

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

RECUBRIMIENTOS BACTERICIDAS BASADOS EN NANOPARTÍCULAS DE PLATA

López Novo, Ana Clara – LU 133203

Licenciatura en Biotecnología

Vargas, Estefanía Gabriela – LU 1023350

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Dra. Angelomé, Paula Cecilia

**Gerencia Química, Centro Atómico Constituyentes,
Comisión Nacional de Energía Atómica**

Noviembre 2, 2016



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a todas las personas que participaron e hicieron posible este proyecto final:

A la Dra. Angelomé, Paula: nuestra tutora, quien nos acompañó a lo largo de todo el proyecto, orientándonos, transmitiéndonos sus conocimientos y experiencia, por su paciencia, apoyo y empatía.

Al Centro Atómico Constituyentes por brindarnos los equipos y materiales necesarios para el desarrollo de parte de este proyecto.

A Mendolicchio Fernando, por su ayuda durante los trabajos de experimentación realizados en los laboratorios de UADE.

A nuestras familias y amigos por alentarnos y apoyarnos incondicionalmente.

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, a las cuales se suman la alta superficie específica y la posibilidad de controlar el tamaño del poro de los óxidos porosos, y las propiedades derivadas de la gran interfase metal-óxido. Debido a estas propiedades se prevén una gran cantidad de aplicaciones para estos materiales. Entre éstas, es de particular interés la liberación controlada de iones Ag^+ , los cuales poseen propiedades bactericidas.

En un PFI previo, pudo comprobarse que las NPs de Ag ejercen su efecto bactericida estando inmovilizadas en soportes de óxidos de silicio y titanio mesoporosos. En el presente trabajo, se propuso ensayar nuevas condiciones de síntesis a fin de mejorar la eficiencia bactericida. Para ello se planteó utilizar recubrimientos más gruesos, que puedan incorporar mayor cantidad de nanopartículas y probar también soportes de óxido de zirconio.

La síntesis de films delgados mesoporosos de SiO_2 , TiO_2 y ZrO_2 (de diferentes espesores) se llevó a cabo mediante la combinación del proceso sol gel y el autoensamblado de surfactantes (que actúan como moldes para la formación de los poros) utilizando el método de dip-coating. A continuación, se trataron los films térmicamente para eliminar el agente moldeante y se rellenaron los poros con NPs de Ag, mediante reducción química. Los materiales obtenidos se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS), elipsometría y espectroscopia UV-visible. Los resultados demostraron el buen ordenamiento de los poros y una alta carga de NPs de Ag. Finalmente, se evaluaron cualitativamente las propiedades bactericidas de los films sobre una cepa bacteriana inocua de *Escherichia coli* (BL21) tanto en solución como por contacto.

Pudo observarse que las NPs de Ag ejercen su efecto bactericida estando inmovilizadas en los soportes mesoporosos, obteniendo resultados más favorables para los films de TiO_2 y ZrO_2 que para los de SiO_2 . Los films más gruesos son más efectivos debido a que pueden albergar una mayor cantidad de Ag que los films más finos y/o de SiO_2 .

Estos resultados contribuyen a que en un mediano plazo puedan ensayarse el uso de los materiales obtenidos como recubrimientos para superficies rígidas que requieran esterilidad.

ABSTRACT

Composite materials based on metallic nanoparticles (NPs) and mesoporous oxides present both the plasmonic properties and surface reactivity of the NPs and the high specific surface area and controlled pore size of the support, and the properties derived from the large metal-oxide interface. Owing to these properties a lot of applications for these materials are envisioned. Among these, the controlled release of Ag^+ ions, which have bactericidal properties have particular interest.

In a previous PFI, it was found that Ag NPs exert their bactericidal effect being immobilized in silicon and titanium mesoporous oxides. In this research project, it was proposed to test new synthesis conditions to improve the bactericidal efficiency. To this end, thicker coatings (which can incorporate more nanoparticles) and zirconia supports were tested.

The synthesis of SiO_2 , TiO_2 and ZrO_2 mesoporous thin films (with different thicknesses) was carried out by combining the sol gel process and surfactants self-assembly (which act as templates for the pores' formation) using the dip-coating method. Then the films were thermally treated to remove the template and the pores were filled with Ag NPs, by chemical reduction. The obtained materials were characterized by scanning electron microscopy, X-ray spectroscopy energy dispersive (EDS), ellipsometry and UV-visible spectroscopy. The results showed good ordering of pores and a high load of Ag NPs. Finally, the bactericidal properties of the composite films were qualitatively assessed on a harmless bacterial strain of *Escherichia coli* (BL21) both in solution and by direct contact.

It was observed that Ag NPs exert their bactericidal properties when are immobilized inside mesoporous oxides. More favorable results were obtained for TiO_2 and ZrO_2 films. Thicker films are more effective because they can entrap a larger amount of Ag than the thinner ones and/or SiO_2 films.

These results pave the way to the use of the obtained composite materials as coatings for rigid surfaces that require sterility.

CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. ANTECEDENTES	9
2.1 Superficies Bactericidas (Epple y Chermousova, 2012).....	9
2.2 Nanomateriales.....	9
2.2.1 Materiales Mesoporosos	10
2.3 Obtención de materiales mesoporosos	11
2.3.1 Precursores y reacciones Sol - Gel	11
2.3.2 Sol-Gel + Autoensamblado.....	13
2.3.3 Films delgados mesoporosos (Angelomé, 2008).....	15
2.4 Nanopartículas metálicas (Campbell y Xia, 2007; Mulvaney, 1996).....	17
2.4.1 Nanopartículas de Ag: uso como bactericidas (Epple y Chernousova, 2012).....	18
2.5 Nanopartículas de Ag encapsuladas en films mesoporosos	20
3. HIPÓTESIS	23
4. METODOLOGÍA	24
4.1 Síntesis de films mesoporosos	24
4.1.1 Preparación de los soles.....	24
4.1.2 Preparación del soporte.....	27
4.1.3 Preparación de los films.....	28
4.1.4 Tratamiento posterior.....	30
4.1.5 Incorporación de las nanopartículas de Ag.....	30
4.2 Caracterización.....	31
4.2.1 Medidas del espesor.....	31
4.2.2 Orden de los poros y composición.....	31
4.2.3 Espectroscopia Ultravioleta - Visible	32
4.3 Evaluación de propiedades bactericidas	32
4.3.1 Ensayos en Placa.....	33
4.3.2 Ensayos en solución.....	34
5. RESULTADOS	35
5.1. Caracterización de los films.....	35
5.1.1 Films mesoporosos: estructura y espesores	35
5.2. Films cargados con NPs de plata	39

5.2.1 Espectroscopia UV-visible	39
5.2.2 Caracterización por EDS	51
5.2.3 Relación Ag/Si, Ag/Ti y Ag/Zr: espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS)	53
5.3. Estudio de Efecto Bactericida	57
5.3.1. Halos de lisis en placa.....	58
5.3.2. Ensayos en solución.....	62
6. CONCLUSIONES.....	68
7. BIBLIOGRAFIA.....	70

1. INTRODUCCIÓN

Los materiales compuestos basados en nanopartículas (NPs) metálicas y óxidos mesoporosos (es decir, aquellos que poseen poros ordenados y de tamaño controlado entre 2 y 50nm) presentan:

- Propiedades plasmónicas y la reactividad superficial, propias de las NPs metálicas.
- Alta superficie específica y porosidad controlada, propia de los materiales mesoporosos.
- Propiedades derivadas de la gran interfase metal-óxido.

Esta combinación de propiedades ha sido de gran interés por parte de la comunidad científica en los últimos años debido, principalmente, a que se prevén gran cantidad de aplicaciones para este tipo de materiales. Entre ellas, se destaca la de liberación controlada de iones Ag^+ a partir de materiales compuestos. Estos iones poseen propiedades bactericidas y el material poroso es un excelente soporte para su liberación en el sitio de interés, especialmente si está preparado en forma de film delgado.

Se ha podido demostrar el efecto bactericida de films mesoporosos cargados con NPs de plata en el marco de un Proyecto Final de Ingeniería (Rodríguez y Yun, 2014). Durante el desarrollo de dicho trabajo, se observó que los recubrimientos presentaban actividad bactericida apreciable por contacto. Sin embargo, la actividad bactericida en solución resultó poco destacable.

Tomando como base ese proyecto, en este trabajo se propone mejorar la eficiencia bactericida de los films mesoporosos cargados con NPs de Ag obtenidos anteriormente. Para ello se ensayaron nuevas condiciones de síntesis introduciendo modificaciones en el espesor, en la cantidad de nanopartículas incorporadas y en la estabilidad en solución, a fin de determinar cómo influyen estas variables con el efecto bactericida de los mismos.

El objetivo general del trabajo es investigar y mejorar el efecto bactericida que resulta de la incorporación de nanopartículas de plata (NPs de Ag) en films delgados de óxidos mesoporosos (TiO_2 , SiO_2 , ZrO_2), mediante procesos que garanticen la máxima eficiencia posible.

