasos de estabilización antes de la eliminación del molde por calcinación. Este tratamiento permite eliminar gradualmente el etanol y el ácido que contienen los films, aumentando el grado de polimerización de la red inorgánica, al mismo tiempo que se optimiza la separación de fases entre el agente moldeante y el óxido<sup>(58,59)</sup>.

En primer lugar, los films fueron conservados por 24 horas en una cámara de humedad relativa controlada a 50% de HR preparada utilizando una solución saturada de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  (Merck)<sup>(60)</sup>. Una vez transcurridas las primeras 24 horas en humedad controlada, los films se trasladaron a una estufa a 60°C por otras 24 horas y, finalmente, se colocaron por 24 horas en una estufa a 130°C. En estos dos últimos casos, los films pueden permanecer a las temperaturas indicadas por más de 24 horas, con resultados equivalentes.

La calcinación se realizó en una mufla (INDEF) provista de un controlador de temperatura, con una rampa de calentamiento de 1°C.min<sup>-1</sup> hasta la temperatura deseada (350°C), manteniendo ésta durante dos horas.

#### 4.1.3. Preparación e incorporación de las NPs de Ag

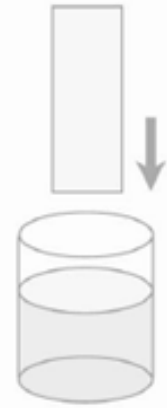
Para determinar las concentraciones de  $\text{AgNO}_3$  a utilizar para incorporar NPs a los films de  $\text{SiO}_2$  y  $\text{TiO}_2$  se llevaron a cabo experimentos preliminares. Se probaron diferentes condiciones, que se listan en la Tabla 6:

	[AgNO <sub>3</sub> ] (M)	Tiempo de impregnación (min)	Velocidad de preparación del film (mm/s)
<b>Films SiO<sub>2</sub></b>	0,2	10 / 20 / 30 / 40	1 / 2 / 4
<b>Films TiO<sub>2</sub></b>	0,002 / 0,005	10 / 20 / 30 / 40	1 / 2 / 4

Tabla 6. Condiciones evaluadas para definir las condiciones finales.

Las soluciones se prepararon de la misma forma; para la solución 0,2 M se pesaron 0,8493 g de  $\text{AgNO}_3$  (99% pureza); para la solución 0,002 M se pesaron 0,0085 g de  $\text{AgNO}_3$  y para la solución de 0,005 M se pesaron 0,0212 g de  $\text{AgNO}_3$ . La sal se pesó con balanza analítica para minimizar los errores de origen experimental, posteriormente se transfirió a un matraz aforado de 25 mL, completando el volumen con agua E-pure.

Una vez preparadas las soluciones de  $\text{AgNO}_3$  se procedió a cargar los films delgados con NPs de Ag. Se pesaron con balanza analítica 2 g de solución de  $\text{AgNO}_3$  (0,2M, 0,002M o 0,005M según corresponda) y 2 g de etanol absoluto; se dejó agitar de forma que se homogeneice la solución resultante de la mezcla de ambos reactivos. A continuación se agregó 0,8 g de formaldehído al 7% (agente reductor) y rápidamente, con la ayuda de unas pinzas, se sumergió el film dentro de la solución obtenida, manteniendo la mezcla en agitación suave. Este es el punto donde se lleva a cabo la impregnación que consiste en el llenado de los poros del soporte con una solución del precursor metálico ( $\text{AgNO}_3$ ), el cual se reducirá para dar lugar a las NPs de Ag.



En los diferentes tiempos de impregnación evaluados, se retiraron los films, se los secó, se los cortó en trozos más pequeños con la ayuda de una punta de diamante y una pinza, para facilitar la caracterización posterior.

## **4.2. Caracterización de los films cargados con NPs de Ag**

A continuación se describirán las técnicas utilizadas para caracterizar los materiales obtenidos.

### **4.2.1. Microscopia Electrónica**

Se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido por Emisión de Campo (FE-SEM) del Centro de Microscopías Avanzadas (CMA, FCEN-UBA) para el análisis de los diferentes films sintetizados.

El equipo empleado, además, está equipado con analizador de Espectroscopía de Rayos X Dispersiva en Energía (EDS, del inglés *Energy Dispersive Spectroscopy*), que permite determinar en forma semicuantitativa la composición de las muestras. Esta técnica detecta los rayos X que son desprendidos desde el interior de las muestras al ser irradiadas con un haz de electrones con suficiente energía; la energía contenida en los rayos X emitidos es característica de cada elemento (por tener cada átomo una estructura electrónica única). De esta forma, entonces, se puede obtener información acerca de los elementos que componen la muestra.

Las muestras se prepararon colocando un trozo del film (para observación de la superficie) o parte del film, desprendido con un bisturí (medida EDS para films de SiO<sub>2</sub>), sobre una cinta conductora de carbón adherida a un soporte de aluminio para microscopía.

En todos los casos, mediante EDS se cuantificó el contenido de cada uno de los elementos en zonas amplias de la muestra ( $\approx 1\mu\text{m}^3$ ). Como contenido total de cada elemento, se tomó el promedio de al menos 3 mediciones realizadas en diferentes sectores.

#### **4.2.2. Espectroscopía Ultravioleta-Visible**

En este trabajo, se realizaron medidas de espectros de absorción en la región UV-visible para visualizar la formación de los plasmones característicos de las NPs de Ag. Este método permite determinar, de manera sencilla, si las NPs metálicas se han incorporado satisfactoriamente en el soporte mesoporoso.

Para realizar las medidas, con la ayuda de una punta de diamante y una pinza, se cortaron trozos pequeños de cada film sintetizado, se lavaron suavemente con etanol y se colocaron adheridos al portamuestra de un espectrofotómetro con arreglo de diodos Hewlett Packard 8453, perteneciente a la Gerencia Química, CAC-CNEA. Las medidas se realizaron en la región 200-1000 nm.

#### **4.2.3. Medidas de espesor**

El espesor de los films es una variable fundamental a la hora de interpretar resultados y pensar en aplicaciones, y por lo tanto debe medirse de manera confiable. La medición de esta variable se realizó mediante elipsometría, con un equipo EEP SOPRA GES5A de la Gerencia Química, CAC-CNEA. El equipo ajusta las medidas de los parámetros elipsométricos  $\Delta$  y  $\Psi$  mediante un modelo, obteniéndose como resultados el espesor y el índice de refracción del material.

Para las medidas elipsométricas se emplearon los mismos trozos de film obtenidos en el apartado anterior.

**4.3. Evaluación del efecto bactericida de los films sintetizados**

**(Laboratorios de la Universidad Argentina de la Empresa)**

Tras los ensayos preliminares se decidió descartar los films sintetizados con una velocidad de *dip-coating* de 4mm/s debido a la falta de homogeneidad. Además, se estableció, en base a resultados previos del grupo<sup>(2)</sup>, que las concentraciones de la solución de AgNO<sub>3</sub> a utilizar serían 0,2 M para los films de SiO<sub>2</sub> y 0,005 M para los films de TiO<sub>2</sub>. El uso de la solución de AgNO<sub>3</sub> 0,002 M para cargar los films de TiO<sub>2</sub> fue descartado, ya que se observó una baja incorporación de NPs de Ag (coloración muy suave a lo largo del film).

Así pues, los films que fueron empleados para el estudio del efecto bactericida son los siguientes (Tabla 7):

SiO <sub>2</sub> -Brij58 Blanco (1mm/s)	SiO <sub>2</sub> -Brij58 NPs Ag (1mm/s)	TiO <sub>2</sub> -Brij58 Blanco (1mm/s)	TiO <sub>2</sub> -Brij58 NPs Ag (1mm/s)
SiO <sub>2</sub> -Brij58 Blanco (2mm/s)	SiO <sub>2</sub> -Brij58 NPs Ag (2mm/s)	TiO <sub>2</sub> -Brij58 Blanco (2mm/s)	TiO <sub>2</sub> -Brij58 NPs Ag (2mm/s)
SiO <sub>2</sub> -F127 Blanco (1mm/s)	SiO <sub>2</sub> -F127 NPs Ag (1mm/s)	TiO <sub>2</sub> -F127 Blanco (1mm/s)	TiO <sub>2</sub> -F127 NPs Ag (1mm/s)
SiO <sub>2</sub> -F127 Blanco (2mm/s)	SiO <sub>2</sub> -F127 NPs Ag (2mm/s)	TiO <sub>2</sub> -F127 Blanco (2mm/s)	TiO <sub>2</sub> -F127 NPs Ag (2mm/s)

**Tabla 7. Diferentes variantes de films evaluadas durante el trabajo.**

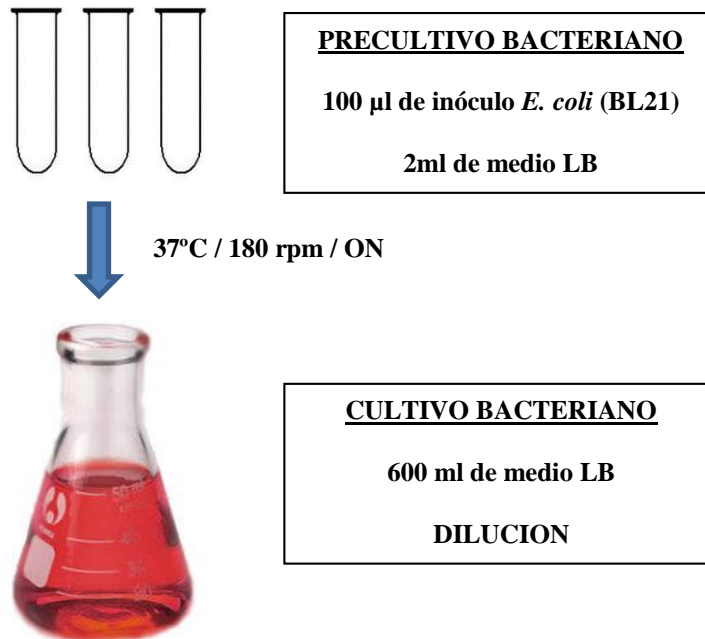
Un control negativo adicional fue el crecimiento de la solución bacteriana en ausencia de film (ni blanco ni tratamiento) y como control positivo se empleó una solución concentrada estándar de NPs de Ag preparada por reducción de AgNO<sub>3</sub> con citrato de sodio (aproximadamente 0,001 M en Ag).



**4.3.2. Efecto bactericida: Medida de la densidad óptica (600nm) <sup>(61)</sup>**

Esta estrategia consiste en sumergir los diferentes films (blancos y tratados) en diferentes alícuotas de solución bacteriana de *Escherichia coli* y observar los efectos de las NPs de Ag contenidas en los films mesoporosos tratados sobre la cinética de crecimiento bacteriano.

En primer lugar, se llevó a cabo un precultivo bacteriano. Teniendo en cuenta el volumen que se necesitará para llevar a cabo el experimento, se prepararon 3 tubos Eppendorf conteniendo cada uno de ellos 2 mL de medio LB y 100 µL de inóculo bacteriano, los cuales se dejaron incubar “*over night*” a 37°C con agitación constante a 180 rpm (Figura 9). Al día siguiente el precultivo se transfirió a un erlenmeyer conteniendo 200 mL medio LB, el cual se mantuvo a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 0,200 (inicio fase exponencial de crecimiento), proceso que llevó aproximadamente 3-4 horas.



**Figura 9. Esquema de la obtención del cultivo bacteriano.**

Una vez obtenida la solución bacteriana en plena fase exponencial de crecimiento, se distribuyó en múltiples erlenmeyer (20 mL cada uno). Se sumergió en cada erlenmeyer un único film (blanco o tratado) y se midió la absorbancia a 600 nm cada hora, durante un lapso de 5 horas. Entre cada medida se mantuvieron los erlenmeyer a 37°C y bajo agitación constante. A continuación se presenta un esquema del procedimiento aplicado (Figura 10):

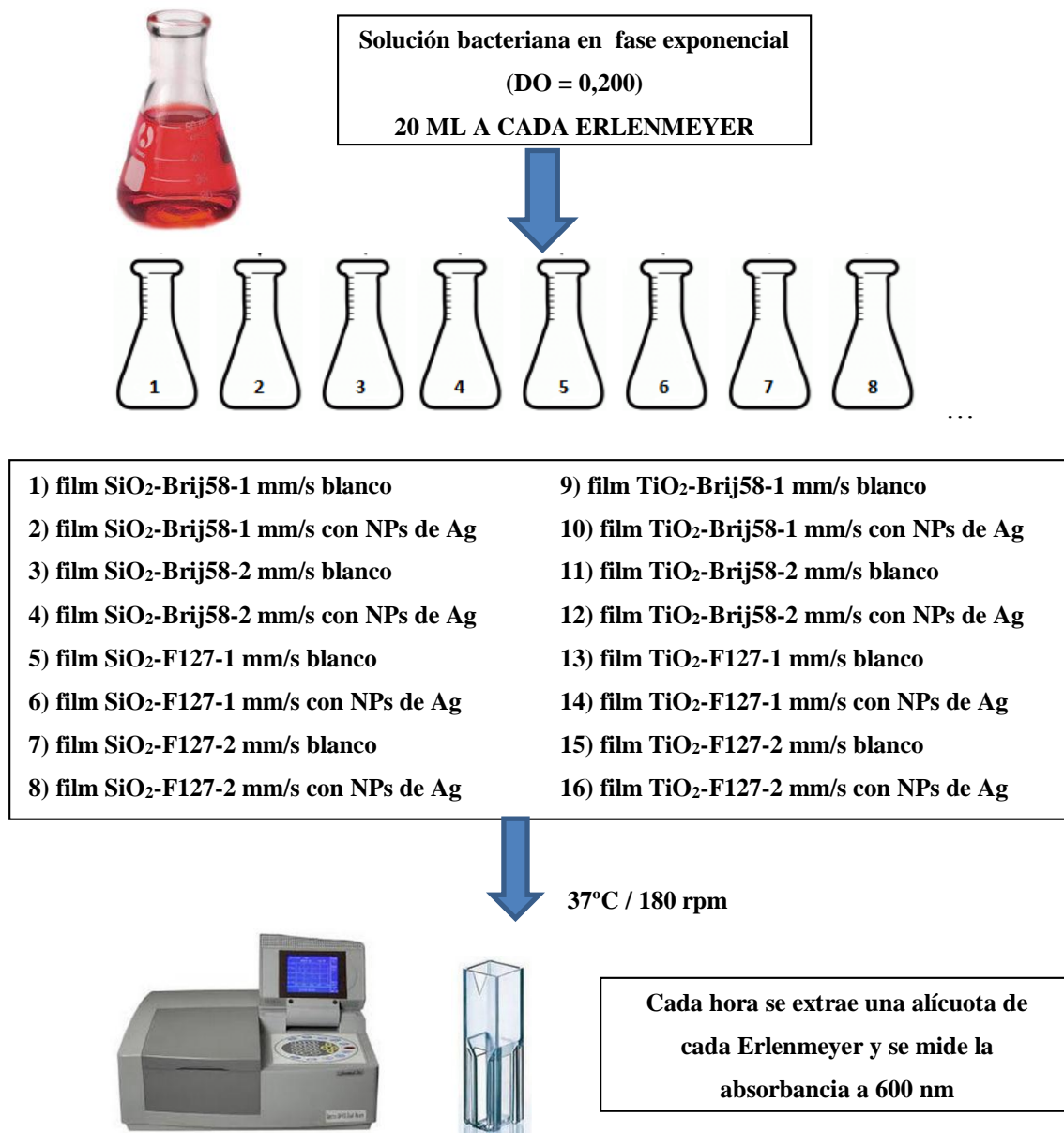
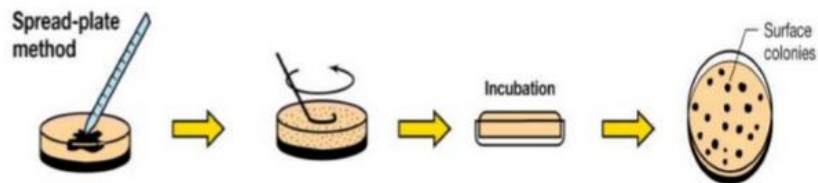


Figura 10. Esquema del procedimiento empleado para la medida de la absorbancia.