Como objetivos específicos, se encuentran:

- Llevar a cabo la síntesis de los films mencionados e incorporarles NPs de Ag
- Estudiar la influencia del espesor del film, los tiempos de reacción y el tipo de óxido en la cantidad de Ag incorporada.
- Evaluar cualitativamente las propiedades bactericidas de los materiales preparados.
- Comparar los resultados obtenidos con estudios previos.
- Determinar qué factores determinan una mayor eficacia en la capacidad bactericida de los materiales.

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas. La primera, se realizó en los laboratorios de la Gerencia Química del Centro Atómico Constituyentes, donde se efectuó la síntesis y caracterización de los films. La segunda etapa, se realizó en los laboratorios de UADE y consistió en evaluar las propiedades bactericidas de los films sintetizados.

La metodología se presenta en tres apartados que incluyen, en primer lugar, el procedimiento empleado para sintetizar films delgados mesoporosos de SiO_2 , TiO_2 y ZrO_2 y la incorporación de las nanopartículas de plata. Seguidamente, se desarrolla la caracterización de los materiales obtenidos, mediante microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS), elipsometría y espectroscopia UV-visible. Por último, se describe el protocolo utilizado para evaluar las propiedades bactericidas de los films sintetizados sobre una cepa bacteriana inocua de *Escherichia coli* (BL21) tanto en solución como por contacto.

Finalmente, se detallan y discuten los resultados obtenidos en los diferentes experimentos de manera de arribar a las conclusiones, que se presentan en el último apartado.

2. ANTECEDENTES

2.1 Superficies Bactericidas (Epple y Chermousova, 2012)

Una superficie antimicrobiana contiene un compuesto químico que inhibe o reduce la capacidad de los microorganismos de crecer sobre la superficie de un material. Los seres humanos están expuestos de manera cotidiana a microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoos y virus, es por ello que la utilización de antimicrobianos es importante a fin de mantener un ambiente libre de agentes que pudieran causar posibles infecciones.

El término “antimicrobiano” refiere a un efecto perjudicial para cualquier microorganismo en general. En cambio, el término “bactericida” implica una selectividad hacia las bacterias, por lo tanto, una superficie bactericida es aquella capaz de provocar la muerte de las bacterias que se pongan en contacto con dicha superficie.

Una de las maneras de combatir el crecimiento de las células bacterianas sobre una superficie es prevenir la adhesión inicial de las células a la misma. Se puede impartir la actividad antimicrobiana a una superficie mediante la aplicación de un revestimiento que contenga agentes antimicrobianos, siendo un buen ejemplo de este tipo de agentes las nanopartículas de plata. Las nanopartículas tienen efectos beneficiosos en cuanto a las propiedades estructurales del recubrimiento, sumadas a su efecto antibacteriano.

2.2 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.

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 del 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 (Arsenault y Ozin, 2005).

2.2.1 Materiales Mesoporosos

Los avances tecnológicos actuales en múltiples campos (como la adsorción, separación, catálisis, liberación controlada de drogas, sensores, fotónica, etc.) requieren del desarrollo de materiales porosos con estructura controlable y una arquitectura de poros diseñada a medida según la aplicación.

De acuerdo a la IUPAC, existen tres categorías para los materiales porosos según el diámetro de poro (d) que presenten: microporosos ($d < 2$ nm), **mesoporosos ($2 < d < 50$ nm)** y macroporosos ($d > 50$ nm).

En particular, los materiales mesoporosos ordenados (obtenidos mediante la combinación de autoensamblado de surfactantes y química sol gel) poseen poros de tamaño uniforme altamente ordenados, lo que se traduce en una alta superficie específica, muy accesible para moléculas e iones. Además, por el método de síntesis utilizado, permiten la posibilidad de incorporar compuestos orgánicos o biológicos, los que aumenta sus potencialidades.

Hasta principios de los años 90, los materiales porosos más ampliamente estudiados eran la familia de aluminosilicatos cristalinos conocidos como zeolitas (Soler Illia *et al*, 2002) preparados utilizando moléculas como moldes. 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 MobilOilCorporation reportó la síntesis de los primeros materiales mesoporosos ordenados: la familia de sílices M41S (MCM-41, MCM-48, etc.) (Kresge *et al*, 1992). La síntesis de estos materiales se realiza en medios acuosos 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 (≈ 1000 m²/g) con un tamaño de poro monodisperso mayor al de las zeolitas: entre 2 y 10 nm, de acuerdo a las condiciones de síntesis.

Efectivamente, poco después de este primer ejemplo se realizaron estudios de los mecanismos involucrados en la formación de estos materiales (Chen *et al*, 1993; Monnier *et al*, 1993; Beck *et al*, 1994) y se sumaron los primeros ejemplos de óxidos distintos de SiO₂ (Huo *et al*, 1994). Unos años más tarde, se reportaron los primeros ejemplos de óxidos

mesoporosos de metales de transición (Antonelli y Ying, 1995; Ulapaggan y Rao, 1996; Ciesla *et al*, 1996).

A los surfactantes catiónicos utilizados en las primeras síntesis se sumaron moldes aniónicos (Huo *et al*, 1994) y no iónicos, como aminas (Tanev y Pinnavaia, 1995), copolímeros dibloque (Bagshaw *et al*, 1995; Attard *et al*, 1995) y copolímeros tribloque (Bagshaw *et al*, 1995; Zhao *et al*, 1998) basados en polióxido de etileno. Si bien algunos de los materiales obtenidos no presentaron orden de poros a largo alcance, otros resultaron altamente ordenados.

2.3 Obtención de materiales 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 (Angelomé, 2008).

2.3.1 Precursores y reacciones Sol - Gel

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 coloidal 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. Estas condiciones de síntesis “suaves” hacen que sea posible:

- obtener fases amorfas o cristalinas metaestables,
- incorporar moléculas orgánicas o biológicas al material final,
- procesar los materiales obtenidos de muy diversas maneras (véase Figura 1).

Pueden obtenerse mediante esta técnica: óxidos, materiales híbridos orgánico-inorgánicos y otros compuestos procesados como films, polvos, fibras, etc.

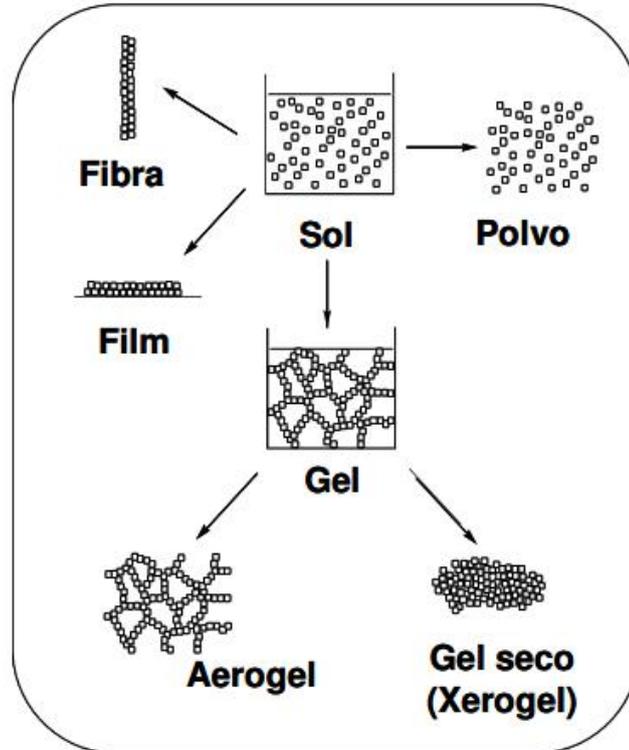


Figura 1. Posibles formas de procesar un material obtenido mediante la técnica sol-gel

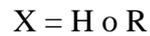
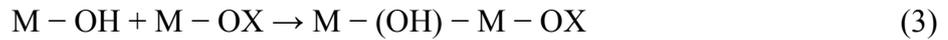
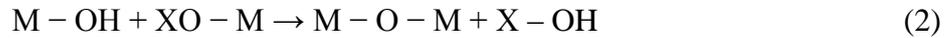
La formación de un óxido por el método sol-gel implica conectar centros metálicos mediante puentes oxo o hidroxilo para generar (hidroxilo) polímeros de metal en solución. Para ello se hace reaccionar un precursor MX_n con agua, donde M es el elemento del cual se quiere obtener el óxido y X es un anión 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, la especie hidroxilada puede reaccionar con otros centros metálicos, dando lugar a reacciones de *condensación*, cuyos productos son oligómeros y, eventualmente, partículas de óxido. La condensación puede dar lugar a un puente oxo, tal como se muestra en

la ecuación (2) o un puente hidroxilo, tal como se observa en (3). En este último caso, la reacción se denomina *olación* y en el caso (2), *oxolación*.



La hidrólisis y la condensación son los equivalentes a la activación y la propagación en la polimerización orgánica, por lo que el proceso sol-gel puede calificarse como una polimerización inorgánica controlada.

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.

La velocidad de las reacciones de hidrólisis-condensación puede controlarse mediante el ajuste de algunas de las siguientes condiciones de reacción:

1. precursor (la velocidad de la hidrólisis depende de la estructura del mismo),
2. tipo de solvente y su pH,
3. incorporación de complejantes o catalizadores,
4. concentraciones de las distintas especies presentes en solución.

Un control preciso de estas variables permite controlar con precisión las propiedades del material final.

2.3.2 Sol-Gel + Autoensamblado

Las moléculas anfifílicas son aquellas que 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 en la nueva condición más concentrada: 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 *crisales líquidos liotrópicos*. Este proceso (Figura 2) se denomina autoensamblado y puede definirse como el *ordenamiento de moléculas sin influencia externa*.

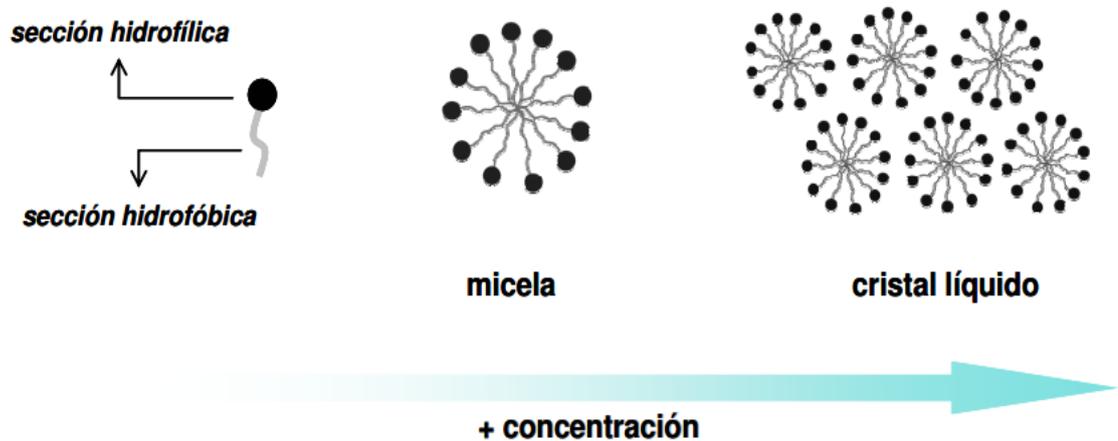
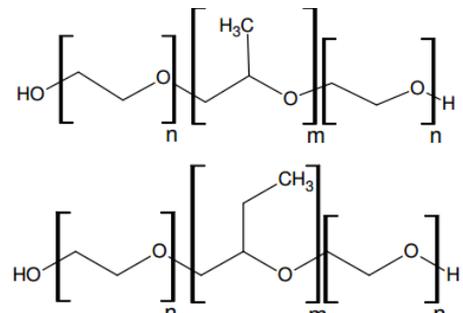
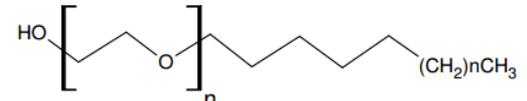


Figura 2. Esquema del proceso de autoensamblado

En la Tabla (I) se muestran las dos moléculas anfifílicas que fueron utilizadas para generar óxidos mesoporosos en el presente trabajo.

Tabla I. Agentes moldeantes utilizados para la preparación de óxidos mesoporosos

Nombre (nombre comercial)	Estructura
Copolímero tribloque (Pluronic y otros)	
Alquilpoli (óxidos de etileno) (Brij)	

Los materiales mesoporosos se preparan, entonces, combinando las reacciones sol-gel con el autoensamblado de moléculas anfifílicas. Para obtener un material mesoporoso ordenado es necesario que ambos procesos ocurran de manera concertada y que ambos bloques de construcción (micelas y óxido en formación) interactúen de manera adecuada.

La interacción entre el precursor inorgánico y el molde es crucial para controlar el material final obtenido. Esto se debe a que ambos componentes están en contacto a lo largo de la “interfaz híbrida” que es del orden de entre algunos cientos y 1000 m² por gramo.

2.3.3 Films delgados mesoporosos (Angelomé, 2008)

Un ejemplo 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 o en las interfaces agua-sustrato y agua-aire. Más adelante, se obtuvieron films mediante técnicas de evaporación controlada y dip coating. Esta última técnica de preparación permitió el desarrollo del *Autoensamblado Inducido por Evaporación (AEIE)* (Brinker *et al*, 1999) que permitió obtener films delgados mesoporosos de manera altamente reproducible.

Esta técnica fue desarrollada en 1997, por el grupo de Brinker, que 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 (Brinker *et al*, 1999). Un esquema de lo que ocurre durante el AEIE puede observarse en la Figura 3.

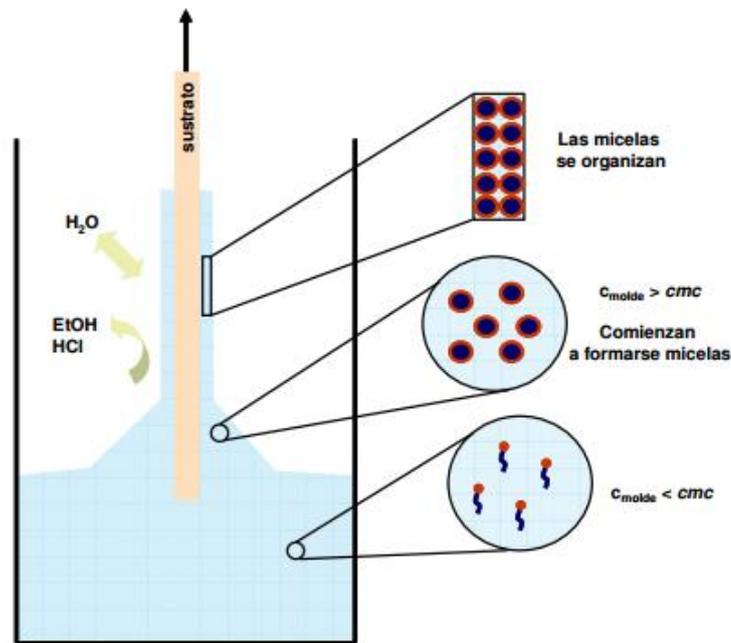


Figura 3. Esquema del proceso de obtención de los films mesoporosos mediante *Autoensamblado Inducido por Evaporación*

Para preparar un óxido mediante AEIE se parte de una solución de un precursor inorgánico y un agente moldeante en una mezcla agua/etanol (u otro solvente volátil), en la cual la concentración del molde es menor a la cmc. Es decir, la solución de partida es homogénea y no presenta micelas. A medida que el solvente se evapora (en el caso de *dip coating*, al extraer el sustrato), la concentración del agente moldeante aumenta en forma progresiva hasta que comienza el autoensamblado en micelas y, a mayores concentraciones, en cristales líquidos. En algún punto de la trayectoria, los agregados inorgánicos presentes en la solución interactúan con las micelas y se acomodan junto con éstas durante la evaporación del solvente. 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. Una vez que el film llegó a su espesor final aparece

una fase desordenada que luego de unos segundos evoluciona para dar lugar a la fase final ordenada.

La formación de una dada fase ordenada o no depende de muchas variables, siendo las principales:

- a) el precursor y su grado de condensación (en el caso de Si),
- b) el molde,
- c) la concentración de las especies presentes en solución y el espesor final del film que ésta determina,
- d) la velocidad de evaporación del solvente,
- e) la humedad ambiente.

Es necesario que ocurra la separación de fases y la organización de las micelas antes de que el medio se vuelva demasiado rígido (debido a la condensación y el aumento de la viscosidad por evaporación) como para que la transición desorden - orden tenga lugar (Soler Illia y Innocenzi, 2006).

2.4 Nanopartículas metálicas (Campbell y Xia, 2007; Mulvaney, 1996)

Una nanopartícula es un material que presenta todas sus dimensiones en escala nanométrica, generalmente tienden a ser esféricas y tienen un tamaño comprendido entre 1 y 100 nm. En esta escala se presenta una gran relación superficie/volumen, la superficie y las interfaces son importantes, se producen fenómenos biológicos y se dan ciertas propiedades que no se perciben en la escala macroscópica.

Entre las características más sobresalientes podemos mencionar:

- Predominan las fuerzas electrostáticas, de tipo Van der Waals (interacciones dipolares, puentes de H) y magnéticas
- Alta reactividad superficial
- Alta superficie específica (superficie del 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)

En el caso particular de las nanopartículas metálicas, aparecen las llamadas propiedades plasmónicas. Los plasmones superficiales localizados o resonancias plasmónicas que experimentan los metales son modos de oscilación coherente de los electrones de conducción acoplados a campos electromagnéticos incidentes.