**4.3.2. Efecto bactericida: Recuento de colonias en placa <sup>(61)</sup>**

El recuento de colonias en placa es un método cuantitativo muy empleado en experimentos donde se pretende evaluar la cinética de crecimiento bacteriano. En primer lugar, se prepararon las placas de Petri donde se llevaron a cabo las siembras; la mezcla agar-LB se extrajo del autoclave, se dejó enfriar, se distribuyó en las diferentes placas y se mantuvieron bajo la cabina de flujo laminar hasta su solidificación. Luego se rotularon con los criterios correspondientes (tipo de film, dilución sembrada).

Este método se llevó a cabo en paralelo con la técnica anterior, es decir, de las alícuotas separadas para medir la absorbancia, se separó una porción para sembrarla en placa. Se sembraron diluciones seriadas al 1/10, es decir, se diluyeron 100 µl de la solución bacteriana tratada con film blanco o film tratado en 900 µl de medio LB. Se realizaron varias diluciones para determinar cuál sería la óptima que permitiera el recuento de colonias (UFC, unidades formadoras de colonias). Este procedimiento se llevó a cabo para los tiempos 1 y 5 (horas); para el tiempo 1 se sembraron diluciones 10<sup>-4</sup> y 10<sup>-5</sup>, mientras que para el tiempo 5 se sembraron diluciones 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup>. En todos los casos se sembró 100 µl de la dilución correspondiente en el centro y con la ayuda de un asa de siembra se esparció por toda la placa (Figura 11).



**Figura 11. Procedimiento de siembra en placa.**

Una vez sembradas las placas, se dejaron incubar en la estufa a 37°C durante 24 horas y se procedió a realizar el recuento de las colonias formadas, aplicando la formula siguiente:

$$\text{UFC/ml ó UFC/g} = \frac{\text{No. de colonias por placa} \times \text{el factor de dilución}}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$

### 4.3.3. Efecto bactericida: Incubación de films en placa (halo de lisis)

La incubación de los films en placa es un método cualitativo para evaluar el efecto bactericida de las NPs de Ag, puesto que se incuban directamente en placas de agar para divisar si se forma o no un halo de lisis alrededor del film. Se trata de un procedimiento similar a la incubación de antibióticos como se observa en la Figura 12:



**Figura 12. Formación de halos de lisis debido a la incubación con antibióticos<sup>(62)</sup>.**

Como en la técnica de recuento de colonias descrita en el apartado anterior, en primer lugar se prepararon las placas sobre las cuales se llevaron a cabo los ensayos. Una vez disponibles las placas, se sembró 100  $\mu\text{L}$  de solución bacteriana cuya absorbancia fue de aproximadamente 0,200 (fase exponencial de crecimiento) y diluida al  $10^{-6}$ . Finalmente se incubó el film blanco o film tratado en el centro, y se dejaron incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Caracterización de los films**

#### **5.1. Films mesoporosos: Estructura y espesores (SEM / elipsometría)**

Para el estudio de la estructura, se seleccionaron los films sintetizados con una velocidad de *dip coating* de 1 mm/s, ya que se espera, en base a resultados previos<sup>(1)</sup>, que los films preparados con el mismo sol presenten la misma estructura, independientemente de la velocidad de *dip coating* empleada. En la Figura 13 se presentan las imágenes obtenidas en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) de los films mesoporosos de SiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>.

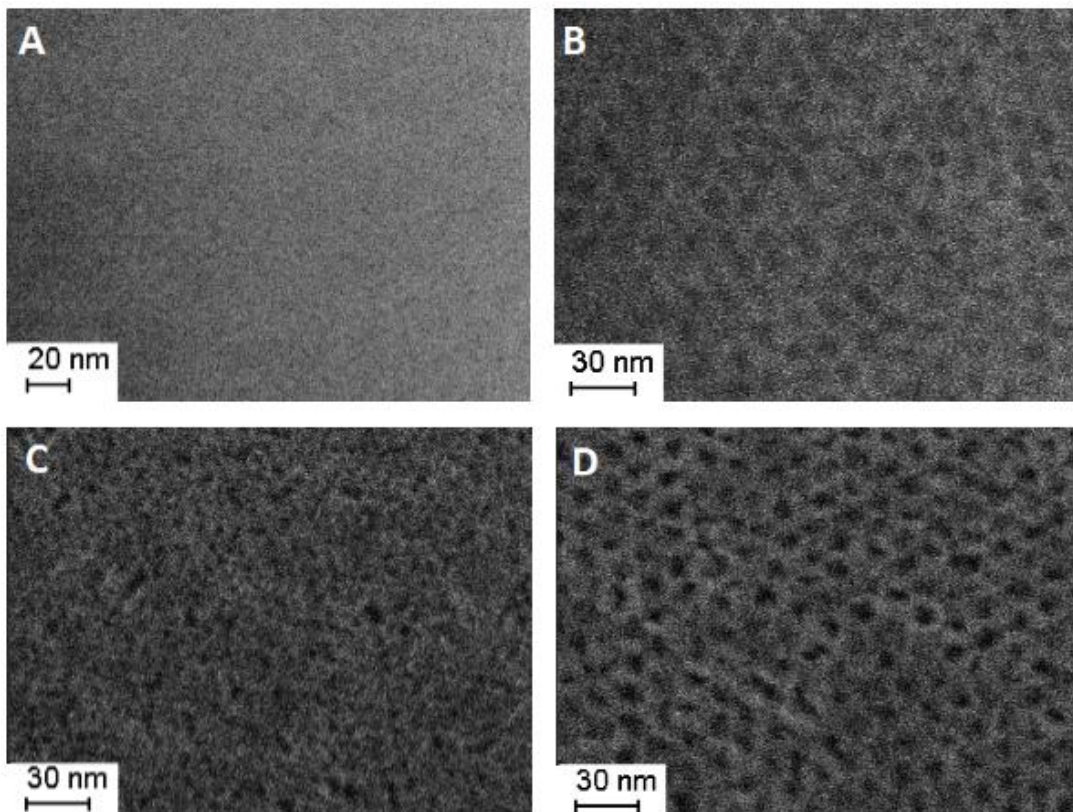


Figura 13. Imagen SEM de los films mesoporosos: A) SiO<sub>2</sub>-Brij58 Blanco, B) SiO<sub>2</sub>-F127 Blanco,

C) TiO<sub>2</sub>-Brij58 Blanco, D) TiO<sub>2</sub>-F127 Blanco

En todas las imágenes se puede observar arreglos ordenados de poros a lo largo de la superficie de los films. Además, se puede diferenciar el tamaño de los poros de los films preparados con Brij58 como agente moldeante (A y C) frente a los films preparados con F127 (B y D), siendo los primeros más pequeños que los segundos, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente por diversos grupos de investigación<sup>(1,2)</sup>.

En el caso de la medida de espesores, se seleccionaron los films sintetizados con una velocidad de *dip coating* de 1 y 2 mm/s, ya que los films preparados a mayores velocidades presentaban una menor calidad óptica (recubrimiento desparejo) A continuación se presenta una tabla con los resultados obtenidos para los diferentes films (Tabla 8):

FILM MESOPOROSOS	ESPESOR (nm)
SiO <sub>2</sub> -Brij58-1 mm/s	38 ± 2
SiO <sub>2</sub> -Brij58-2 mm/s	62 ± 3
SiO <sub>2</sub> -F127-1 mm/s	64 ± 1
SiO <sub>2</sub> -F127-2 mm/s	89 ± 2
TiO <sub>2</sub> -Brij58-1 mm/s	87 ± 1
TiO <sub>2</sub> -Brij58-2 mm/s	132 ± 2
TiO <sub>2</sub> -F127-1 mm/s	120 ± 4
TiO <sub>2</sub> -F127-2 mm/s	169 ± 3

**Tabla 8. Espesores de los films empleados en el presente trabajo.**

Se observa que, en todos los casos, los films resultaron más gruesos para la mayor velocidad de *dip coating* empleada, lo que coincide con lo esperado según la teoría. El espesor depende del balance entre la fuerza de adhesión del sol a la superficie y la fuerza de gravedad. Como resultado, el espesor resulta proporcional a la viscosidad del sol de partida y a la velocidad elevada a un valor que se encuentra entre 0.5 y 0.66, dependiendo del tipo de sol<sup>(1)</sup>. Además, se observa que los espesores son mayores para los films de TiO<sub>2</sub> que para los de SiO<sub>2</sub>, debido a que los soles de titanio presentan mayor viscosidad que los soles de Si<sup>(2)</sup>.

*En base a estos resultados queda claro que la síntesis de films mesoporosos se realizó de forma exitosa y se obtuvieron films con la estructura porosa esperada.*

## 5.2. Films cargados con NPs de Ag

### 5.2.1. Bandas plasmónicas: Espectroscopía UV-visible

Como se mencionó en la metodología, en las primeras etapas del trabajo se desarrollaron pruebas experimentales para determinar qué condiciones (concentración  $\text{AgNO}_3$  y tiempo de inmersión) se emplearían para las pruebas definitivas. En base a los resultados obtenidos y a resultados previos del grupo<sup>(2)</sup>, para la evaluación del efecto bactericida se estableció emplear una concentración de  $\text{Ag}^+$  0,2 M para films de silicio y 0,005 M para films de titanio, todos con una velocidad de *dip coating* de 1 y 2 mm/s y ensayar a tiempos de impregnación de entre 10 y 30 minutos. En las Figuras 14 y 15 se muestra el aspecto de algunos de los films obtenidos.

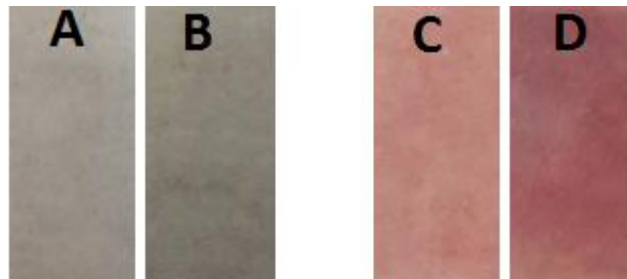
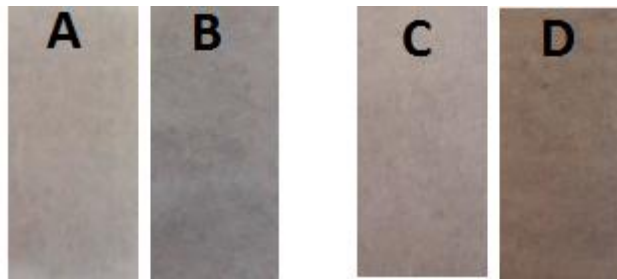


Figura 14. Imagen de films impregnados con NPs de Ag durante 10 minutos:

(A) Film de  $\text{SiO}_2$ -Brij58-1 mm/s, B) Film de  $\text{SiO}_2$ -Brij58-2 mm/s

(C) Film de  $\text{SiO}_2$ - F127-1 mm/s, D) Film de  $\text{SiO}_2$ -F127-2 mm/s





**Figura 15. Imagen de films impregnados con NPs de Ag durante 10 minutos:**

**(A) Film de TiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s, (B) Film de TiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s**

**(C) Film de TiO<sub>2</sub>- F127-1 mm/s, (D) Film de TiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s**

A medida que los films eran sometidos a mayor tiempo de impregnación se observó cómo iban adoptando una coloración más notoria, sinónimo de una mayor incorporación de NPs de Ag en los poros del film. Este efecto también se observa al aumentar la velocidad de *dip coating* lo que indica que los films preparados a mayor velocidad, es decir, los más gruesos (ver sección 5.1.), son capaces de incorporar mayor cantidad de NPs de Ag.

Finalmente, es importante notar que la coloración de los films es pareja, indicando que el llenado con NPs de Ag es parejo a lo largo de todo el recubrimiento.

Para corroborar lo observado a simple vista, los diferentes films tratados se caracterizaron mediante Espectroscopia UV-visible para estudiar las bandas plasmónicas propias de las NPs de Ag. En las figuras 16 al 23 se muestran los espectros obtenidos, en función del tiempo de impregnación de los films con la solución de plata / formaldehído:



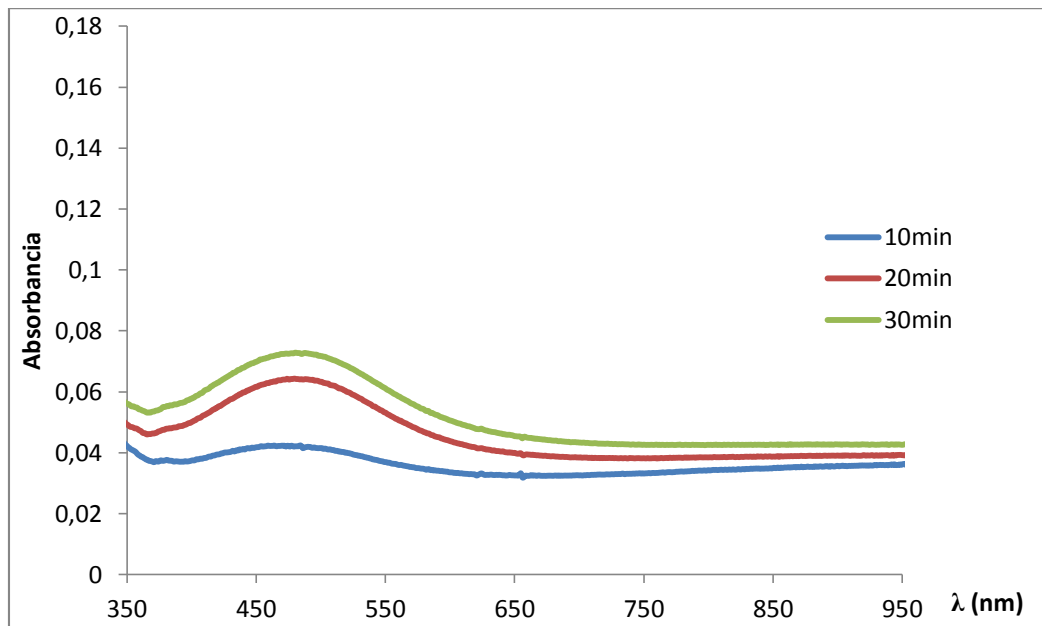


Figura 16. Espectro de absorción de film SiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s

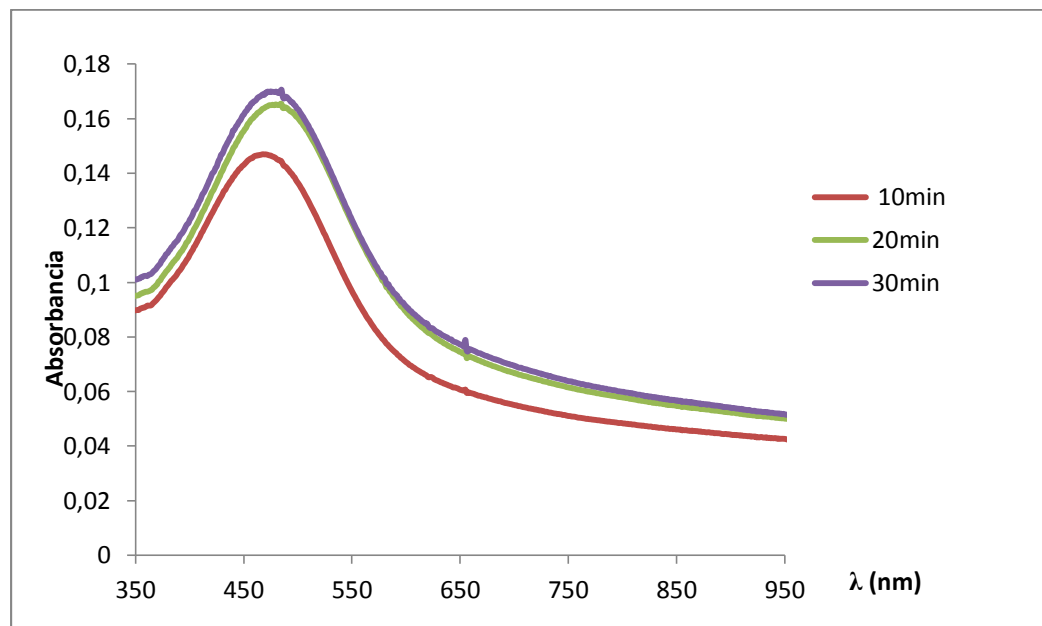


Figura 17. Espectro de absorción de film SiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s