El campo eléctrico de la radiación incidente induce la formación de un dipolo en la nanopartícula, originando asimismo una fuerza que tiende a compensarlo y recuperar la situación de equilibrio, de tal forma que solamente existe una única frecuencia de resonancia (para partículas esféricas). 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. El resultado de este fenómeno es que la luz incidente se absorbe y/o dispersa por la presencia de las nanopartículas, esto puede detectarse por espectrofotometría. Para nanopartículas de algunos metales (Ag, Au, Cu, y los metales alcalinos), la frecuencia de resonancia tiene lugar en la región visible del espectro electromagnético, dando lugar a colores muy intensos.

2.4.1 Nanopartículas de Ag: uso como bactericidas (Epple y Chernousova, 2012)

Se ha demostrado la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de Ag contra bacterias Gram + y Gram -, hongos y virus. No está establecido por completo cuál es el mecanismo de acción de las NPs contra los microorganismos. Se supone que tiene que ver con la interacción de las NPs con la pared celular, ADN, enzimas y proteínas de la membrana y la formación de especies reactivas del oxígeno. Otros autores plantean que los iones Ag^+ que se liberan de manera progresiva de la superficie de la NPs son responsables de ejercer las propiedades antimicrobianas.

En cuanto a la acción biológica de la plata debe considerarse que un catión de plata es un ácido suave de Lewis que tiene afinidad para el azufre y también para el nitrógeno. De este modo, tiene muchas posibilidades de perturbar procesos bioquímicos.

Además de la formación de sales de plata escasamente solubles (AgCl , Ag_2S), se plantea que el efecto adverso de iones de plata es debido a las interacciones con grupos tiol y amino de proteínas, con los ácidos nucleicos, y con las membranas celulares. La formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) también se observó para algunos casos. Al parecer la

formación de ROS en presencia de plata depende del tipo de célula implicada. Por tanto, ya que hay diferentes posibilidades de la plata para perturbar los procesos biológicos, una afirmación general sobre el origen de la acción tóxica de la plata no es posible.

En general, las células toman fácilmente las nanopartículas, las células no fagocíticas toman las nanopartículas de plata por endocitosis y macropinocitosis.

Al igual que todas las nanopartículas, las nanopartículas de plata son rápidamente recubiertas por una corona de proteínas si entran en un medio biológico. Esta corona influye claramente en la interacción con las células.

La plata metálica, las nanopartículas de plata, y las sales de plata poco solubles liberan iones de plata cuando entran en contacto con agua y estos iones de plata son el agente bioquímicamente activo.

Un trabajo sobre el análisis de las propiedades bactericidas de las NPs de Ag sobre *Escherichia coli* (Gram-) concluyó que el mecanismo de acción se debió a una acción sinérgica entre ROS extracelulares y la toxicidad de la Ag^+ , que indujo la producción de ROS intracelulares y la muerte celular subsiguiente. El soporte cargado con plata actúa como catalizador de oxidación, teniendo la capacidad de transformar el O_2 en diferentes especies como aniones superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radicales hidroxilo ($\cdot OH$). Las especies reactivas del oxígeno (ROS) extracelulares inducen la producción de ROS intracelulares y la muerte de las células. Por otra parte, la Ag^+ también colaboraría en la generación intracelular de ROS, que se produce a través de enzimas respiratorias por Ag^+ .

El contacto con el soporte cargado con plata produjo un efecto citostático en las bacterias implicando que la función motora del citoesqueleto estaba obstaculizada. Además, se ha indicado que las NPs de Ag^+ afectan la internalización de los receptores de membrana y la señalización celular y la expresión de la proteína.

La producción de ROS intracelulares provocó perturbaciones en la función fisiológica normal de proteínas de membrana, tales como canales o receptores, lo cual interfiere consecuentemente con el pool de protones en el espacio de la membrana o el flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, provocando la muerte celular. Los electrones acumulados podrían transferirse al oxígeno para formar ROS intracelulares, llevando al daño oxidativo. Como resultado de la destrucción de la pared celular y de la membrana celular de *Escherichia*

coli, se producen cambios en la permeabilidad dando lugar a fugas de los componentes intracelulares tales como K^+ (que juega un papel importante en la regulación del contenido de polisomas y la síntesis de proteínas), ácidos nucleicos y proteínas.

Como se mencionó anteriormente estos mecanismos fueron descriptos en base a ensayos utilizando *Escherichia coli*, como en el presente trabajo, no obstante, podrían observarse otros mecanismos de acción para otro tipo de microorganismos.

Los diversos estudios que analizan la posible toxicidad de estos materiales no arrojaron hasta el momento resultados concluyentes. La OMS indica efectos adversos no observados para los seres humanos para niveles de 10 g de plata a lo largo de toda la vida, lo que corresponde a una máxima concentración de plata en el agua corriente de 0,1 mg/L.

En la actualidad la mayoría de los productos en el mercado basados en nanomateriales incluyen plata y aprovechan sus propiedades desinfectantes (Vance *et al*, 2015).

La plata se utiliza en muchos casos para desinfección como recubrimientos, en estado iónico y como nanopartícula.

Se ha encontrado aplicación en muchos de los productos de consumo fuera del sector de la medicina, por ejemplo, en textiles o aerosoles para evitar los malos olores de la sudoración. La plata en forma de nanopartículas también se utiliza para instrumentos médicos, por ejemplo, para catéteres venosos, catéteres urinarios, catéteres de drenaje, en vendajes de heridas y quemaduras, bisturís y agujas.

2.5 Nanopartículas de Ag encapsuladas en films mesoporosos

Las NPs de Ag han sido sintetizadas por reducción química dentro de los mesoporos. Al formarse dentro de los poros, puede controlarse su tamaño, el cual puede variar según las condiciones de la reacción. Una vez formadas dentro de los poros, quedan protegidas de la oxidación al quedar cubiertas por el óxido.

La síntesis implica la impregnación de los mesoporos con $AgNO_3$ y la posterior reducción para producir las NPs. Como agente reductor se utilizó formaldehído, el cual evita que las partículas se agreguen entre sí mientras son agitadas ya que se repelen por repulsión electrostática.

La importancia de encapsular las NPs en films delgados de óxidos mesoporosos radica en que la prolongación del efecto de las NPs de Ag en una superficie requiere su inmovilización en una matriz robusta que permita su liberación progresiva.

La incorporación de NPs a óxidos porosos por el método de impregnación-reducción permite formar partículas metálicas cuyo tamaño y forma final depende del tamaño y forma de los poros usados como nano-reactores. Las partículas quedan encapsuladas dentro de los poros, lo que las protege de la oxidación, prolongando su durabilidad.

Los films delgados de óxidos mesoporosos, preparados por diversas técnicas de recubrimiento son particularmente atractivos como soportes, ya que pueden utilizarse para cubrir de manera eficiente materiales de diversa forma, composición y tamaño, pudiendo recubrir superficies de manera sencilla.

Otros grupos encapsulan nanopartículas en films mesoporosos para múltiples aplicaciones, aprovechando las características derivadas de la combinación de ambos compuestos, principalmente, la gran interfase entre el metal y el óxido. Éstas proveen nuevas propiedades catalíticas y ópticas que hacen a las NPs metálicas interesantes para su uso en campos como la fotocatalisis, sensores, producción de dispositivos que requieran confinamiento de luz y aplicaciones biológicas como fototerapia y diagnóstico de enfermedades (Angelomé y Liz-Marzán, 2014).

El grupo de la Gerencia Química de CNEA tiene mucha experiencia en la incorporación de nanopartículas de plata dentro de films delgados de óxidos mesoporosos. Por ejemplo, se ha aprovechado la diferencia de reactividad en la reducción de la plata sobre distintos soportes para sintetizar selectivamente NPs en una capa predeterminada de una multicapa mesoporosa permitiendo la ubicación espacial de objetos nanométricos. (Fuertes *et al*, 2009b). Además, se ha demostrado la posibilidad de generar patrones de NPs de Ag dentro de estructuras mesoporosas (Martínez *et al*, 2009) y se ha medido su conductividad eléctrica (Martínez *et al*, 2010). Finalmente, se ha demostrado la posibilidad de usar estos materiales compuestos como sensores basados en espectroscopia Raman (Wolosiuk *et al*, 2014).

En un PFI previo se demostró que las nanopartículas de Ag depositadas sobre films mesoporosos de TiO₂ y SiO₂ tienen actividad bactericida apreciable por contacto (Rodríguez y Yun, 2014). Sin embargo, la actividad bactericida en solución no pudo ser demostrada y se

verificó la importancia de obtener nanocompuestos con alta carga de NPs para mejorar la actividad obtenida.

3. HIPÓTESIS

Se conoce que la Ag presenta actividad bactericida, tanto como ion Ag^+ como preparada en forma de nanopartículas.

Se ha demostrado que las NPs de Ag depositadas sobre films mesoporosos de óxidos de silicio y titanio también ejercen su efecto antimicrobiano, al difundir desde los films al espacio circundante, permitiendo sintetizar recubrimientos porosos con propiedades bactericidas (Rodríguez y Yun, 2014).