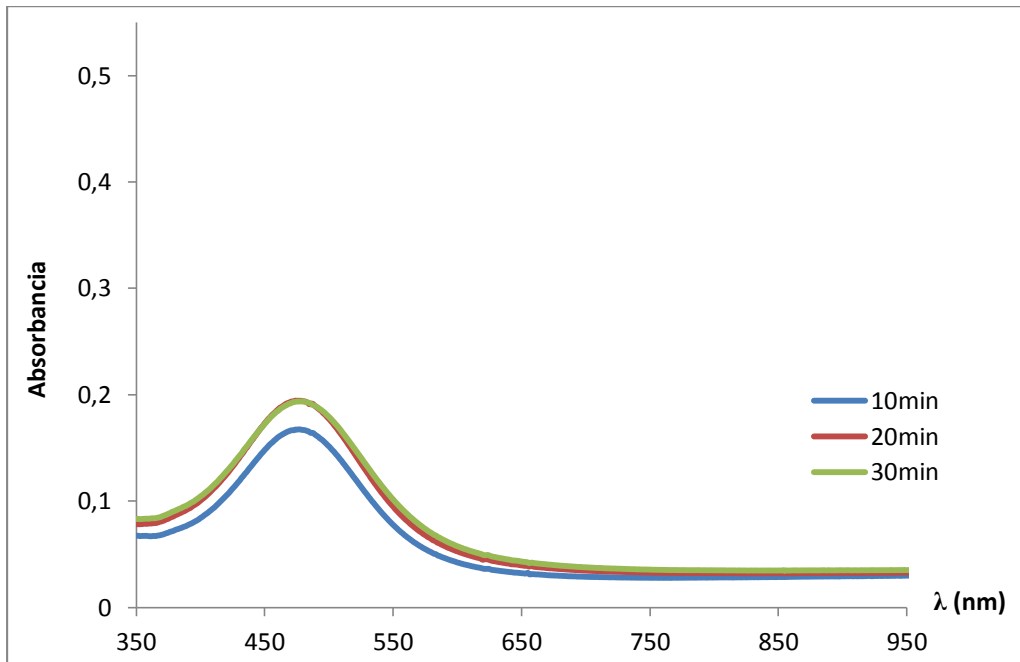


Figura 18. Espectro de absorción de film SiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s

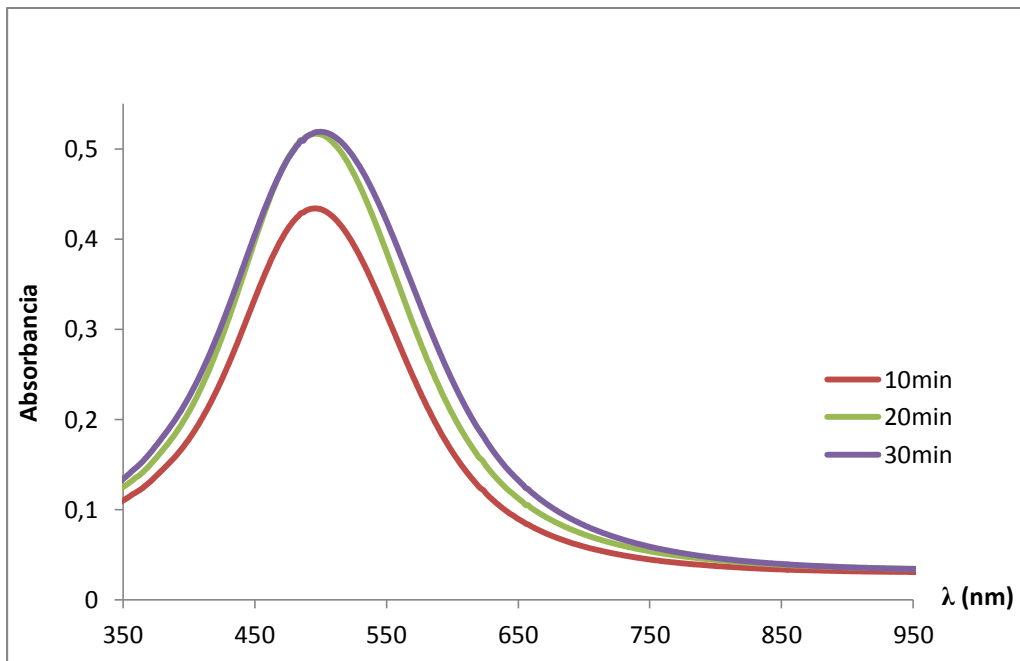


Figura 19. Espectro de absorción de film SiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s

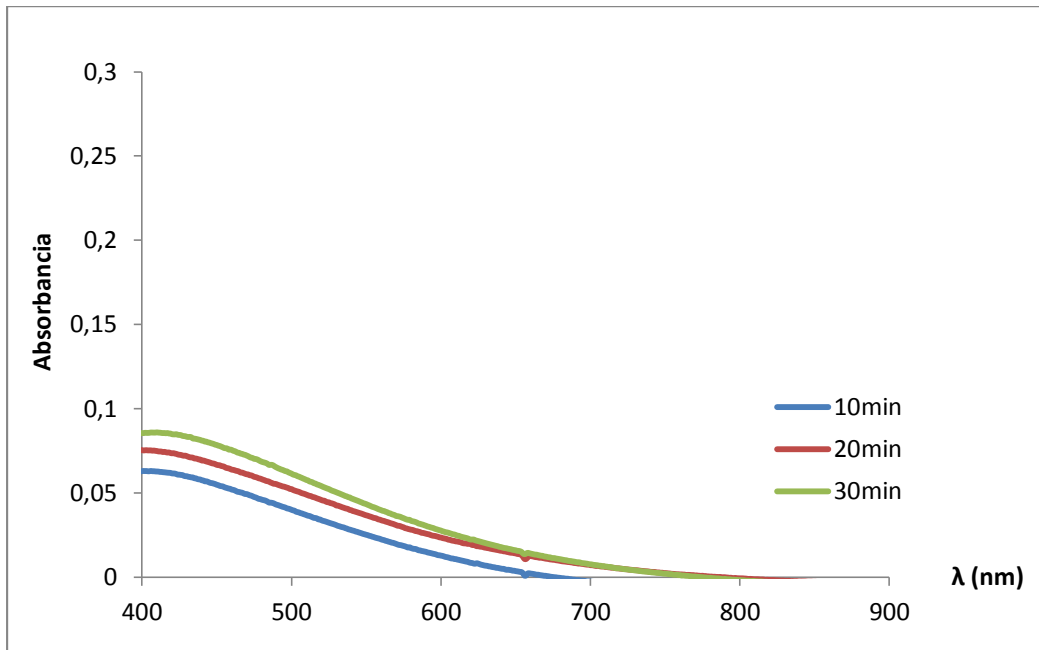


Figura 20. Espectro de absorción de film TiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s

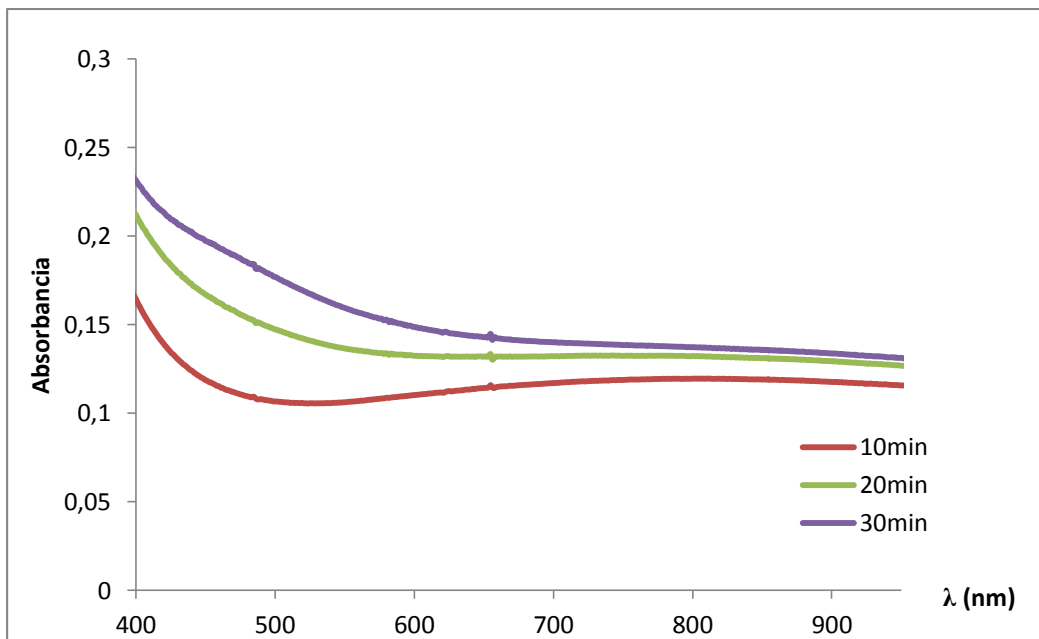


Figura 21. Espectro de absorción de film TiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s

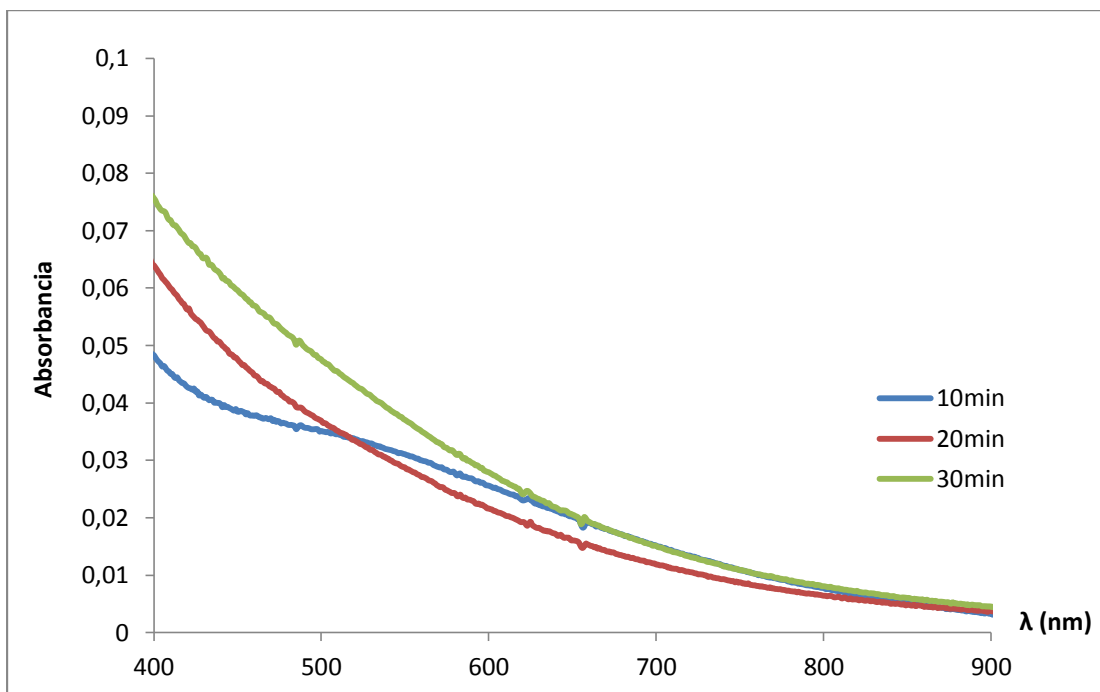


Figura 22. Espectro de absorción de film TiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s

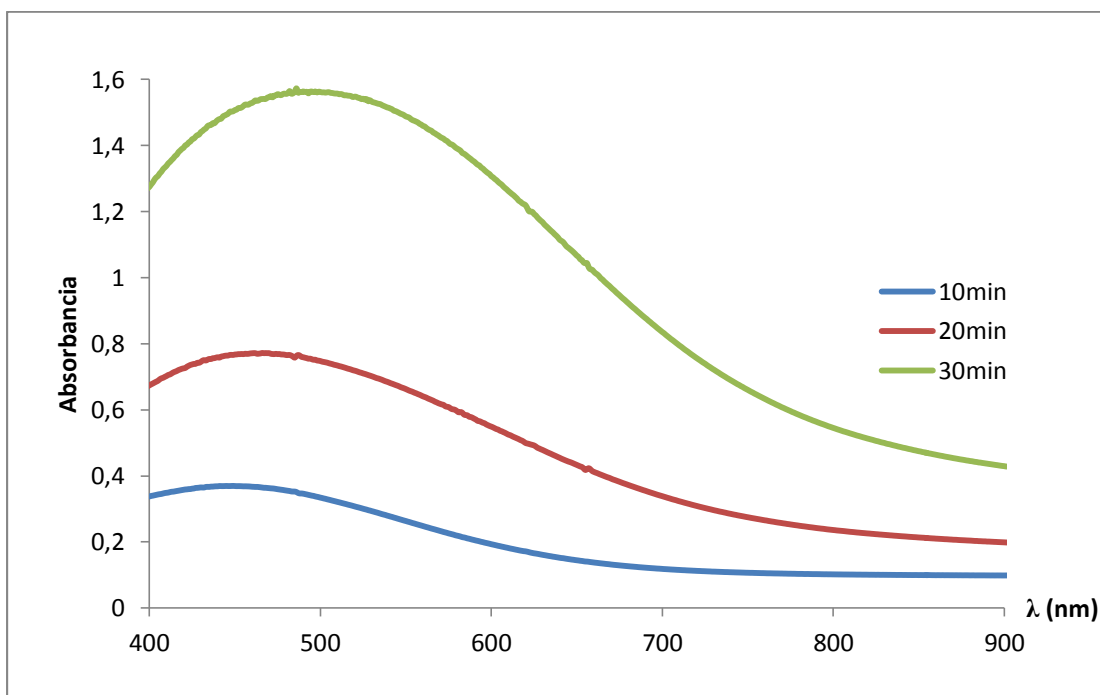
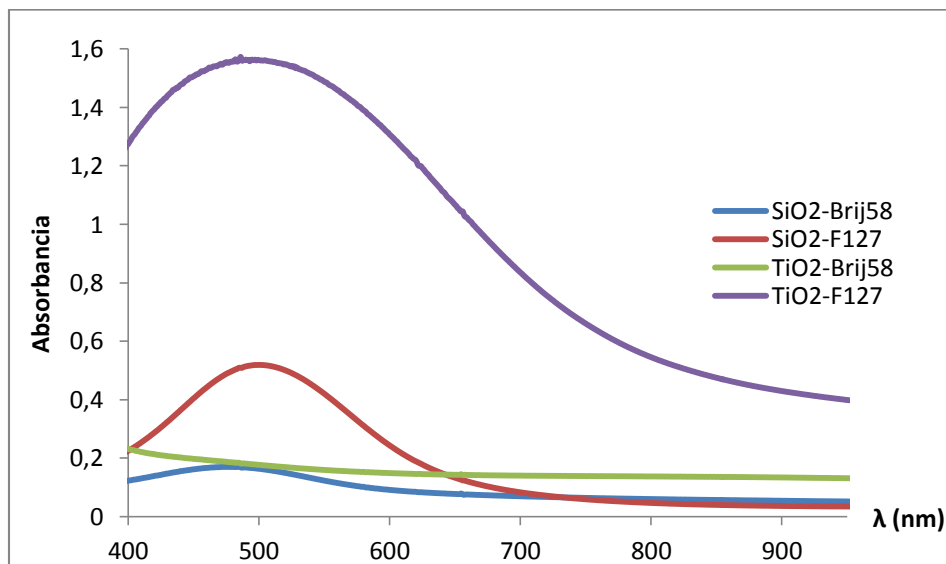


Figura 23. Espectro de absorción de film TiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s

En todas las gráficas se puede divisar cómo alrededor de los 400-600 nm de longitud de onda aparecen las bandas plasmónicas características de las NPs de Ag. En todos los casos, la banda aumenta su intensidad medida que aumenta el tiempo de reacción. Este efecto está relacionado con la formación de mayor cantidad de partículas. Además, en algunos casos se observa que la banda plasmónica se ensancha al aumentar el tiempo de reacción, indicando una mayor cercanía e interacción entre las partículas formadas.

Al comparar los espectros para el mismo tipo de film con dos espesores distintos (por ejemplo, Figura 16 vs Figura 17) se observa que aquellos films sintetizados con una mayor velocidad de *dip coating* (es decir, más gruesos) presentan la banda plasmónica con mayor intensidad (absorbancias mayores). Esto indica que se han formado mayor cantidad de nanopartículas en los films más gruesos, confirmando lo observado a simple vista.

Para poder divisar de una forma más clara las diferencias entre los films sintetizados, en la Figura 24 se presenta una comparación que incluye los films preparados con una velocidad de *dip coating* 2 mm/s y un tiempo de impregnación con NPs de Ag igual a 30 minutos.



**Figura 24. Comparación de espectros de absorción de las diferentes variantes de films preparados (*dip coating* = 2 mm/s ; tiempo de impregnación = 30 minutos)**

Por último, es interesante notar que, en general, los films de  $\text{SiO}_2$  presentan una menor coloración a simple vista y una menor intensidad de la banda plasmónica que los de  $\text{TiO}_2$ . Esto indica que los últimos han incorporado mayor cantidad de NPs de Ag que los primeros, o que puede deberse tanto a que presentan mayor espesor como a la mayor afinidad de la Ag por el  $\text{TiO}_2$  (ver más adelante) <sup>(2)</sup>.

### 5.2.2. Caracterización de films cargados con NPs de Ag

Los films cargados con NPs de Ag ( $[AgNO_3] = 0,2M$  para  $SiO_2$ ;  $[AgNO_3] = 0,005M$  para  $TiO_2$ ; velocidad de *dip coating* = 1 mm/s) también fueron estudiados mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) para detectar y corroborar la incorporación de las nanopartículas en el film mesoporoso. En la Figura 25 se presentan algunas de las imágenes obtenidas.

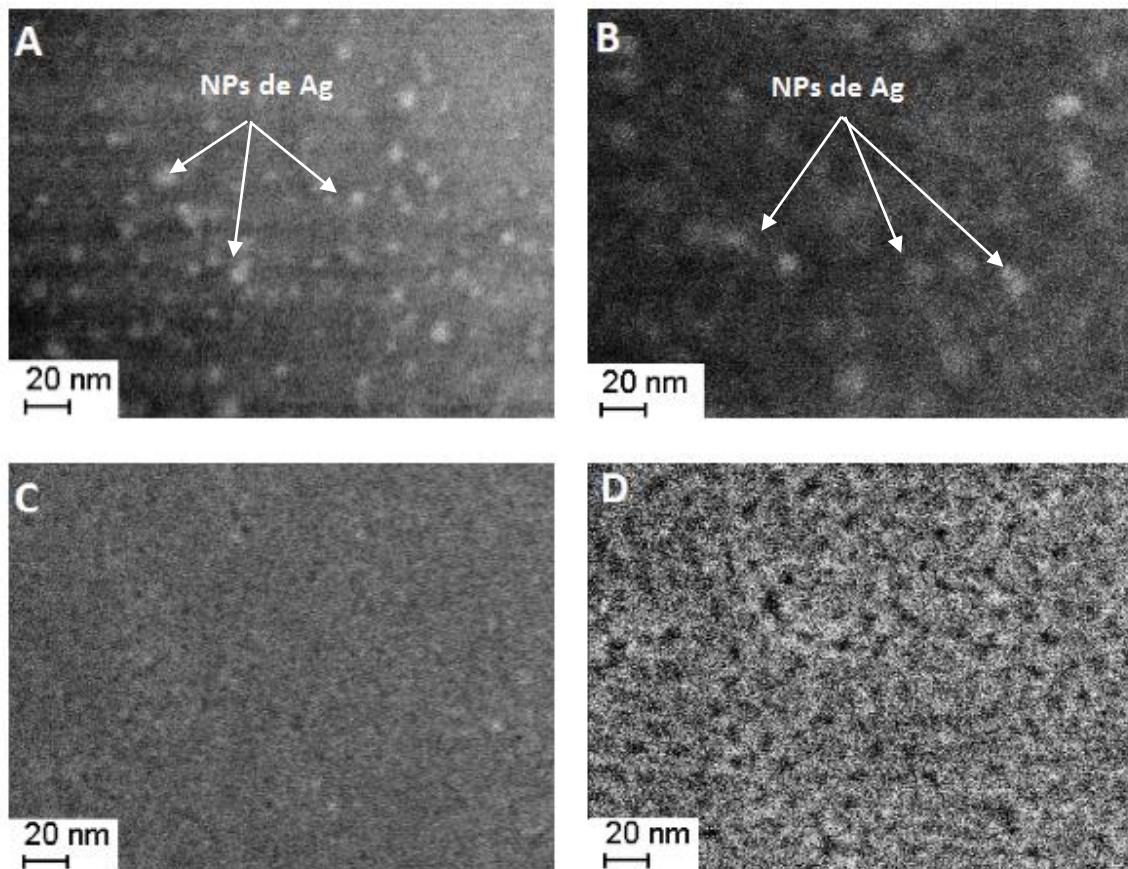


Figura 25. Imagen SEM del film: A)  $SiO_2$ -Brij58 con NPs de Ag, B)  $SiO_2$ -F127 con NPs de Ag, C)  $TiO_2$ -Brij58 con NPs de Ag, D)  $TiO_2$ -F127 con NPs de Ag

Para el caso de los films de  $SiO_2$  (Figuras A y B) se pueden observar claramente la presencia de puntos brillantes, que pueden asociarse con la presencia de las NPs de Ag,

mientras que para los films de TiO<sub>2</sub> (Figuras C y D) no se detecta brillo a simple vista. Esto puede deberse a que el peso molecular del SiO<sub>2</sub> permite un mayor contraste frente a las NPs de Ag, en comparación con el TiO<sub>2</sub>. Además, se debe tener en cuenta que las nanopartículas se alojan en el interior de los poros y no están presentes en la superficie, lo cual sería otra razón que dificultaría su detección y visualización.

### 5.2.3. Relación Ag/Si y Ag/Ti: Espectroscopia de Rayos X Dispersiva en Energía (EDS)

Mediante la técnica EDS se estudió la relación Ag/Si y Ag/Ti de los films sintetizados ([AgNO<sub>3</sub>] = 0,2M para SiO<sub>2</sub>; [AgNO<sub>3</sub>] = 0,005M para TiO<sub>2</sub>; velocidad de *dip coating* = 1 mm/s).

Para cada film se tomaron al menos 3 mediciones, seleccionando diferentes regiones de los mismos. Como información, el espectrómetro nos brinda espectros donde se pueden divisar los diferentes elementos detectados, por ejemplo, para el caso particular del film de TiO<sub>2</sub>-F127, el mapa nos indica la presencia de titanio (film mesoporoso), plata (NPs de Ag incorporadas) y calcio (componentes del vidrio) (Figura 26).

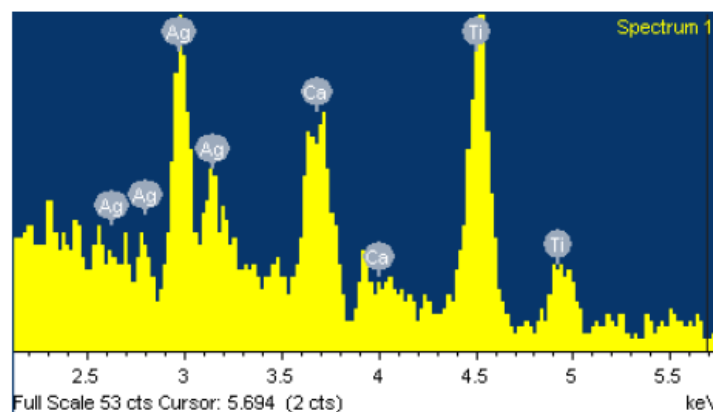


Figura 26. Espectro EDS del film TiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s.



Además, aplicando esta técnica es posible calcular la relación molar entre dos elementos diferentes (relación Ag/Si y Ag/Ti, en este caso). Los valores promedio obtenidos de las diferentes mediciones se presentan en la Tabla 9.

<b>Films mesoporoso</b>	<b>Promedio relación Ag/Si</b>
SiO <sub>2</sub> -Brij58	0,08
SiO <sub>2</sub> -F127	0,10
<b>Films mesoporoso</b>	<b>Promedio relación Ag/Ti</b>
TiO <sub>2</sub> -Brij58	0,57
TiO <sub>2</sub> -F127	0,43

**Tabla 9. Resultados obtenidos mediante la técnica EDS.**

En primer lugar, los resultados permiten determinar nuevamente que las NPs de Ag se incorporaron satisfactoriamente en los films mesoporosos, tanto de SiO<sub>2</sub> como de TiO<sub>2</sub>. Se observa, además, que los films de TiO<sub>2</sub> incorporan más Ag que los de SiO<sub>2</sub>, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en el grupo<sup>(2)</sup> y con lo observado mediante espectroscopia UV-visible. Esto se debe a que el titanio cataliza la reducción de la Ag<sup>+</sup> a Ag<sup>0</sup> (el formaldehído se oxida a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O) durante la síntesis de las NPs de Ag, haciéndola mucho más efectiva.

Por otro lado, al comparar los dos agentes moldenates para un mismo óxido no se observan grandes diferencias en la relación de plata:metal. Esto se debe a que la relación Ag/Si o Ag/Ti no depende del tamaño de poro, sino de la superficie específica de cada óxido, que es aproximadamente la misma para ambos tamaños<sup>(1)</sup>.

Finalmente, es importante notar que mediante EDS se corrobora lo observado mediante espectroscopia: todas las regiones medidas presentan una relación Ag/metal similares, lo que indica la existencia de homogeneidad a lo largo de todo el film. Esto permitirá, más adelante, poder cortar el soporte (film blanco o film tratado) en trozos más pequeños para realizar los ensayos de efecto bactericida.

### **5.3. Efecto bactericida: Medida de la absorbancia (600nm)**

Como se mencionó en apartados anteriores, para la evaluación del efecto bactericida se estableció emplear films cargados con Ag durante 10 minutos, utilizando una concentración de  $\text{Ag}^+$  0,2 M para films de silicio y 0,005 M para films de titanio. Para este primer método se emplearon films sintetizados con una velocidad de *dip coating* de 1 y 2 mm/s (films de 4 mm/s descartados por falta de homogeneidad).

Un aspecto importante en todo experimento científico es el empleo de diversos controles para luego poder extraer conclusiones verídicas. Como control negativo se empleó la solución bacteriana de *Escherichia coli* sin ningún tipo de film, como blancos se utilizaron los films de  $\text{SiO}_2$  y  $\text{TiO}_2$  sin funcionalizar, y como control positivo se usó una solución concentrada coloidal de NPs de Ag (aproximadamente 0,001 M), la cual se obtuvo mediante una reacción “*bottom up*” en fase homogénea que implica la reducción de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) con citrato de sodio. Cabe destacar que, si bien el control positivo ideal sería aquel cuya concentración de NPs de Ag fuese similar al presente en los films (permitiría comparar los efectos de las NPs de Ag en solución frente a aquellas incorporadas en films mesoporosos), se hace muy difícil estimar este último dato, es por ello que empleamos el control positivo que mencionamos, el cual demostrará que efectivamente la plata presenta propiedades antimicrobianas.

Para cada film (blanco o tratado), tanto de  $\text{SiO}_2$  como de  $\text{TiO}_2$ , se llevaron a cabo experimentos por duplicado, es decir, se repitieron 2 veces bajo las mismas condiciones, a fin de reforzar los resultados obtenidos. Mediante el empleo del programa estadístico “*Graph Pad*” se llevó a cabo el análisis de la significancia de los resultados obtenidos y se obtuvieron los resultados mostrados en las Figuras 27 al 31.

NS	$p > 0,05$
*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$

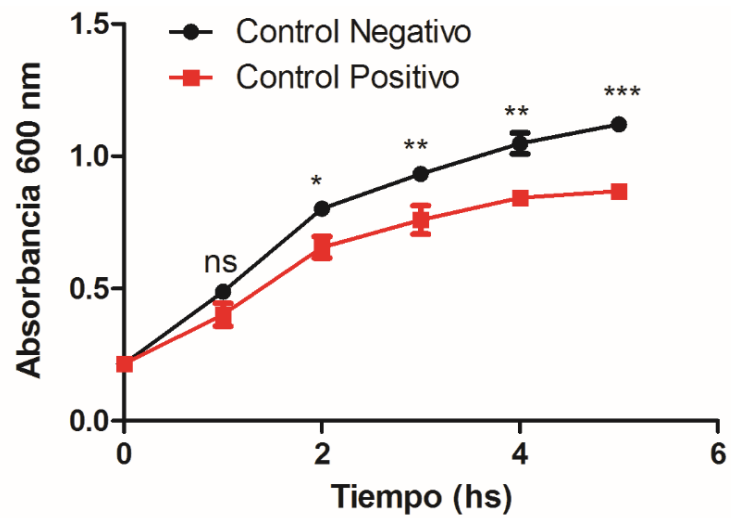


Figura 27. Efecto bactericida: Control negativo vs Control positivo

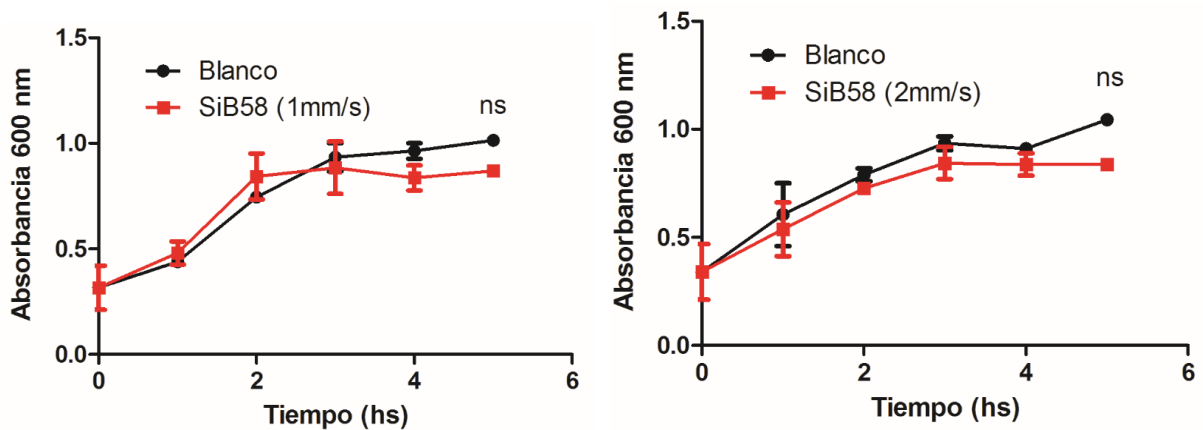


Figura 28. Efecto bactericida: (A) SiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s-Ag vs (B) SiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s-Ag

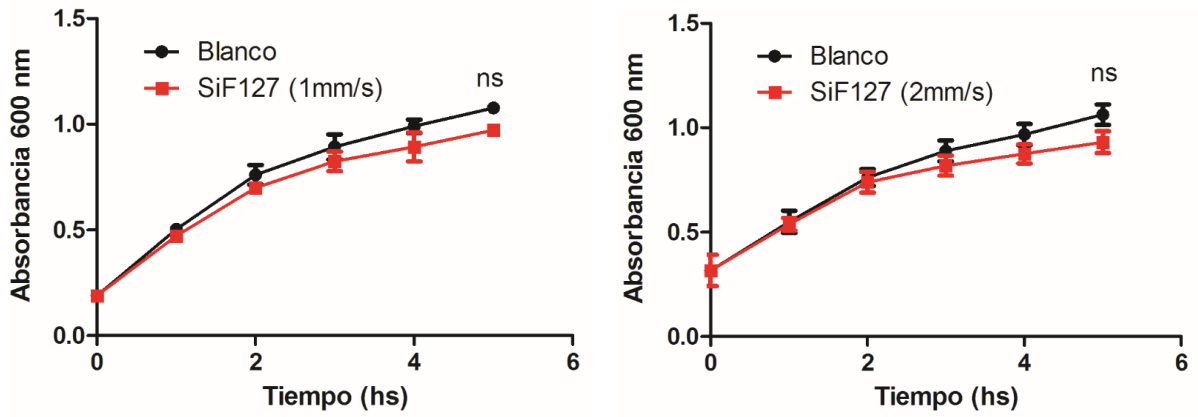


Figura 29. Efecto bactericida: SiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s-Ag vs SiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s-Ag