En el presente trabajo de investigación se plantea mejorar la performance obtenida previamente, en base a la hipótesis de que mayor cantidad de NPs incluidas en los poros lleva a un mayor efecto bactericida. Esta hipótesis se pondrá a prueba mediante la utilización de otros óxidos, el aumento en el espesor de los films y el aumento de los tiempos de impregnación.

4. METODOLOGÍA

4.1 Síntesis de films mesoporosos

En la Figura 4 se muestran los pasos del proceso que se llevó a cabo para la preparación de los films:

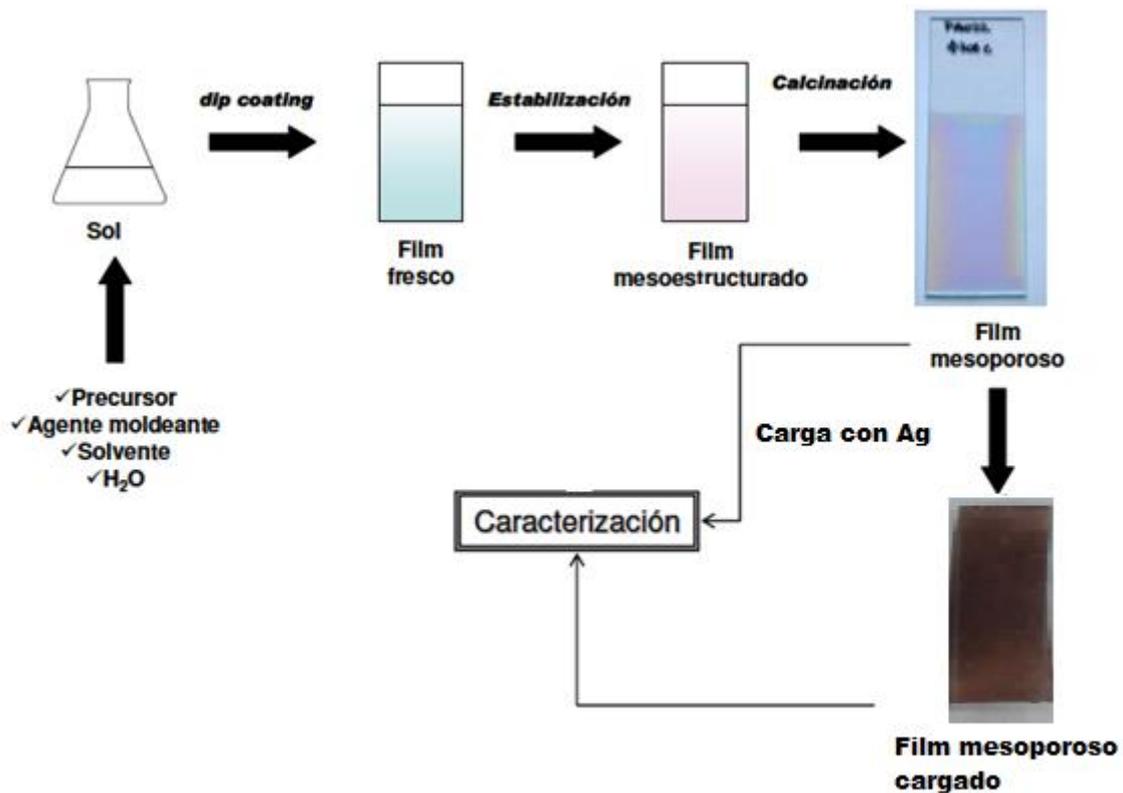


Figura 4: Esquema del proceso de obtención de films delgados mesoporosos

4.1.1 Preparación de los soles

Los soles fueron preparados para dar lugar a los distintos tipos de óxidos y todos incluyeron:

- precursores de los metales que formarán el óxido (TiCl₄, propóxido de Zr o tetraetóxido de Si)
- un agente moldeante, que da lugar a los poros, siendo las dos opciones utilizadas el copolímero dibloque Brij 58 y el copolímero tribloque Pluronic F127 (Figuras 5 y 6 respectivamente)

- un solvente volátil (etanol, EtOH)
- agua, que actúa como reactivo para la formación del óxido

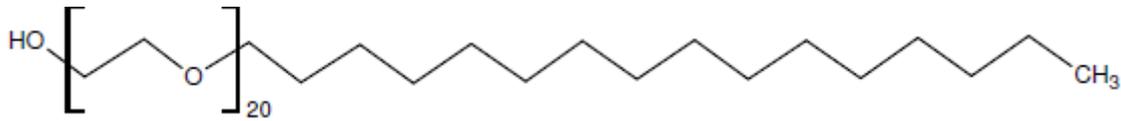


Figura 5: Estructura del agente moldeante Brij 58

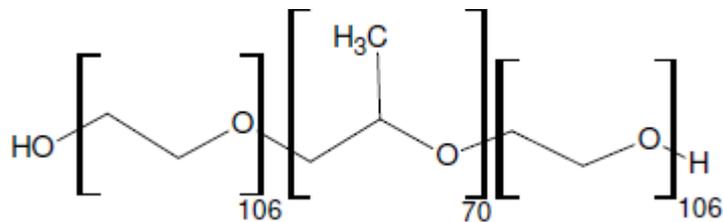


Figura 6: Estructura del agente moldeante F127

Todas las drogas utilizadas fueron de calidad pro análisis o superior y fueron utilizadas tal 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 utilizar 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°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 y procedimientos empleados para cada tipo específico de sol (Tabla II).

Tabla II: Reactivos empleados.

Agente moldeante	Copolímero tribloque Pluronic F127(Sigma) Copolímero dibloque Brij58 (Merck)
Solvente	Etanol absoluto (Biopack)
Precursor del metal	Si(OEt) ₄ , TiCl ₄ (sn en etanol 1:40) y Zr(propoxido) ₄ (Merck)
Catalizador	HCl (Merck)
Complejante	Acetilacetona (Aldrich)

En la Tabla III se muestran las proporciones de los soles utilizados a lo largo del trabajo; éstas han sido establecidas por el grupo de investigación de CNEA en base a experimentos anteriores, con resultados favorables (Angelomé *et al*, 2006; Soler Illia y Zelcer, 2013 y Angelomé *et al*, 2012).

Tabla III: Masas utilizadas para la preparación de los soles

	SiO ₂ -Brij58	SiO ₂ -F127
TEOS prehidrolizado	3.645g	3.645g
EtOH	17.046g	17.046g
Surfactante	0.562g	0.69g
HCl 5,5x10 ⁻² M	1.623g	1.623g

	ZrO ₂ -Brij58	ZrO ₂ -F127
Zr (propóxido) ₄	4.68g	4.68g
EtOH	18.43g	18.43g
Surfactante	0.56g	0.69g
Acetilacetona	1g	1g
HCl	1.04g	1.04g
H ₂ O	3.6g	3.6g

	TiO ₂ -Brij58	TiO ₂ -F127
TiCl ₄ (sn en etanol 1:40)	20g	20g
Surfactante	0.56g	0.69g
H ₂ O	1.8g	1.8g

4.1.2 Preparación del soporte

Como soporte para la preparación de los films se utilizaron portaobjetos de vidrio, los cuales se lavaron en primer lugar con una solución de agua corriente y detergente, utilizando una escobilla redonda para separarlos entre sí. Luego, se colocaron en un recipiente conteniendo agua corriente. En segundo lugar, se pasaron a otro recipiente con agua tratada por ósmosis inversa, se descartó y se repitió este paso tres veces en total. Finalmente, se

lavaron uno por uno con agua E-pure y se los colocó en una estufa a 130°C hasta su completo secado.

Antes de depositar el film se los limpió uno por uno con un paño de papel embebido en acetona, para eliminar cualquier tipo de residuo y permitir la buena adhesión de los films.

4.1.3 Preparación de los films

La síntesis de los films se llevó a cabo mediante la técnica de *dip-coating*, utilizando un equipo (Figura 7) que permite introducir el soporte en la solución que contiene el sol, retirarlo a una velocidad controlada y dejarlo evaporar dentro de una cámara con humedad controlada. De esta manera, se evapora el solvente y se forma el recubrimiento por reacción de las especies presentes en la solución.

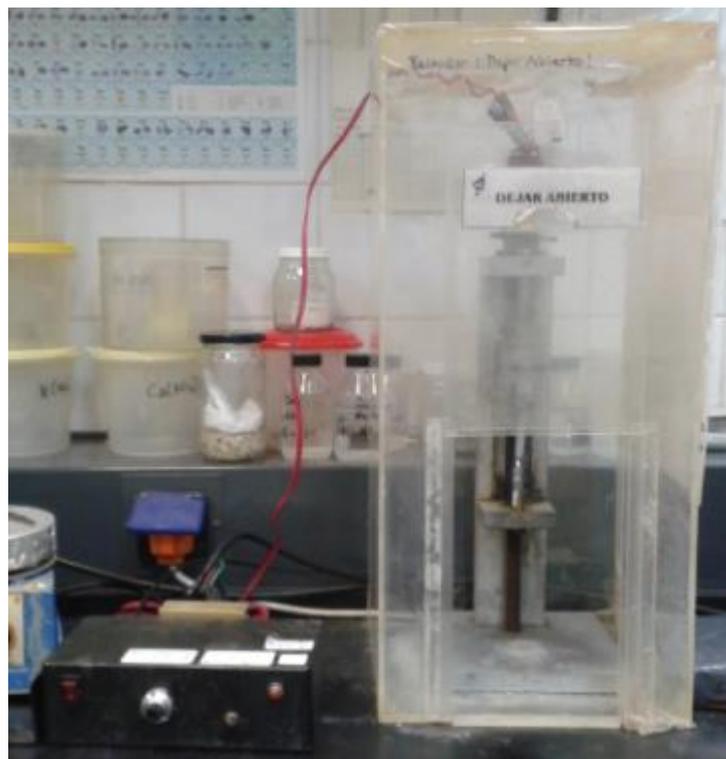


Figura 7: Equipo para realizar *dip-coating*

Las etapas del proceso se muestran en la Figura 8.

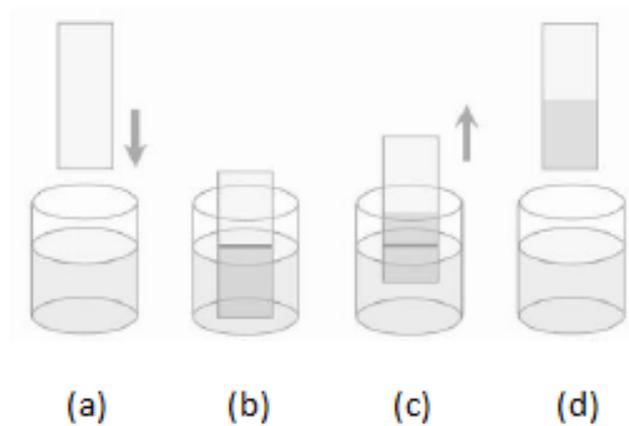


Figura 8: Esquema del proceso de *dip-coating*: a) inmersión en la solución, b) la zona a recubrir queda inmersa en la solución, c) inicio de la deposición, d) el film delgado se forma por evaporación del solvente y reacción de las especies presentes en la solución.

Debido a que la velocidad de extracción del soporte en la solución y la humedad relativa del medio ambiente influyen en el tipo de mesoestructura que se forma tanto como en el espesor del film, estos parámetros deben ser controlados (Angelomé, 2008).

El *dip-coater* de la Gerencia Química (CAC, CNEA) permite preparar films a velocidades constantes que pueden fijarse en valores que varían entre 0,5 y 4 mm/s. A mayor velocidad, mayor será el espesor del film obtenido. En el presente trabajo se sintetizaron films de SiO_2 , TiO_2 y ZrO_2 , utilizando velocidades de 2, 3 y 4 mm/s para todos los casos. Estas velocidades se seleccionaron en base a resultados previos obtenidos en el grupo de trabajo (Rodríguez y Yun, 2014). En total, a lo largo del trabajo, se prepararon al menos 10 films de cada una de las composiciones y velocidades.

Es preciso destacar que para la preparación del film de TiO_2 la solución se debió calentar a 37°C aproximadamente, a fin de disminuir la viscosidad, lo que permite obtener films uniformes. A su vez se realizó con una humedad relativa en el ambiente del 42%. Para el resto de los óxidos preparados no fue necesario controlar ni la temperatura del sol ni la HR ambiente.

Para llevar a cabo el proceso se fijó el portaobjeto mediante una pinza al brazo móvil del equipo colocando debajo del mismo un vaso de precipitado conteniendo el sol correspondiente. El brazo permite sumergir el portaobjetos en la solución y retirarlo a la misma velocidad, el sol se adhiere al vidrio y se deja evaporar durante un tiempo con la

cámara cerrada para evitar que la corriente de aire produzca cambios en el espesor del film, de este modo se obtiene un film de espesor uniforme.

4.1.4 Tratamiento posterior

Previamente a la eliminación del agente moldeante se llevaron a cabo una serie de pasos para estabilizar la estructura obtenida. De este modo el etanol y el ácido se eliminan de manera gradual aumentando el grado de polimerización de la red inorgánica y se optimiza la separación de fases entre el agente moldeante y el óxido (Angelomé, 2008).

En primer lugar, se colocaron los films durante un día en una cámara conteniendo una solución saturada de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) la cual permite mantener una humedad relativa controlada en 50%. Al día siguiente se colocaron en una estufa a 60°C durante 24 horas, transcurrido este tiempo se elevó la temperatura a 130°C y se dejó durante otras 24 horas.

Finalmente se procedió a la calcinación, para eliminar el molde. Para ello se utilizó una mufla (INDEF) que permite aumentar la temperatura de manera gradual. El equipo se seteó de manera de elevar la temperatura a una velocidad de $1^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, hasta alcanzar 350°C . Esta temperatura se mantuvo durante dos horas para eliminar completamente la materia orgánica. El enfriamiento se realizó por convección dentro del horno.

4.1.5 Incorporación de las nanopartículas de Ag

En la Tabla IV se detallan las distintas condiciones ensayadas para cada tipo de óxido y la concentración de la solución de AgNO_3 utilizada para incorporar NPs a los films.

Tabla IV: Condiciones ensayadas para la carga de NP de Ag en los distintos óxidos

	Concentración de AgNO_3 (M)	Tiempo de impregnación (min)	Velocidad de preparación del film (mm/s)
Films de SiO_2	0,2	10 - 20 - 30	2 - 3 - 4
Films de ZrO_2	0,2	10 - 20 - 30	2 - 3 - 4
Films de TiO_2	0,01	10 - 20 - 30	2 - 3 - 4

Para preparar la solución 0,01 M se pesaron en una balanza analítica 0,041 g de AgNO_3 (99% de pureza, Sigma-Aldrich), se colocaron en un matraz aforado de 25 ml y se

llevó a volumen con agua E-pure. Para la solución 0,2 M se realizó el mismo procedimiento, pesando 0,849 g de la sal.

Una vez obtenida la solución de AgNO_3 , se preparó a partir de la misma la solución en la cual se incorporaron las NPs de Ag a los films sintetizados. Para ello se pesaron en la balanza analítica 1,5 g de la solución de AgNO_3 y 1,5 g de etanol absoluto y se colocaron juntos en agitación para homogeneizar la mezcla de ambos reactivos. Luego se añadieron 0,6 g de formaldehído (Cicarelli) al 7% como agente reductor.

La solución así obtenida se mantuvo en agitación y se sumergió el film durante los distintos tiempos especificados en la Tabla IV. 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 (AgNO_3), y su posterior reducción para dar lugar a las NPs de Ag.

Luego se sacaron de los pocillos con una pinza, se los enjuagó con etanol y se los colocó sobre papel absorbente unos minutos y se prosiguió con la caracterización.

4.2 Caracterización

4.2.1 Medidas del espesor

El espesor y la porosidad de los films son variables fundamentales a la hora de interpretar resultados y pensar en aplicaciones. 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 Δ y Ψ mediante un modelo, obteniéndose como resultados el espesor y el índice de refracción del material (Fuertes, 2009.)

4.2.2 Orden de los poros y composición

Para la caracterizar la estructura de poros de los materiales se utilizó microscopía electrónica de barrido. Para ello, se utilizó un equipo Field Emission ZEISS LEO 982 GEMINI, perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas (FCEN, UBA). Para determinar la composición de los materiales cargados con Ag, se utilizó espectrometría de Rayos X dispersiva en Energía (EDS), realizada en el mismo equipo.

Las muestras se prepararon colocando parte del film o desprendiéndolo con un bisturí, sobre una cinta conductora de carbón adherida a un soporte de aluminio para microscopia. En todos los casos, se cuantificó el contenido de cada uno de los elementos en zonas amplias y puntuales de la muestra. Para informar el contenido total de cada elemento se tomó el promedio de al menos cuatro mediciones, realizadas en diferentes sectores de la muestra.

4.2.3 Espectroscopia Ultravioleta - Visible

Se realizaron medidas de espectro de absorción en la región ultravioleta - visible para observar la formación de los plasmones característicos de las nanopartículas de Ag. De esta manera se puede determinar si las NPs metálicas se han incorporado en el soporte mesoporoso.

Utilizando una punta de diamante y una pinza se procedió a cortar en trozos pequeños cada film sintetizado. Luego, para realizar las medidas, se colocaron los films 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.

En todos los casos, al tratarse de films delgados adheridos a sustratos transparentes pueden aparecer efectos de interferencia debido al espesor, que modifican el espectro observado. Es por esto que es fundamental la correcta alineación de las muestras y una buena elección del blanco para minimizar este efecto. En todas las medidas mostradas, se ha utilizado como blanco un film sin cargar, de la misma composición y espesor que el estudiado.