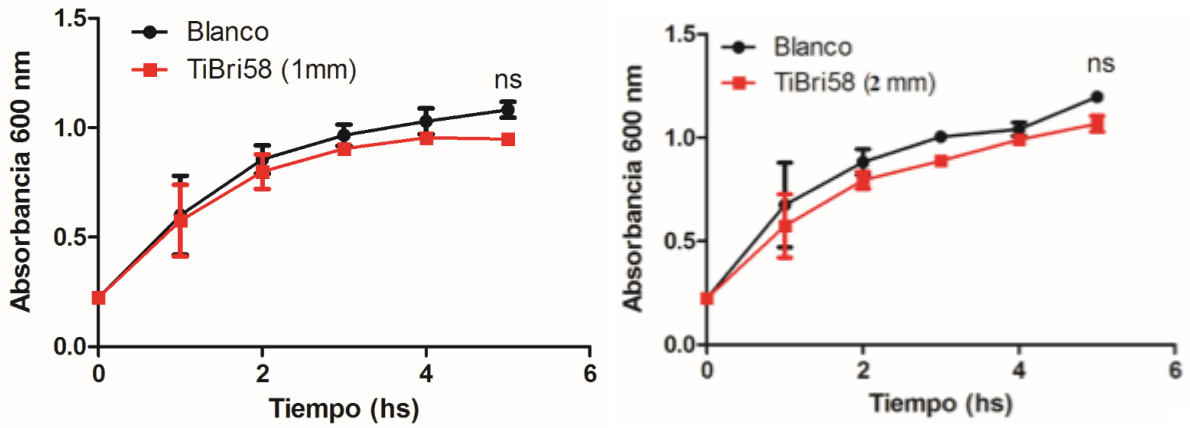


Figura 30. Efecto bactericida TiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s-Ag vs TiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s-Ag

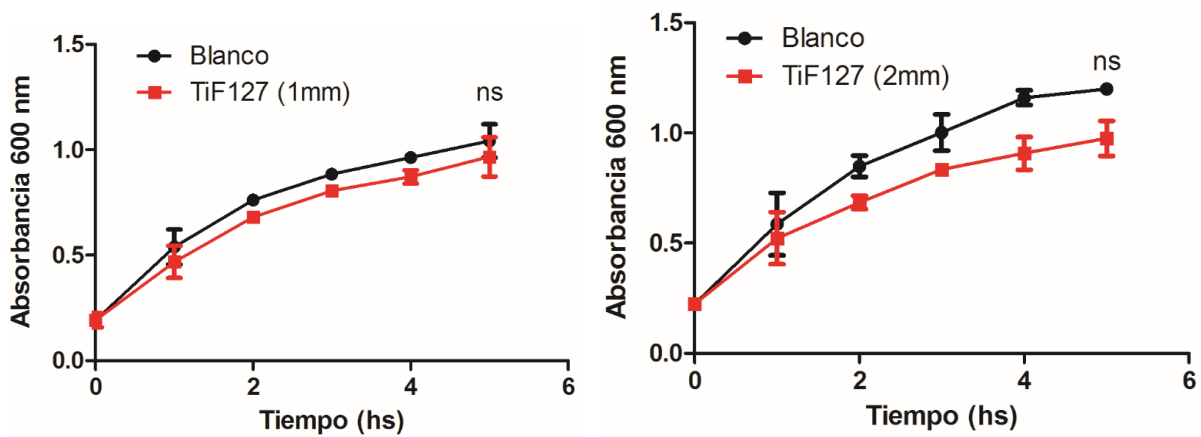
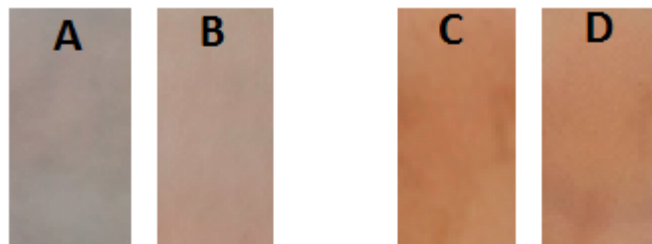


Figura 31. Efecto bactericida TiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s-Ag vs TiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s-Ag

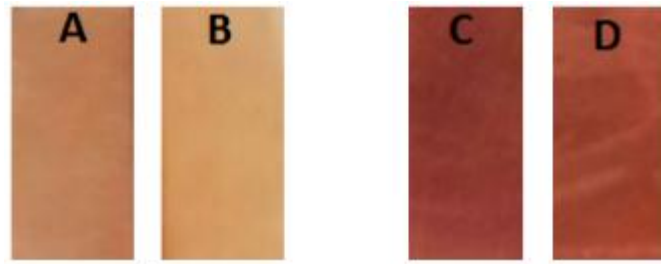
En primer lugar, se obtienen diferencias significativas entre el control negativo y control positivo (Figura 27), con lo que se puede afirmar que la solución coloidal de NPs de Ag empleada afecta la cinética de crecimiento bacteriano, reduciendo el número de bacterias a medida que transcurre el tiempo.

Al analizar las comparaciones entre los films blancos y tratados (Figuras 28 al 31), si bien se pudo observar que los films con NPs de Ag produjeron una ligera disminución del crecimiento a lo largo del tiempo en comparación con los films blancos, pero estas diferencias no arrojaron una significancia estadística aceptable ( $p > 0,005$  para todos los puntos medidos). Por lo tanto no fue posible, mediante este método, determinar con significancia estadística que las NPs de Ag estuvieran ejerciendo su efecto bactericida.

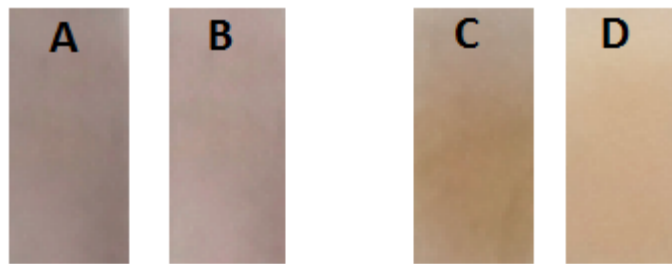
Por otro lado, es interesante destacar que a medida que transcurría el tiempo de incubación del film en la solución bacteriana, pudo observarse cómo éste iba perdiendo su coloración original, indicador de que se produce la difusión de las NPs de Ag del film hacia el cultivo bacteriano (Figuras 32 al 35). En todos los casos los films A y C corresponden a films intactos, mientras que los films B y D muestran los efectos tras la incubación de éstos con la solución bacteriana.



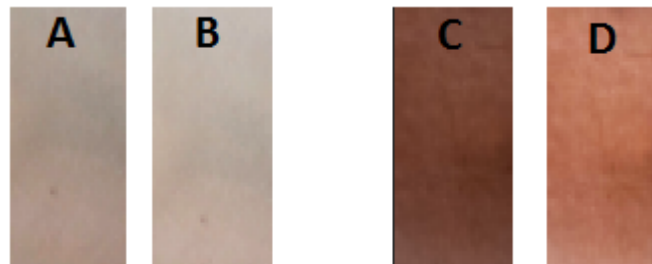
**Figura 32. Estado de los films tras 5 horas de incubación en la solución bacteriana:  
SiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s (A y B) y SiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s (C y D)**



**Figura 33. Estado de los films tras 5 horas de incubación en la solución bacteriana:  
SiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s (A y B) y SiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s (C y D)**



**Figura 34. Estado de los films tras 5 horas de incubación en la solución bacteriana:  
TiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s (A y B) y TiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s (C y D)**



**Figura 35. Estado de los films tras 5 horas de incubación en la solución bacteriana:  
TiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s (A y B) y TiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s (C y D)**

Esta pérdida de color del film no influyó en el color de la solución bacteriana, la cual fue adoptando una mayor turbidez a medida que pasaba el tiempo debido estrictamente al crecimiento de las bacterias. A las 24 horas de incubación se observó la pérdida total de la coloración del film, debida a la disolución de éste y de las nanopartículas en la solución.

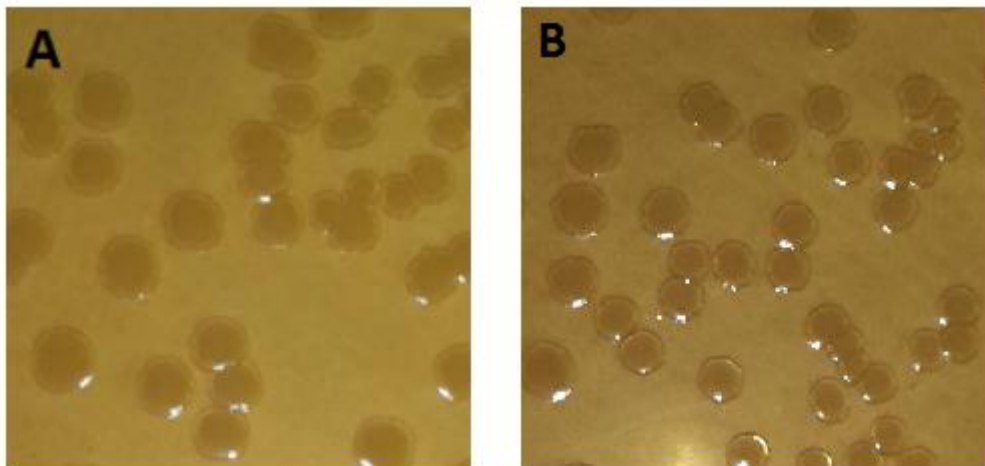
Estos resultados son muy interesantes en vistas a la posible aplicación de estos films como recubrimientos descartables de liberación progresiva de NPs de Ag.

#### **5.4. Efecto bactericida: Recuento de colonias en placa**

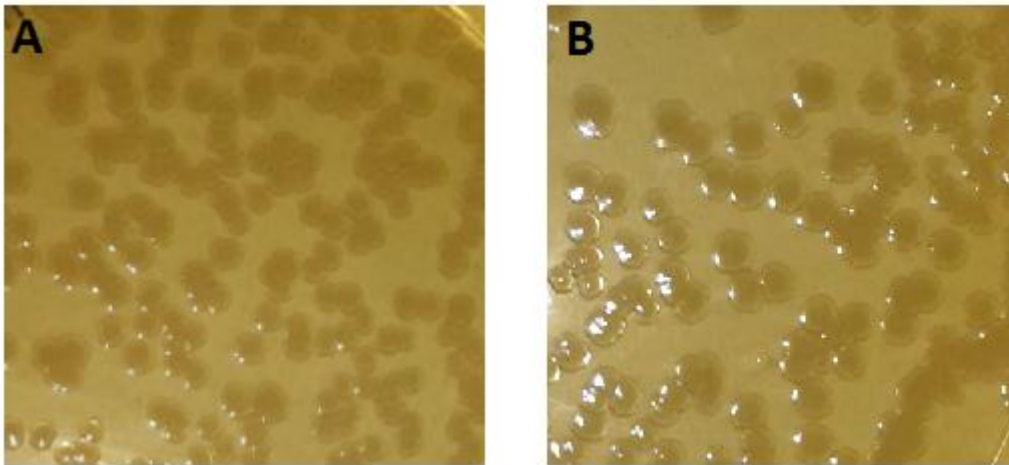
En estos experimentos, asociados a los experimentos descriptos en el apartado anterior, no se observaron resultados satisfactorios ya que surgieron inconvenientes que afectaron a todas las placas que se sembraron para llevar a cabo el recuento de colonias bacterianas. En particular:

- 1) Las diluciones empleadas dieron una alta cantidad de bacterias sobre las placas, lo que imposibilitó el recuento de colonias.
- 2) A simple vista no se observaron diferencias significativas entre placas sembradas con film blanco y placas sembradas con film tratado, ni tampoco entre diferentes tiempos de incubación en el caso de los films tratados con NPs de Ag.

A continuación se presentan algunos de los resultados obtenidos (Figuras 36 y 37).



**Figura 36. (A) Siembra en placa de dilución  $10^{-5}$  de solución con film tratado  $\text{SiO}_2\text{-F127-1 mm/s}$ :  
(A) Tiempo 1 y (B) Tiempo 5**



**Figura 37. (A) Siembra en placa de dilución  $10^{-5}$  de solución con film tratado  $\text{TiO}_2\text{-F127-1 mm/s}$ :  
 (B) Tiempo 1 y (B) Tiempo 5**

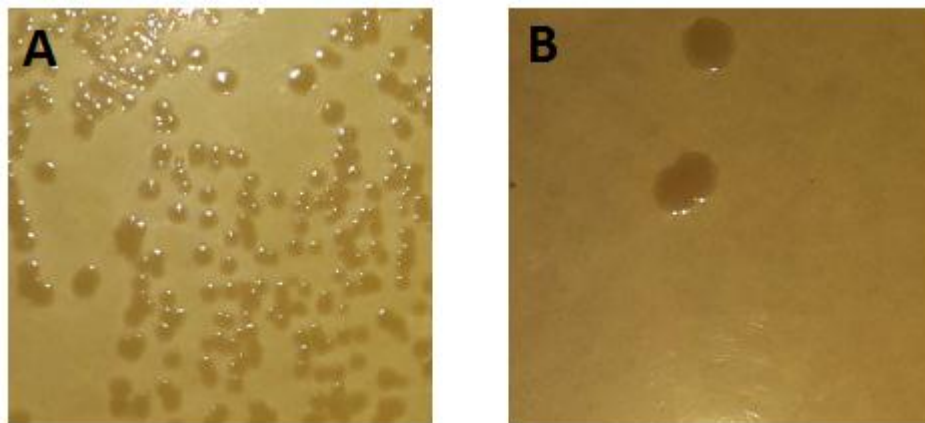
Teniendo en cuenta los resultados poco concluyentes que se obtuvieron y para evitar el malgasto de materiales (tener en cuenta que los experimentos se realizaron por duplicado), se decidió dejar de lado este método de evaluación y proseguir con la incubación directa de films en placa para observar la aparición de halo de lisis alrededor de los films cargados con NPs de Ag.



**5.5. Efecto bactericida: Incubación de films en placa (halo de lisis)**

En base a los resultados poco concluyentes de las medidas de densidad óptica y a los inconvenientes durante el procedimiento de recuento de colonias en placas, se decidió llevar a cabo un tercer método para evaluar el efecto antimicrobiano de los films cargados con NPs de Ag. Este método consiste en incubarlos directamente en placas de agar para observar si se produce o no la formación de un halo de lisis alrededor de éstos. Como en el método anterior, para cada film se ensayaron dos experimentos bajo las mismas condiciones (por duplicado).

Al comparar los controles, se observa claramente como la solución concentrada de NPs de Ag (control +) ejerce un potente efecto bactericida sobre la cepa *Escherichia coli* tras 24hs de incubación a 37°C (Figura 38).