4.3 Evaluación de propiedades bactericidas

Se llevó a cabo un precultivo bacteriano teniendo en cuenta el volumen necesario para realizar el experimento. Se prepararon 3 tubos Eppendorf conteniendo cada uno de ellos 2 mL de medio LB (Tabla V) y 100 μ L de inóculo bacteriano, los cuales se dejaron incubar “*overnight*” a 37°C con agitación constante a 180 rpm. 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.

Tabla V: Fórmula de medio LB en gramos por litro de agua destilada. pH 7.2 ± 0.2

Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de caseína	10.0

Como paso previo para efectuar los experimentos en placa y en solución, se realizaron ensayos preliminares para ajustar la concentración de inóculo a utilizar. Se prepararon diluciones seriadas al 1/10, diluyendo 100 μL de la solución del cultivo bacteriano preparado (en fase exponencial de crecimiento) en 900 μL de medio LB.

En seis placas de Petri diferentes se sembraron las diluciones desde 10^{-3} hasta 10^{-8} a fin de determinar cuál sería la óptima para realizar los experimentos en cuanto al crecimiento bacteriano desarrollado. En las diluciones más concentradas se observó una gran cantidad de unidades formadoras de colonias lo que dificultaría la clara visualización y en las más diluidas no había crecimiento suficiente para probar el efecto bactericida de los films. Este procedimiento se realizó por triplicado. Finalmente, se fijó en 10^{-5} la dilución óptima a utilizar para realizar los ensayos posteriores tanto en placa como en solución.

4.3.1 Ensayos en Placa

Estos ensayos tienen por objetivo evaluar cualitativamente el efecto bactericida por contacto de los films cargados con nanopartículas de Ag, comparándolos entre sí y con los óxidos sin Ag.

En primer lugar, se prepararon las placas sobre las cuales se llevaron a cabo los ensayos para evaluar el crecimiento bacteriano. La mezcla agar - LB se extrajo del autoclave, se dejó enfriar y se distribuyó en las diferentes placas. Las placas se mantuvieron bajo la cabina de flujo laminar hasta su solidificación y luego se rotularon con los criterios correspondientes (tipo de film, dilución sembrada).

Una vez disponibles las placas, se sembraron 100 μL de solución bacteriana diluida al 10^{-5} cuya absorbancia fue de aproximadamente 0,200 (fase exponencial de crecimiento).

Finalmente se colocó el film blanco o film tratado en el centro, y se dejaron incubar a 37°C durante 24 horas.

Para evaluar el efecto bactericida se tomaron fotografías de las placas y se hizo un análisis digital de la imagen del área de la placa sin crecimiento de colonias bacterianas, para esto se trazó una elipse, se midieron los radios mayor (1) y menor (2) y se calculó la superficie mediante la ecuación (4):

$$A=\pi. \text{radio } 1. \text{radio } 2 \quad (4)$$

El mismo se comparó con una placa con un film control (sin Ag), con los diferentes agentes moldeantes, a las distintas velocidades seleccionadas para cada uno de los óxidos.

Tras 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 de lisis formados no sufrieron ninguna alteración (expansión/reducción).

4.3.2 Ensayos en solución

Estos ensayos tienen por objetivo evaluar cualitativamente el efecto bactericida sobre una suspensión bacteriana de los films cargados con nanopartículas de Ag, comparándolos entre sí y con los óxidos sin Ag.

Luego de preparar el precultivo, se lo colocó en cubetas de cuarzo junto con un film, cargado ó blanco, y se realizaron lecturas cada 30 minutos de densidades ópticas (DO) en un espectrofotómetro seteado a 600 nm (laboratorios UADE), en ese momento se extraía el film y se agitaba la cubeta. En el tiempo entre lecturas las cubetas fueron colocadas en una estufa a 37°C (temperatura óptima de crecimiento de las bacterias). Las mediciones fueron realizadas cada 30 minutos durante 4 horas y luego de 24 horas después de la primera lectura.

A partir de los datos obtenidos se realizaron gráficos de la densidad óptica en función del tiempo para cada tipo de film con su respectivo blanco a fin de evaluar el efecto de las NPs de Ag cargadas dentro del film sobre el crecimiento bacteriano.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterización de los films

5.1.1 Films mesoporosos: estructura y espesores

En las Figuras 9 a 14 se muestran imágenes seleccionadas de Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) obtenidas para los distintos films sintetizados.

Basados en ensayos preliminares se sabe que los films obtenidos a partir de un mismo sol presentan la misma estructura cuando son sintetizados a diferentes velocidades de *dip coating* (Angelomé, 2008). Por lo tanto, se tomaron fotografías a los films obtenidos a una única velocidad (2 o 4 mm/s). Las imágenes que se muestran a continuación son un ejemplo representativo de al menos diez medidas tomadas en distintas secciones de cada una de las muestras.