**Figura 38. (A) Control Negativo vs (B) Control Positivo**

En cuanto a los films de SiO<sub>2</sub> y TiO<sub>2</sub>, a continuación se presentan los resultados obtenidos:

5.5.1. Resultados para films SiO<sub>2</sub> (Figuras 39 al 40):

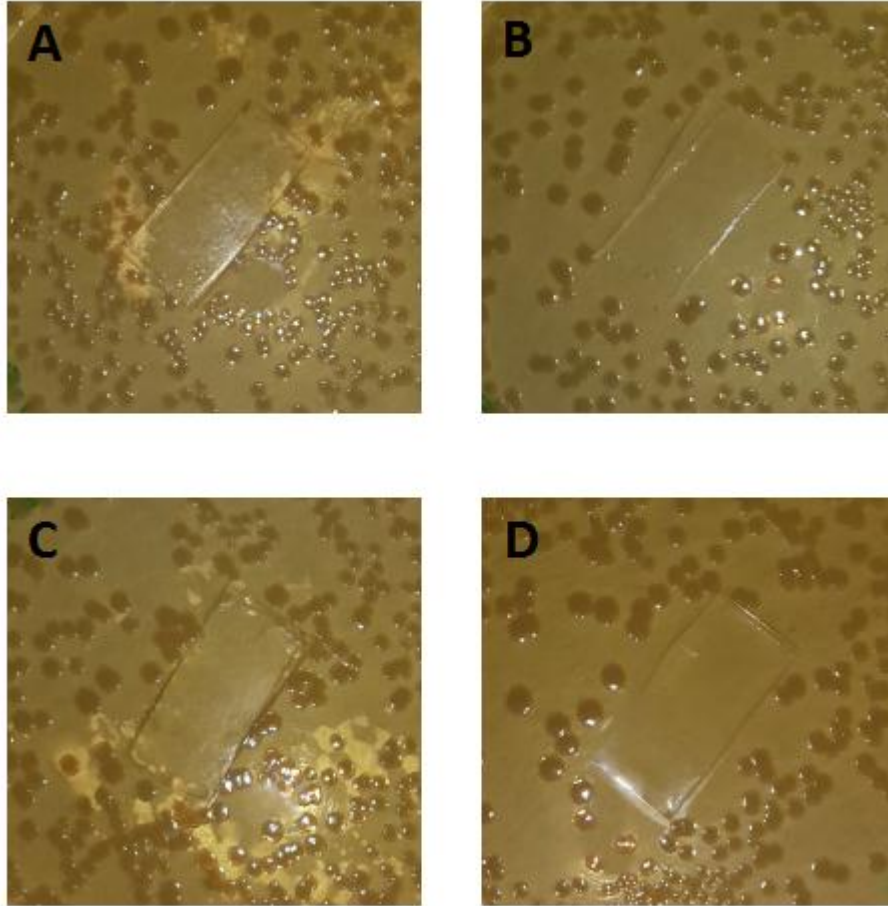
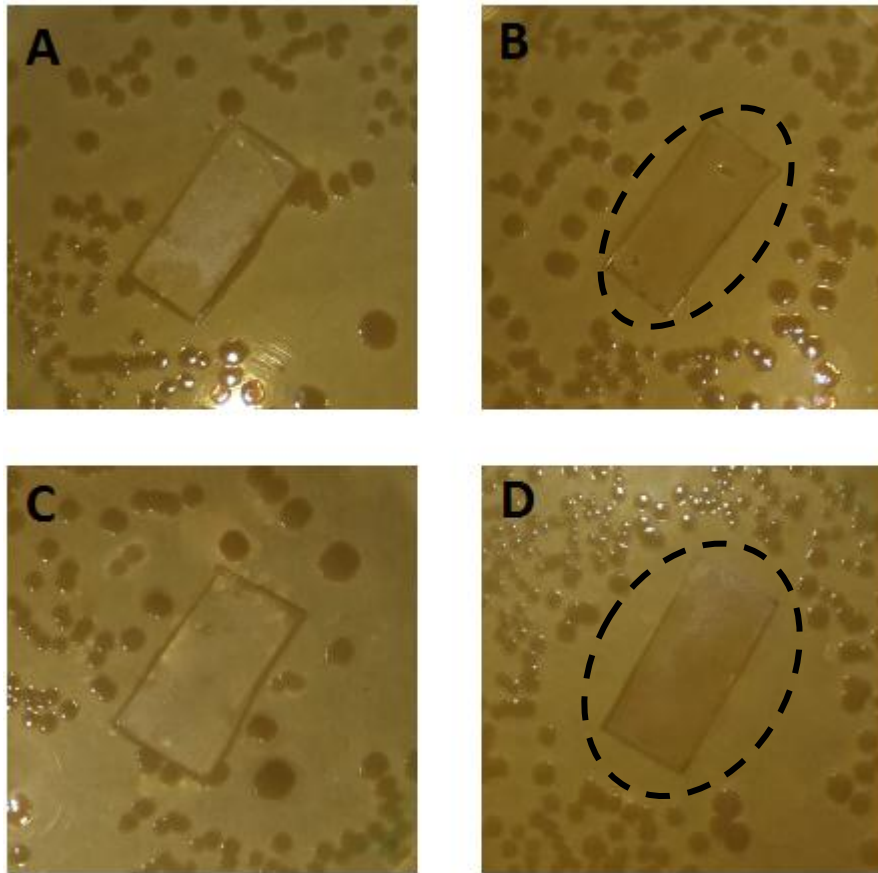


Figura 39. (A) Film blanco SiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s vs (B) Film SiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s con NPs de Ag  
(C) Film blanco SiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s vs (D) Film SiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s con NPs de Ag

En el caso de los films SiO<sub>2</sub> preparados con el agente moldeante Brij58 (Figura 39), ninguna velocidad de *dip coating* reportó la formación del halo de lisis (B y D), es decir, no se obtuvieron diferencias frente a sus respectivos blancos (A y C). Si bien se pudo confirmar la incorporación de NPs de Ag en estos films (presencia de banda plasmónica y de coloración a simple vista), probablemente la cantidad de Ag incorporada no haya sido suficiente. Algunas de las razones que explican estos resultados son: presentan el menor espesor en comparación con el resto de films y la relación Ag/Si también resulta ser la más baja. En resumen, son los films con menor cantidad de NPs de Ag, lo que impidió la formación del halo de lisis.

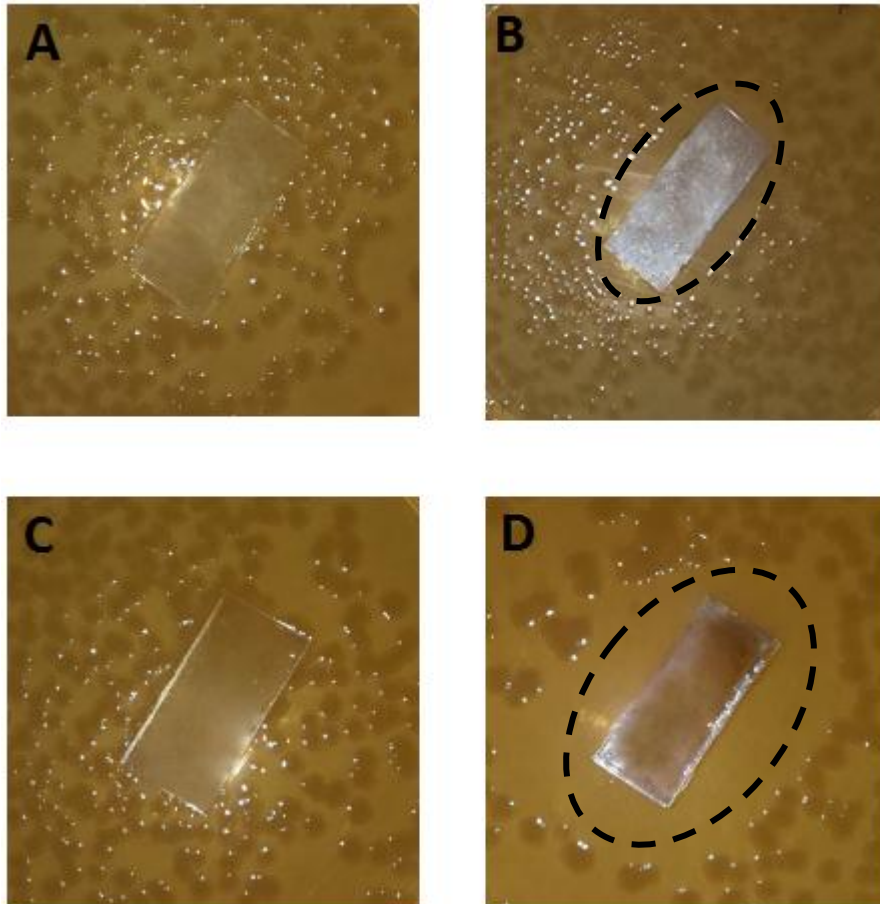


**Figura 40. (A) Film blanco SiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s vs (B) Film SiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s con NPs de Ag  
 (C) Film blanco SiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s vs (D) Film SiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s con NPs de Ag**

Para los films de SiO<sub>2</sub> preparados con el agente moldeante F127, se puede observar que se obtienen halos definidos en ambas velocidades de *dip coating* empleadas (Figura 40, B y D), siendo más extenso en el caso de los films preparados a la mayor velocidad (2 mm/s). Esta diferencia radica en que a mayor velocidad de *dip coating*, mayor será el espesor del film y, por lo tanto, mayor incorporación de NPs de Ag (como se corroboró mediante espectroscopia UV-visible).

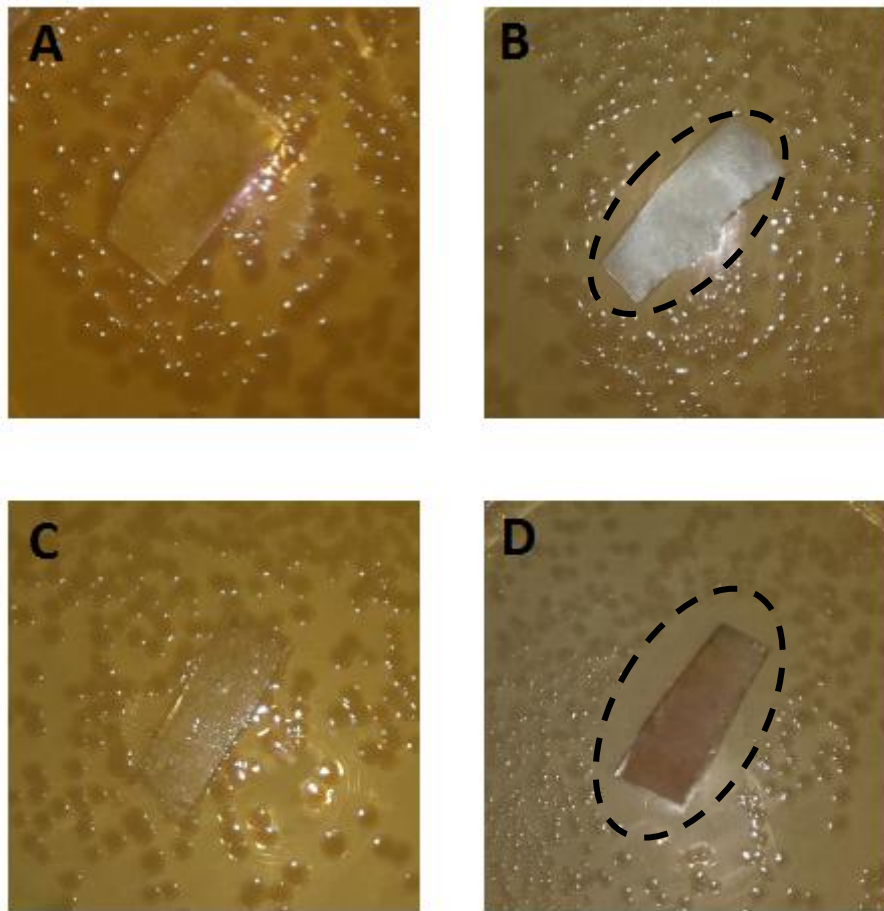
En comparación con los films anteriores, en los que no se obtuvieron halos, éstos se caracterizan por mayores espesores, relación Ag/Si e intensidad de la banda plasmónica, lo que justifica los resultados obtenidos.

**5.5.2. Resultados para films TiO<sub>2</sub> (Figuras 41 al 42):**



**Figura 41. (A) Film blanco TiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s vs (B) Film TiO<sub>2</sub>-Brij58-1 mm/s con NPs de Ag  
(C) Film blanco TiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s vs (D) Film TiO<sub>2</sub>-Brij58-2 mm/s con NPs de Ag**

En este caso también se obtienen halos alrededor de los films cargados con NPs de Ag (Figura 41, C y D), siendo más evidente en el caso del film preparado a mayor velocidad de *dip coating*, es decir, el que contiene mayor cantidad de NPs de Ag.



**Figura 42. (A) Film blanco TiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s vs (B) Film TiO<sub>2</sub>-F127-1 mm/s con NPs de Ag (C) Film blanco TiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s vs (D) Film TiO<sub>2</sub>-F127-2 mm/s con NPs de Ag**

Como en el caso anterior, los films de TiO<sub>2</sub> preparados con agente moldeante F127 promovieron la formación de halos debido a la difusión de NPs de Ag contenidas en sus poros hacia el medio circundante (Figura 42, B y D), siendo nuevamente, más evidente en el caso del film preparado a mayor velocidad de *dip coating*.

En comparación con el resto de films, los TiO<sub>2</sub> preparados con F127 fueron los que presentaron mayor cantidad de NPs de Ag en sus poros (resultados de espectroscopia UV-visible) por lo que se esperaba que produjeran el efecto más notorio en la cinética de crecimiento bacteriano. Sin embargo, se puede divisar que esto no ocurre y que incluso estos

films reportaron halos más pequeños en comparación con TiO<sub>2</sub>-Brij58 (comparando films de 2mm/s). Esto se podría explicar por la falta de homogeneidad en el tamaño de los films empleados, siendo algunos ligeramente más pequeños que otros. Además, es posible que exista algún efecto del tamaño de los mesoporos en el tamaño de las NPs de Ag obtenidas y, por ende, en las propiedades bactericidas. Para comprobar esta hipótesis se requiere un estudio más sistemático, que incluya una caracterización más exhaustiva de las NPs obtenidas.

Tras 24 horas de incubación y de haber realizado los análisis correspondientes, se depositaron las placas nuevamente en la estufa a 37°C para observar en días sucesivos si se producían variaciones. Sin embargo, los halos formados no sufrieron ninguna alteración (expansión/reducción).



## **6. CONCLUSIONES**

A continuación se enumeran las conclusiones que se derivan del presente trabajo:

- ✓ Se observó que los parámetros principales que definen la cantidad de Ag incorporada dentro de los óxidos mesoporosos son: el espesor de los films y el tipo de óxido mesoporoso utilizado como soporte. Particularmente, se observó que a medida que aumentaba el espesor de los films, se incrementó la intensidad de la banda plasmónica asociada a las NPs de Ag, lo que indica una mayor incorporación de Ag. Además, se observó que los films de TiO<sub>2</sub> fueron capaces de incorporar una mayor cantidad de Ag, lo que se corroboró mediante EDS. Esto es debido a que el TiO<sub>2</sub> cataliza la reducción de Ag sobre su superficie y el SiO<sub>2</sub> no tiene esta propiedad.
  
- ✓ A pesar de haber aplicado diversos métodos para determinar la toxicidad de las NPs de Ag, la técnica de formación de halo de lisis en placa fue la única que arrojó resultados significativos.

De todos los films ensayados, los de TiO<sub>2</sub> preparados a mayor velocidad de *dip coating* (2 mm/s) resultaron ser los bactericidas más efectivos, ya que son aquellos que contienen la mayor cantidad de Ag en el interior de los poros.

El efecto bactericida observado confirma la hipótesis planteada al inicio del trabajo: las NPs de Ag depositadas sobre films mesoporosos también ejercen su conocido efecto antimicrobiano, al difundir desde los films mesoporosos al espacio circundante. Tal como se comentó en la sección metodología, se hace muy difícil conocer la concentración de Ag dentro del film por lo que no resultó posible comparar el grado de toxicidad de NPs de Ag en solución y NPs de Ag depositadas en films mesoporosos.

En resumen, este trabajo es un primer paso prometedor para el desarrollo de recubrimientos bactericidas basados en nanopartículas de plata inmovilizadas en films delgados de óxidos mesoporosos.

A continuación, listamos algunas de las posibles causas por las cuales no se obtuvieron resultados tan categóricos y sugerimos algunas estrategias para futuros experimentos que permitirían mejorar los resultados obtenidos:

- Es probable que la concentración de bacterias utilizada haya sido demasiado elevada, lo que impidió obtener resultados significativos mediante los métodos de densidad óptica (a 600 nm) y de recuento de colonias en placa. Por ende, se sugiere la posibilidad de trabajar con una menor concentración de células bacterianas o realizar más diluciones en el caso de recuento de colonias. Esto permitiría hacer más notoria la acción bactericida y, a su vez, posibilitaría determinar el efecto bactericida cuantitativamente.
- Por otro lado, resultaría también más efectivo utilizar films con mayor cantidad de NPs metálicas. Para ello, sugerimos emplear una mayor concentración de  $\text{AgNO}_3$  o aumentar el tiempo de impregnación de los films o incluso adoptar ambas estrategias conjuntas. No aconsejamos incrementar el espesor de los films mediante el empleo de velocidades de *dip coating* superiores a los 2 mm/s ya que se observó falta de homogeneidad en los films obtenidos, lo que impediría su utilización en los ensayos de toxicidad.



## **7. APLICACIÓN COMERCIAL: “SILVER NANOSPRAV”**

### **Introducción:**

Como aplicación se desarrolló el trabajo que se va a describir a continuación. El mismo fue realizado durante la cursada de la materia “Desarrollo de Negocios Biotecnológicos” (año 2013, segundo cuatrimestre) donde el objetivo era idear un producto que se pueda comercializar y que esté a su vez relacionado con el proyecto de investigación en curso. En nuestro caso elegimos producir NPs de Ag en solución con el fin de utilizarlas en forma de *spray* para desinfección de distintos tipos de ambientes, aprovechando las propiedades bactericidas de la plata. Elegimos este producto debido a que la aplicación comercial de las nanopartículas de plata incluidas dentro de films mesoporosos todavía es una tecnología que está en desarrollo.

En base a los conocimientos adquiridos durante la realización de la parte experimental de nuestro proyecto, pensamos en lanzar un producto de limpieza que incluyera esta innovación tecnológica. Si bien es conocido el efecto bactericida de la plata, actualmente no existen productos que aprovechen esta propiedad de los nanomateriales de la manera que lo proponemos nosotros en este plan de negocios.

A continuación presentamos un resumen del trabajo presentado oportunamente.

**Resumen del plan de negocios:**

“Clean-Tech” es una nueva empresa industrial cuyo objetivo es proporcionar productos de limpieza aprovechando las propiedades novedosas de los nanomateriales. El proyecto será llevado a cabo por alumnos de la Licenciatura en Biotecnología de la Universidad Argentina de la Empresa, que están próximos a recibirse.

Se considera una oportunidad de negocio ya que la introducción de la nanotecnología a este tipo de productos resulta novedosa. Además, en el mercado actual, si bien existen diversas empresas que comercializan productos desinfectantes, aún no existen productos que incluyan esta tecnología.

La planta de producción se ubicará en el Parque Industrial Austral (Pilar), el cual es conocido como punto estratégico para empresas científicas y, entre otras ventajas, ofrece múltiples beneficios para nuevos emprendimientos, y se caracteriza por su fácil accesibilidad.

El producto se comercializará bajo el nombre “Silver nanospray”, cuyo formato será un envase de 500 ml con sistema difusor (gatillo) y con un precio estimado de \$21,50 la unidad. El volumen inicial de producción será 25.000 unidades mensuales y se estima aumentar la producción en 5.000 unidades mensuales a partir del tercer año de ejercicio.

La inversión inicial será de \$500.000; la mitad de este será aportada por participantes del proyecto, mientras que la otra mitad restante se adquirirá mediante un préstamo al Banco de la Nación Argentina con una tasa fija del 2% mensual y un plazo de 18 meses.

Se estima recuperar el dinero invertido en aproximadamente 16 meses, con índices VAN superior al millón de pesos y TIR superior al 100%, lo que describe la alta rentabilidad del proyecto presentado.

**Elementos de la organización:**

<p><b>MISION</b></p>	<p>Mejorar la calidad de vida de las personas a través de productos de limpieza e higiene con base tecnológica y satisfacer óptimamente las necesidades del mercado, generando la más alta rentabilidad con sentido de responsabilidad social.</p>
<p><b>VISION</b></p>	<p>En un mundo en el que la tecnología está cada vez más presente en todas las facetas de nuestra vida diaria, nosotros seremos un proveedor de productos líder en las áreas del cuidado de la salud y estilo de vida, aspirando a convertirnos en la empresa más admirada de nuestra industria a la vista de todas las personas.</p>
<p><b>VALORES</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Satisfacer a nuestros clientes</li> <li>• Cumplir con nuestros compromisos</li> <li>• Garantizar la calidad de nuestros productos</li> <li>• Fomentar el desarrollo profesional</li> <li>• Trabajo en equipo</li> </ul>
<p><b>ESTRATEGIA</b></p>	<p>Con el fin de cumplir con nuestra misión, se creará asociaciones con clientes clave y proveedores, tanto en las áreas de negocio como de negocio a consumidor. Además, continuaremos invirtiendo en mantener nuestra destacada posición de innovación y sacaremos el mayor partido posible a nuestros importantes recursos de propiedad intelectual. Finalmente, reforzaremos nuestras capacidades de liderazgo y fomentaremos la productividad a través de la transformación del negocio y de la excelencia operacional.</p>

**Elaboración de la solución con NPs de Ag y del producto final:**

La síntesis de las NPs de Ag a realizar para la producción comercial es distinta a la síntesis que se utilizó en nuestro proyecto de investigación, ya que si bien los fines son los mismos (generar un efecto bactericida a través de NPs de Ag) están contenidos en distintos envases y soportes. A continuación se describe la síntesis de las mismas.

**SINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA**

La síntesis se lleva a cabo mediante el método sin semilla de fase homogénea, en la cual, se mezclan los siguientes componentes: nitrato de plata, citrato de sodio, alcohol 100% y agua destilada. Se trata de una reacción en donde la plata se reduce por acción del citrato de sodio. Así, se obtienen dispersiones coloidales de plata amarillas (ver imagen) y estables, gracias al exceso de citrato de sodio utilizado en la reacción. Las partículas obtenidas presentan un diámetro aproximado de entre 10 y 30 nm. Las principales variables a controlar son: concentraciones de reactivos, temperatura, poder reductor y agregado de otros agentes que faciliten o impidan el crecimiento. Todo este procedimiento se llevaría a cabo en tanques industriales con sistema de agitación para poder garantizar el correcto mezclado de los reactivos.



Una vez obtenido el producto principal (solución con NPs de Ag), se procederá a su envasado. El formato de venta será un envase de 500 ml con un sistema dosificador que facilitará su aplicación sobre las superficies que el consumidor desee limpiar. Los envases llevarán consigo una etiqueta que identifique la marca de la empresa, como así también todas las indicaciones correspondientes.

**Inversión, costos y producción:**

En la Tabla 10 se detallan los valores que dieron lugar al cálculo del costo del producto (calculado con datos del año 2013). Éstos incluyen: costos de las materias primas utilizadas, cuánto se utiliza de cada una para elaborar el contenido del envase, y costos de los elementos necesarios para el packaging. Mientras que en la Tabla 11 se pueden apreciar los valores de la maquinaria adquirida y la estimación de las amortizaciones correspondientes.

Reactivos	Precio venta	Componente Monetario	Componente Físico	Costo unitario
Nitrato de plata (g)	\$1000/25g	40 \$/g	0.2 g/500cc	\$ 8
Citrato de sodio (g)	\$944/1kg	0,940 \$/g	0.6 g/500cc	\$ 0,57
Etanol (mL)	\$7/500ml	0,014 \$/ml	150 ml/500cc	\$ 2,10
Agua destilada (mL)	\$28/5L	\$ 0,005 \$/ml	350 ml/500cc	\$ 1,75
Envase	\$2,62/u	-	1 u/500cc	\$2,62
Etiqueta	\$0,30/u	-	1 u/500cc	\$0,30
Caja x 20u	\$7/u	-	0,05partes/500cc	\$0,35
Cinta embalaje	\$5/u	-	0,05partes/500cc	\$0,25
<b>SUBTOTAL</b>				<b>\$15,94</b>

**Tabla 10. Cálculo del costo del producto.**

Bienes de uso	Vida útil (años)	Valor de origen	Valor residual	Amortización anual	Amortización mensual
Maquina Reactor	5	\$ 30.000		\$ 6.000	\$ 500
Maquina Envasadora	10	\$ 20.000		\$ 2.000	\$ 166,67
Autoelevador	5	\$ 10.000		\$ 2.000	\$ 167
<b>SUBTOTAL</b>					<b>\$ 833,33</b>

**Tabla 11. Detalles de la maquinaria adquirida.**

En la Tabla 12 se detallan los gastos mensuales estimados para el área de Administración y Comercialización, como también el gasto estimado para el consumo de electricidad:

Servicio	Importe mensual
Telefonía	\$ 300
Internet	\$ 250
Celulares	\$ 800
Nextel	\$ 300
Insumos de Oficina	\$ 300
<b>SUBTOTAL</b>	<b>\$ 1.950</b>

<b>Electricidad</b>	
<b>Valor vigente KW/h</b>	<b>\$ 0,15</b>

Consumo eléctrico	KW/mes	Costo mensual
Maquina Reactor	3.000	\$ 450,00
Maquina Envasadora	1.500	\$ 225,00
Iluminación y Consumo general	2.000	\$ 300,00
<b>SUBTOTAL</b>		<b>\$ 975,00</b>
<b>Nota: Consumo equitativo para todas las áreas (Iluminación y Consumo general)</b>		

**Tabla 12. Gastos administración/comercialización y consumo de electricidad.**

En cuanto a la mano de obra, un único operario se encarga de las tareas de mezclado- envasado-etiquetado y empaquetado. Un encargado supervisará las demás áreas de la empresa, compuesta cada una de ellas por un empleado. El horario laboral consta de 8 horas diarias durante los 5 días hábiles (Lunes a Viernes) con 1 hora de descanso que se repartirá entre desayuno y almuerzo. Uno de los creadores del proyecto se encargará de la logística, mientras que las labores 6, 7 y 8 serán servicios contratados que trabajarán para la empresa días específicos del mes.

En la Tabla 13 se presentan los salarios estimados para cada empleado según sus funciones.

EMPLEADO	TAREA	SUELDO BRUTO	ACCION
1	Operario	\$ 6.000	Calculo reactivos / Envasado / Etiquetado
2	Chofer camión	\$ 4.000	Logística
3	Encargado	\$ 6.500	Supervisor
4	Administración y Compras	\$ 4.500	Administración y Compras
5	Ventas	\$ 5.000	Ventas
6	Mecánico de Mantenimiento	\$ 2.000	Mantenimiento
7	Servicio de Limpieza	\$ 1.000	Otros
8	Servicio de Contabilidad	\$ 2.500	Contador

EMPLEADO	TAREA	SAC anual	VACACIONES	TOTAL SAC+VACACIONES (MENSUAL)
1	Operario	\$ 6.000	\$ 3.000	\$ 818
2	Chofer camión	\$ 4.000	\$ 2.000	\$ 545
3	Encargado	\$ 6.500	\$ 3.250	\$ 886
4	Administración y Compras	\$ 4.500	\$ 2.250	\$ 614
5	Ventas	\$ 5.000	\$ 2.500	\$ 682

Tabla 13. Listado de sueldos según funciones.

Finalmente, teniendo en cuenta que todo lo que se produce se vende a un precio de \$21,50 la unidad, se procedió a confeccionar el estado de resultados del primer año de ejercicio (Tabla 14).

AÑO 1	MES 1	MES 2	MES 3	MES 4	MES 5	MES 6
Ventas	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00
Costos	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18
<b>RDO. BRUTO</b>	<b>\$ 132.271,82</b>	<b>\$ 132.271,82</b>	<b>\$ 132.271,82</b>	<b>\$ 132.271,82</b>	<b>\$ 132.271,82</b>	<b>\$ 132.271,82</b>
Gs. Administración	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91
Gs. Comercialización	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09
<b>RDO. OPERATIVO</b>	<b>\$ 115.496,82</b>	<b>\$ 115.496,82</b>	<b>\$ 115.496,82</b>	<b>\$ 115.496,82</b>	<b>\$ 115.496,82</b>	<b>\$ 115.496,82</b>
Amortizaciones	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33
<b>RDO. ANTES II</b>	<b>\$ 114.663,48</b>	<b>\$ 114.663,48</b>	<b>\$ 114.663,48</b>	<b>\$ 114.663,48</b>	<b>\$ 114.663,48</b>	<b>\$ 114.663,48</b>
Intereses	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889
<b>RDO. IMPONIBLE</b>	<b>\$ 95.774,60</b>	<b>\$ 95.774,60</b>	<b>\$ 95.774,60</b>	<b>\$ 95.774,60</b>	<b>\$ 95.774,60</b>	<b>\$ 95.774,60</b>
Impuestos	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11
<b>RDO NETO</b>	<b>\$ 46.128,49</b>	<b>\$ 46.128,49</b>	<b>\$ 46.128,49</b>	<b>\$ 46.128,49</b>	<b>\$ 46.128,49</b>	<b>\$ 46.128,49</b>

MES 7	MES 8	MES 9	MES 10	MES 11	MES 12	TOTAL 12 MESES
\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 537.500,00	\$ 6.450.000,00
\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -405.228,18	\$ -4.862.738,18
\$ 132.271,82	\$ 132.271,82	\$ 132.271,82	\$ 132.271,82	\$ 132.271,82	\$ 132.271,82	\$ 1.587.261,82
\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -8.415,91	\$ -100.990,91
\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -8.359,09	\$ -100.309,09
\$ 115.496,82	\$ 115.496,82	\$ 115.496,82	\$ 115.496,82	\$ 115.496,82	\$ 115.496,82	\$ 1.385.961,82
\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -833,33	\$ -10.000,00
\$ 114.663,48	\$ 114.663,48	\$ 114.663,48	\$ 114.663,48	\$ 114.663,48	\$ 114.663,48	\$ 1.375.961,82
\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -18.889	\$ -226.666,67
\$ 95.774,60	\$ 95.774,60	\$ 95.774,60	\$ 95.774,60	\$ 95.774,60	\$ 95.774,60	\$ 1.149.295,15
\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -49.646,11	\$ -595.753,30
\$ 46.128,49	\$ 46.128,49	\$ 46.128,49	\$ 46.128,49	\$ 46.128,49	\$ 46.128,49	\$ 553.541,85

Tabla 14. Estado de resultados del primer año de ejercicio.

En base al análisis económico y financiero, se estima que la inversión inicial será de \$500.000. La mitad de este monto irá a cargo de los creadores del proyecto, mientras que la parte restante será obtenida mediante un préstamo bancario (Banco de la Nación Argentina), con una tasa fija mensual del 2% y un plazo de 18 meses. En la Tabla 15 se detalla cómo se procedió a calcular los intereses y los impuestos.

AÑO 1		
Cuota mensual		\$ 13.888,89
<b>Intereses mensual (2%)</b>	<b>\$ 5.000,00</b>	<b>\$ 5.000,00</b>
<b>TOTAL MENSUAL</b>		<b>\$ 18.888,89</b>
<b>TOTAL AÑO 1 (12 MESES)</b>		<b>\$ 226.666,67</b>

AÑO 2		
Cuota mensual		\$ 13.888,89
<b>Intereses mensual (2%)</b>	<b>\$ 5.000,00</b>	<b>\$ 5.000,00</b>
<b>TOTAL MENSUAL</b>		<b>\$ 18.888,89</b>
<b>TOTAL AÑO 2 (6 MESES)</b>		<b>\$ 113.333,33</b>

Ingresos brutos	\$ 16.125,00	Mensual	\$ 193.500,00	Anual
Ganancias	\$ 33.521,11	Mensual	\$ 402.253,30	Anual
<b>TOTAL</b>	<b>\$ 49.646,11</b>	<b>Mensual</b>	<b>\$ 595.753,30</b>	<b>Anual</b>

Tabla 15. Cálculo de intereses e impuestos.

Finalmente, se hizo una proyección a futuro (5 años) y se calcularon los índices económicos VAN, TIR y PB.



	AÑO 0	AÑO 1	AÑO 2	AÑO 3	AÑO 4	AÑO 5
Producción mensual	-	25.000	25.000	30.000	30.000	30.000
Producción anual	-	300.000	300.000	360.000	360.000	360.000
Precio unitario	-	\$ 21,50	\$ 21,50	\$ 21,50	\$ 21,50	\$ 21,50

Ingresos brutos	\$ 193.500,00	\$ 193.500,00	\$ 232.200,00	\$ 232.200,00	\$ 232.200,00
Ganancias	\$ 402.253,30	\$ 521.253,30	\$ 598.422,24	\$ 598.422,24	\$ 598.422,24
<b>Total</b>	<b>\$ 595.753,30</b>	<b>\$ 714.753,30</b>	<b>\$ 830.622,24</b>	<b>\$ 830.622,24</b>	<b>\$ 830.622,24</b>

Ventas		\$ 6.450.000,00	\$ 6.450.000,00	\$ 7.740.000,00	\$ 7.740.000,00	\$ 7.740.000,00
Costos	\$ -500.000,00	\$ -4.862.738,18	\$ -4.862.738,18	\$ -5.818.922,18	\$ -5.818.922,18	\$ -5.818.922,18
<b>RDO BRUTO</b>		\$ 1.587.261,82	\$ 1.587.261,82	\$ 1.921.077,82	\$ 1.921.077,82	\$ 1.921.077,82
Gs Administración		\$ -100.990,91	\$ -100.990,91	\$ -100.990,91	\$ -100.990,91	\$ -100.990,91
Gs Comercialización		\$ -100.309,09	\$ -100.309,09	\$ -100.309,09	\$ -100.309,09	\$ -100.309,09
<b>RDO OPERATIVO</b>		\$ 1.385.961,82	\$ 1.385.961,82	\$ 1.719.777,82	\$ 1.719.777,82	\$ 1.719.777,82
Amortizaciones		\$ -10.000,00	\$ -10.000,00	\$ -10.000,00	\$ -10.000,00	\$ -10.000,00
<b>RDO ANTES II</b>		\$ 1.375.961,82	\$ 1.375.961,82	\$ 1.709.777,82	\$ 1.709.777,82	\$ 1.709.777,82
Intereses		\$ -226.666,67	-\$ 113.333,33	\$ 0,00	\$ 0,00	\$ 0,00
<b>RDO IMPONIBLE</b>		\$ 1.149.295,15	\$ 1.489.295,15	\$ 1.709.777,82	\$ 1.709.777,82	\$ 1.709.777,82
Impuestos		\$ -595.753,30	\$ -714.753,30	\$ -830.622,24	\$ -830.622,24	\$ -830.622,24
<b>RDO NETO</b>	\$ -500.000,00	\$ 553.541,85	\$ 774.541,85	\$ 879.155,58	\$ 879.155,58	\$ 879.155,58

Valor Actual Neto	VAN	\$ 1.229.481,40
Tasa Interna de Retorno	TIR	131%
Pay-Back	PB	16 meses

En base a los resultados obtenidos, se puede observar que tras 5 años de ejercicios se alcanza una ganancia neta superior al millón de pesos (tasa de descuento = 25%) y una tasa interna de retorno superior al 100%, lo que indica la alta rentabilidad del proyecto. Además, el capital invertido (\$500.000) se recupera en poco tiempo, aproximadamente 16 meses.

**Conclusiones:**

**GRAN OPORTUNIDAD DE NEGOCIO** → Bien es conocido el efecto bactericida de la plata, sin embargo, actualmente no existen productos que aprovechen esta propiedad de los nanomateriales. Esto nos condujo a pensar que la idea de lanzar un producto de limpieza que incluyera esta innovación tecnológica resultaría un emprendimiento interesante.

**ALTA RENTABILIDAD** → En base a los cálculos presentados, quedó claro que el proyecto “Silver nanospray” resulta ser muy interesante debido a la alta rentabilidad que desprende. Además, no olvidemos que esta alta rentabilidad se consigue comercializando el producto a tan sólo \$21,50 la unidad. Actualmente, en el mercado existen varios productos bactericidas que incluso están por encima del precio fijado para el “Silver nanospray”, con lo cual, tendríamos aún un margen superior para poder competir.

**PROYECCION A CORTO PLAZO** → Creemos que en el corto plazo se aprovecharán aún más las propiedades bactericidas que proporcionan ciertos nanomateriales, ya que a medida que se van realizando investigaciones en el área de la Nanotecnología, se van descubriendo nuevos elementos que comparten esta propiedad, como por ejemplo, los nanomateriales de grafeno. Ante esta situación, el principal inconveniente encontrado es el temor de muchas personas a lo desconocido, con lo cual, creemos que sería de suma importancia difundir más conocimientos acerca de la inocuidad para el ser humano de los nanomateriales bactericidas, con el fin de conseguir que los consumidores se animen a probar nuevos productos que incorporan esta innovación tecnológica.

En conclusión, está claro que la innovación tecnológica, sumada a la alta rentabilidad del proyecto y el amplio mercado target existente serán las claves principales para alcanzar el éxito de este emprendimiento.

## **8. BIBLIOGRAFIA**

### **Bibliografía principal:**

<sup>(1)</sup> Angelomé, Paula, “*Films delgados mesoporosos de óxidos metálicos, mixtos e híbridos. Hacia un diseño racional de materiales funcionales*”, Tesis de Doctorado en el área Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, 2008.

<sup>(2)</sup> Fuertes, María Cecilia, “*Materiales funcionales multiescala basados en películas de óxidos mesoporosos*”, Tesis de Doctorado en Materiales, Instituto Sabato-Universidad de San Martín, 2009.

### **Bibliografía complementaria:**

<sup>(3)</sup> G. A. Ozin, A. Arsenault, “*Nanochemistry. A Chemical Approach to Nanomaterials*”, RSC Publishing Group, 2005.

<sup>(4)</sup> G. J. A. Soler Illia, C. Sánchez, B. Lebeau, J. Patarin, “*Self Assembly of Amphiphilic Conjugated Polyelectrolytes and Nanostructured Composite Materials for Optoelectric Applications*”, Chem. Rev., 2002, 102, 4093.

<sup>(5)</sup> a) C. T. Kresge, M. E. Leonowicz, W. J. Roth, J. C. Vartuli, J. S. Beck, “*Ordered Mesoporous Molecular Sieves Synthesized by a Liquid-crystal Template Mechanism*”, Nature, 1992, 359, 710.

<sup>(6)</sup> C. Y. Chen, S. L. Burkett, H. X. Li, M. E. Davis, “*Synthesis and Properties of Low-Dimensional Nanocomposites by Chemical Assembly in Confined Environments*”, Microp. Mater., 1993.

- <sup>(7)</sup> A. Monnier, F. Schüth, Q. Huo, D. Kumar, D. Margolese, R. S. Maxwell, G. D. Stucky, M. Krishnamurty, P. Petroff, A. Firouzi, M. Janicke, B. F. Chmelka, “*Nanoscale Materials in Chemistry*”, Science, 1993.
- <sup>(8)</sup> J. S. Beck, J. C. Vartuli, G. J. Kennedy, C. T. Kresge, W. J. Roth, S. E. Schramm, “*Molecular or Supramolecular Templating: Defining the Role of Surfactant Chemistry in the Formation of Microporous and Mesoporous Molecular Sieves*”, Chem. Mater., 1994, 6, 1816.
- <sup>(9)</sup> Q. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schüth, G. D. Stucky, “*Generalized synthesis of periodic surfactant/inorganic composite materials*”, Nature, 1994, 368, 317.
- <sup>(10)</sup> D. M. Antonelli, J. Y. Ying, “*Synthesis of Hexagonally Packed Mesoporous TiO<sub>2</sub> by a Modified Sol-Gel Method*”, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34, 2014 .
- <sup>(11)</sup> N. Ulapagan, C. N. R. Rao, “*Mesoporous phases based on SnO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>*”, Chem. Commun., 1996, 1685.
- <sup>(12)</sup> U. Ciesla, S. Schacht, G. D. Stucky, K. K. Unger, F. Schüth, “*Formation of a Porous Zirconium Oxo Phosphate with a High Surface Area by a Surfactant-Assisted Synthesis*”, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1996, 35, 541.
- <sup>(13)</sup> P. Tanev, T. J. Pinnavaia, “*A Neutral Templating Route to Mesoporous Molecular Sieves*”, Science, 1995, 267, 865.
- <sup>(14)</sup> S. A. Bagshaw, E. Prouzet, T. J. Pinnavaia, “*Templating of Mesoporous Molecular Sieves by Nonionic Polyethylene Oxide Surfactant*”, Science, 1995, 269, 1242.

- (15) G. S. Attard, J. C. Glyde, C. G. Göltner, “*Liquid-crystalline Phases as Templates for the Synthesis of Mesoporous Silica*”, *Nature*, 1995, 378, 366.
- (16) a) D. Zhao, J. Feng, Q. Huo, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, “*Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores*”, *Science*, 1998, 279, 548; b) D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, “*Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures*”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, 120, 6024.
- (17) P. J. Bruinsma, A. Y. Kim, J. Liu, S. Baskaran, “*Mesoporous Silica Synthesized by Solvent Evaporation: Spun Fibers and Spray-Dried Hollow Spheres*”, *Chem. Mater.*, 1997, 9, 2507.
- (18) P. Yang, D. Zhao, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, “*Triblock-Copolymer-Directed Syntheses of Large-Pore Mesoporous Silica Fibers*”, *Chem. Mater.*, 1998, 10, 2033.
- (19) P. Yang, T. Deng, D. Zhao, P. Feng, D. Pine, B. F. Chmelka, G. M. Withesides, G. D. Stucky, “*Hierarchically Ordered Oxides*”, *Science*, 1998, 282, 2244.
- (20) M. Ogawa, “*Formation of Novel Oriented Transparent Films of Layered Silica-Surfactant Nanocomposites*”, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 7941.
- (21) M. Ogawa, “*A simple sol-gel route for the preparation of silica-surfactant mesostructured materials*”, *Chem. Commun.*, 1996, 1149.
- (22) H. Yang, A. Kupperman, N. Coombs, S. Mamiche-Afara, G. A. Ozin, “*Synthesis of oriented films of mesoporous silica on mica*”, *Nature*, 1996, 379, 703.

- <sup>(23)</sup> I. A. Aksay, M. Trau, S. Manne, I. Honma, N. Yao, L. Zhou, P. Fenter, P. M. Eisenberger, S. M. Gruner, “*Biomimetic Pathways for Assembling Inorganic Thin Films*”, *Science*, 1996, 273, 892.
- <sup>(24)</sup> H. Yang, N. Coombs, I. Sokolov, G. A. Ozin, “*Free-standing and oriented mesoporous silica films grown at the air–water interface*”, *Nature*, 1996, 381, 589.
- <sup>(25)</sup> H. W. Hillhouse, T. Okubo, J. W. van Egmond, M. Tsapatsis, “*Preparation of Supported Mesoporous Silica Layers in a Continuous Flow Cell*”, *Chem. Mater.*, 1997, 9, 1505.
- <sup>(26)</sup> Y. Lu, R. Ganguli, C. A. Drewien, M. T. Anderson, C. J. Brinker, W. Gong, Y. Guo, H. Soyez, B. Dunn, M. H. Huang, J. I. Zink, “*Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol–gel dip-coating*”, *Nature*, 1997, 389, 364.
- <sup>(27)</sup> D. Zhao, P. Yang, D. I. Margolese, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, “*Synthesis of continuous mesoporous silica thin films with three-dimensional accessible pore structures*”, *Chem. Commun.*, 1998, 2499.
- <sup>(28)</sup> D. Zhao, P. Yang, N. Melosh, J. Feng, B. F. Chmelka, G. D. Stucky, “*Continuous Mesoporous Silica Films with Highly Ordered Large Pore Structures*”, *Adv. Mater.*, 1998, 10, 1380.
- <sup>(29)</sup> C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, “*Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy*”, *Adv. Mater.*, 1999, 11, 579.
- <sup>(30)</sup> J. Livage, M. Henry, C. Sánchez, “*Sol-gel chemistry of transition metal oxides*”, *Prog. Solid. St. Chem.*, 1988, 18, 259.
- <sup>(31)</sup> C. J. Brinker y G. W. Scherer, “*Sol-gel Science*”, Academic Press, 1990.

- (32) A. C. Pierre, *“Introduction to Sol Gel Processing”*, Kluwer Publishers, 1998, 394.
- (33) Y. Lu, R. Ganguli, C. A. Drewien, M. T. Anderson, C. J. Brinker, W. Gong, Y. Guo, H. Soyez, B. Dunn, M. H. Huang, J. I. Zink, *“Continuous formation of supported cubic and hexagonal mesoporous films by sol–gel dip-coating”*, *Nature*, 1997, 389, 364.
- (34) C. J. Brinker, Y. Lu, A. Sellinger, H. Fan, *“Evaporation-Induced Self-Assembly: Nanostructures Made Easy”*, *Adv. Mater.*, 1999, 11, 579.
- (35) J. K. Schluesener, H. J. Schluesener, *“Nanosilver: application and novel aspects of toxicology”*, 2013.
- (36) Campbell, D.J. & Xia, Y. (2007), *Plasmons: why should we care?*, *Journal of Chem. Ed.*: 84, 91-96.
- (37) Mulvaney, P., *“Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles”*, *Langmuir*, 1996, 12, 788-800.
- (38) G. Cao y Y. Wang, *“Nanostructures and Nanomaterials – Synthesis, Properties and Applications”*, World Scientific Publishing Company, 2011.
- (39) Tang, Y., Zeng, X. & Liang, J., *“Surface plasmon resonance: an introduction to a surface spectroscopy technique”*, *Journal of Chem. Ed.*, 2010, 87, 742-746.
- (40) Zanella, Rodolfo, *“Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño”*, *Mundo Nano*, 2012, Vol. 5.



- (41) M. E. Stewart, C. R. Anderton, L. B. Thompson, J. Maria, S. K. Gray, J. A. Rogers, R. G. Nuzzo, “*Nanostructured Plasmonic Sensors*”, *Chem. Rev.*, 2008, *108*, 494-521.
- (42) H. Ko, S. Singamaneni, V. Tsukruk, “*Nanostructured Surfaces and Assemblies as SERS Media*”, *Nano Micro Small*, 2008, *4*, 1576.
- (43) T. Asefa, R. B. Lennox, “*Synthesis of Gold Nanoparticles Via Electroless Deposition in SBA-15*”, *Chem. Mater.*, 2005, *17*, 2481.
- (44) L. M. Bronstein, “*Nanoparticles Made in Mesoporous Solids*”, *Top. Curr. Chem.*, 2003, *226*, 55.
- (45) M. C. Fuertes, M. Marchena, M. C. Marchi, A. Wolosiuk y G. J. A. A. Soler-Illia – “*Controlled Deposition of Silver Nanoparticles in Mesoporous Single or Multilayer Thin Films: From Tuned Pore Filling to Selective Spatial Location of Nanometric Objects*”, 2009.
- (46) Eduardo D. Martínez, Martín G. Bellino y Galo J. A. A. Soler-Illia – “*Patterned Production of Silver-Mesoporous Titania Nanocomposite Thin Films Using Litography-Assisted Metal Reduction*”, 2009.
- (47) Eduardo D. Martínez, Leticia Granja, Martín G. Bellino y Galo J. A. A. Soler-Illia – “*Electrical conductivity in patterned silver-mesoporous titania nanocomposite thin films: towards robust 3D nano-electrodes*”, 2010.
- (48) Chernousova S., Epple, M., “*Silver as Antibacterial: Ion, Nanoparticle and Metal*”, *Ang. Chem. Int. Ed.*, 2012, *52*, 1636-1653.
- (49) Feng, Q., Wu, J., Chen, G., “*A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus*”, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000, *52*, 662-668.

- (50) Kazachenko, A. S., Legler, A. V., Peryanova, O. V., Vstayskaya, A., “*Synthesis and antimicrobial activity of silver complexes with histidine and tryptophan*”, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2000, 34, 257- 258.
- (51) Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P., “*Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens*”, *J. Periodont. Res.*, 2001, 36, 108-113.
- (52) Bright Kwakye-Awuah, C. Williams, M.A. Kenward and I. Radecka, “*Antimicrobial action and efficiency of silver-loaded zeolite X*”, *Research Centre in Applied Sciences (University of Wolverhampton, UK)*, 2007, 1526, 1523.
- (53) Baker, S., Satish, S., “*Endophytes: Toward a Vision in Synthesis of Nanoparticle for Future Therapeutic Agents*”, *J. Bio-Inorg. Hybrid Nanomat.*, 2012, 67, 77.
- (54) Panacek, A., Kvítek, L., Pucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizúrova, N., Sharma, K., Nevecna, T., Zboril, R., “*Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity*”, *J. Phys. Chem. B.*, 2006, 110, 16248-16253.
- (55) Yang Liu, Xiaolei Wang, Fan Yang, Xiurong Yang, “*Excellent antimicrobial properties of mesoporous anatase TiO<sub>2</sub> and Ag/TiO<sub>2</sub> composite films*”, *Micropor. Mesopor. Mat.*, 2008, 114, 431.
- (56) Monty Liong, Bryan France, Kenneth A. Bradley, and Jeffrey I. Zink, “*Antimicrobial Activity of Silver Nanocrystals Encapsulated in Mesoporous Silica Nanoparticles*”, *Adv. Mater.*, 2009, 21, 1684-1689.
- (57) Croteau, M., Renner, V., Archibald, F., Langlois, V., Cahn, J., Ridal, J., Lean, D., “*Investigation of pathogenic Escherichia coli and microbial pathogens in pulp and paper mill biosolids*”, 2007, 79, 1050-1056.

- <sup>(58)</sup> E. L. Crepaldi, G. J. A. A. Soler-Illia, D. Grosso, F. Ribot, F. Cagnol, C. Sanchez, “*Controlled Formation of Highly Organized Mesoporous Titania Thin Films: From Messtructured Hybrids to Mesoporous Nanoanatase TiO<sub>2</sub>*”, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, *125*, 9770.
- <sup>(59)</sup> E. L. Crepaldi, G. J. A. A. Soler Illia, D. Grosso, C. Sánchez, “*Nanocrystallised Titania and Mesoporous Thin Films Exhibiting Enhanced Thermal Stability*”, *New J. Chem.*, 2003, *27*, 9.
- <sup>(60)</sup> D. R. Lide, “*Handbook of Chemistry and Physics*”, CRC Press, 1992.
- <sup>(61)</sup> Porel, S., Ramakrishna, D., Hariprasad, E., Dutta Gupta, A., Radhakrishnan, T.P., “*Polymer thin films with in situ synthesized silver nanoparticles as a potent reusable bactericide*”, 2011, *Central Salt and Marine Chem. Res. Inst.*, *101*, 7.
- <sup>(62)</sup> Mitchell, Mark A., “*Evaluating Antimicrobial in Wildlife and Fisheries*”, 2004, Louisiana State University Wildlife Hospital.