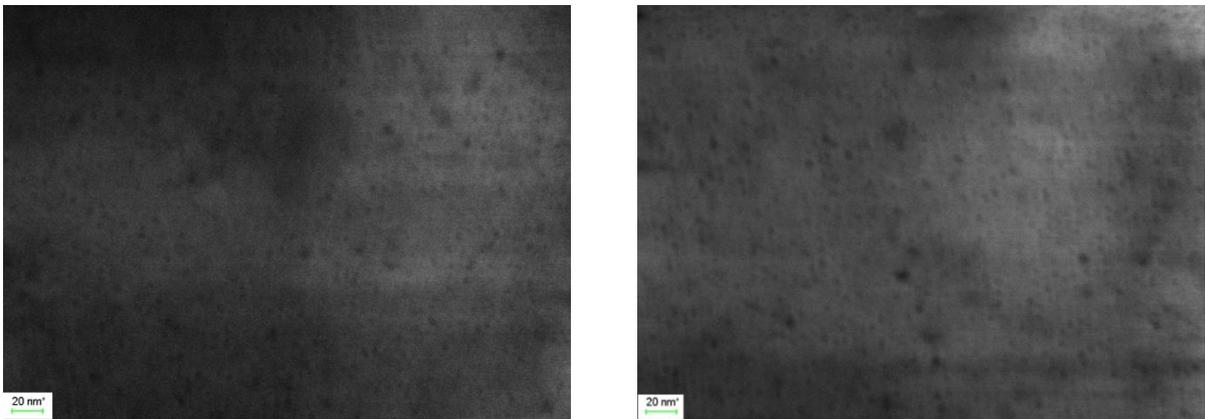


Figura 9: Imágenes SEM del film $\text{SiO}_2/\text{Brij 58}$ obtenido a 2 mm/s

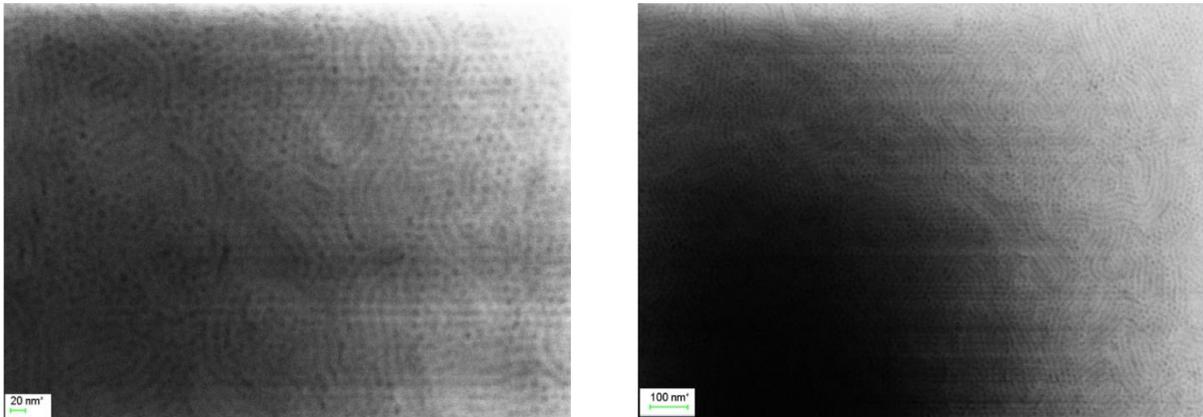


Figura 10: Imágenes SEM del film SiO_2 F127 obtenido a 2 mm/s

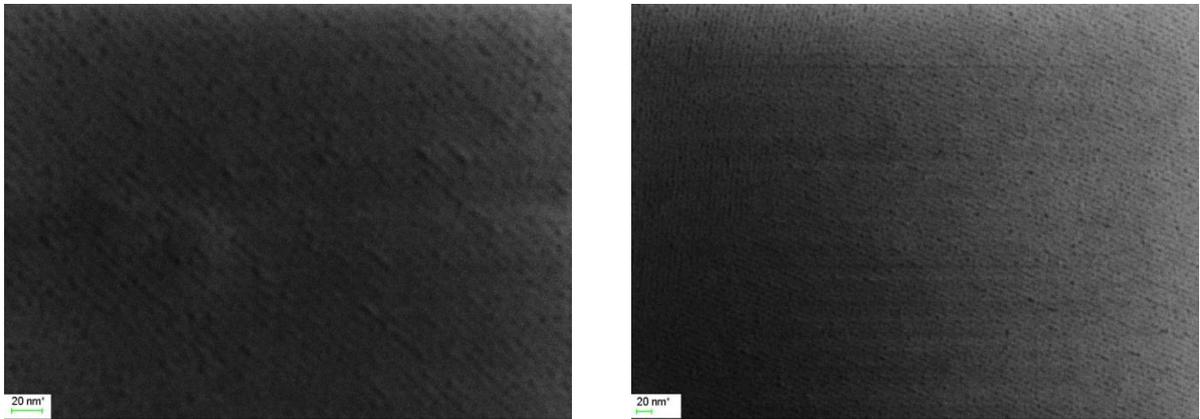


Figura 11: Imágenes SEM del film ZrO_2 Brij 58 obtenido a 2 mm/s

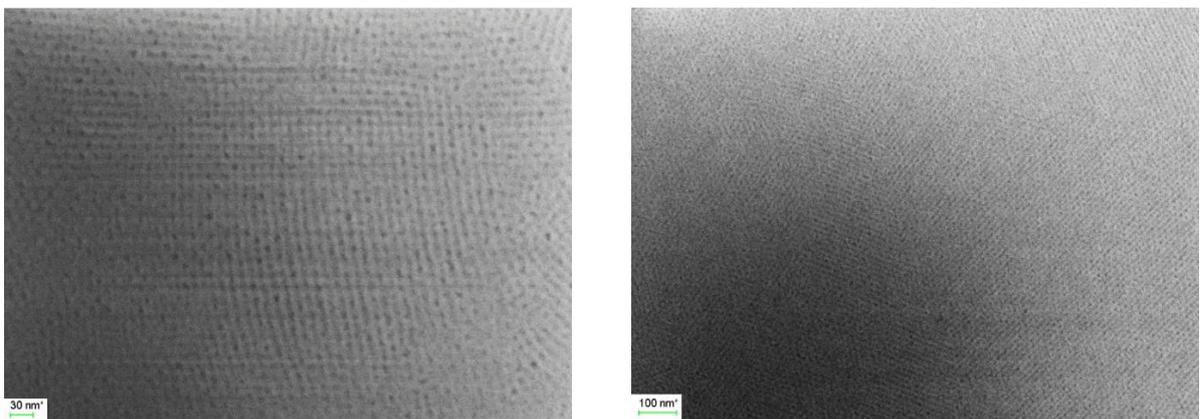


Figura 12: Imágenes SEM del film ZrO_2 F127 obtenido a 2 mm/s

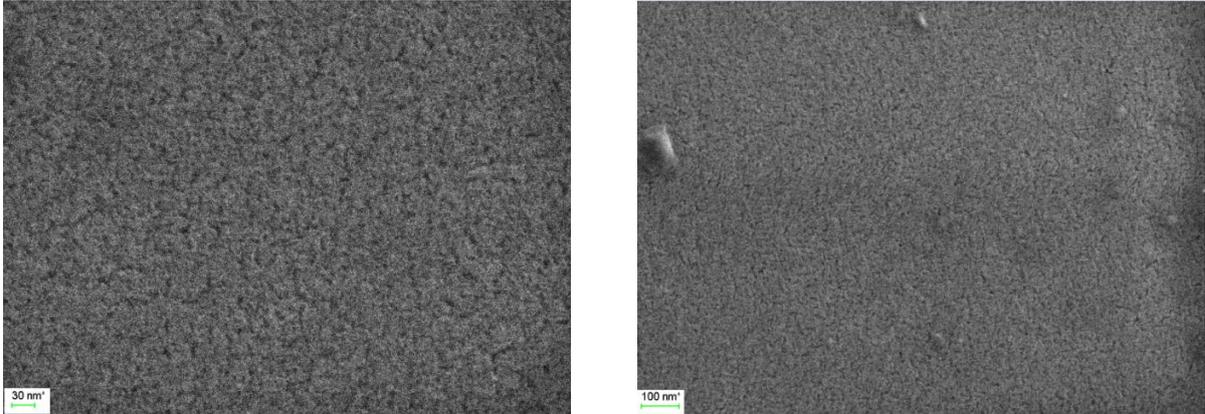


Figura 13: Imágenes SEM del film TiO_2 Brij 58 obtenido a 2 mm/s

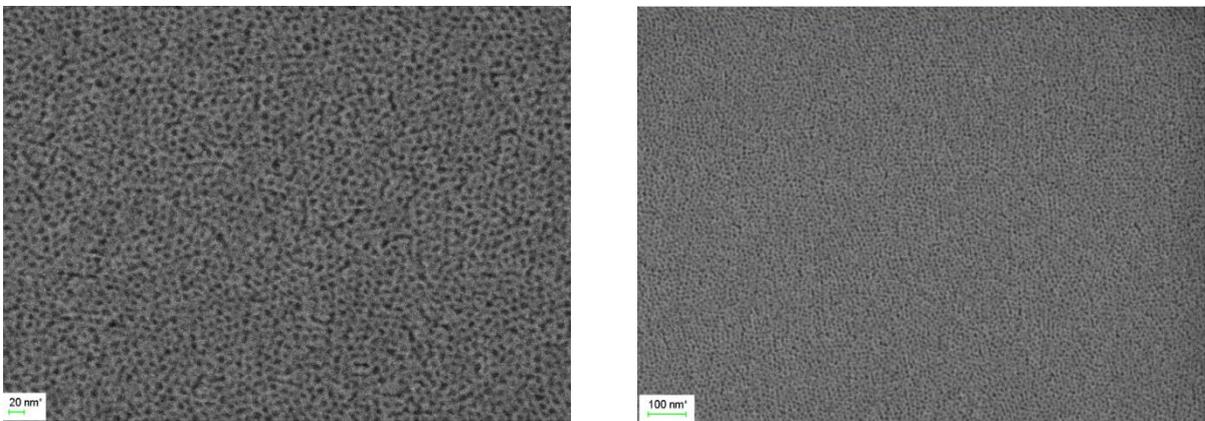


Figura 14: Imágenes SEM del film TiO_2 F127 obtenido a 4 mm/s

Para todas las muestras se observan arreglos de poros en la superficie de los films, con mayor o menor grado de orden, dependiendo de la muestra. Se puede diferenciar el tamaño de los poros dependiendo del surfactante utilizado. Para Brij 58 los poros son más pequeños (y por lo tanto más difíciles de ver) que para los films moldeados con F127, que presentan tamaños de poro mayores. Estos resultados coinciden con los resultados obtenidos en estudios previos (Rodríguez y Yun, 2014). Es importante notar que, al presentar poros en la superficie, queda demostrado que es posible incorporar (y liberar) sustancias a partir de estos.

En la Tabla VI se muestran los espesores obtenidos mediante elipsometría, para todos los films sintetizados.

Tabla VI: Espesores obtenidos a distintas velocidades, para cada uno de los óxidos

Óxido	Velocidad de <i>dipcoating</i> (mm.s ⁻¹)	Espesor (nm)
SiO ₂ -Brij58	2	72 +/- 1
	3	85 +/- 1
	4	110 +/- 1
SiO ₂ -F127	2	89 +/- 1
	3	124 +/- 1
	4	145 +/- 1
TiO ₂ - Brij58	2	117 +/- 1
	3	157 +/- 1
	4	191 +/- 1
TiO ₂ - F127	2	185 +/-1
	3	219 +/- 1
	4	250 +/- 1
ZrO ₂ -Brij58	2	77 +/- 1
	3	93 +/- 1
	4	112 +/- 1
ZrO ₂ - F127	2	90 +/- 1
	3	109 +/- 1
	4	131 +/- 1

Se observa en todos los casos que a mayor velocidad se obtuvo mayor espesor del film, lo cual era esperable por las características de la técnica de *dip-coating*. Esto se debe a que el espesor obtenido depende del balance entre la fuerza de adhesión del sol a la superficie y la fuerza de gravedad. Por lo tanto, 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. (Angelomé, 2008).

Los espesores mayores se observan para los films de TiO₂, debido a que estos soles presentan mayor viscosidad (Angelomé, 2008).

Luego de observar estos resultados y con el fin de tener datos comparables, se eligieron para los posteriores análisis los films preparados a 4 mm/s de SiO₂ y ZrO₂ y a 2 mm/s de TiO₂. De esta manera, todos los films utilizados presentan espesores similares entre sí y, por lo tanto, es más sencilla la comparación de resultados.

5.2. Films cargados con NPs de plata

5.2.1 Espectroscopia UV-visible

En las Figuras 15 a 19 se puede apreciar el aspecto de algunos de los films obtenidos tras la carga con NP de plata. Se observa que a medida que aumenta la velocidad de síntesis, los films presentan una coloración más oscura. Ello es debido a que, a una mayor velocidad, el espesor del film es mayor y por lo tanto una mayor cantidad de NPs de Ag pueden incorporarse dentro del mismo porque hay una mayor cantidad de material soporte.

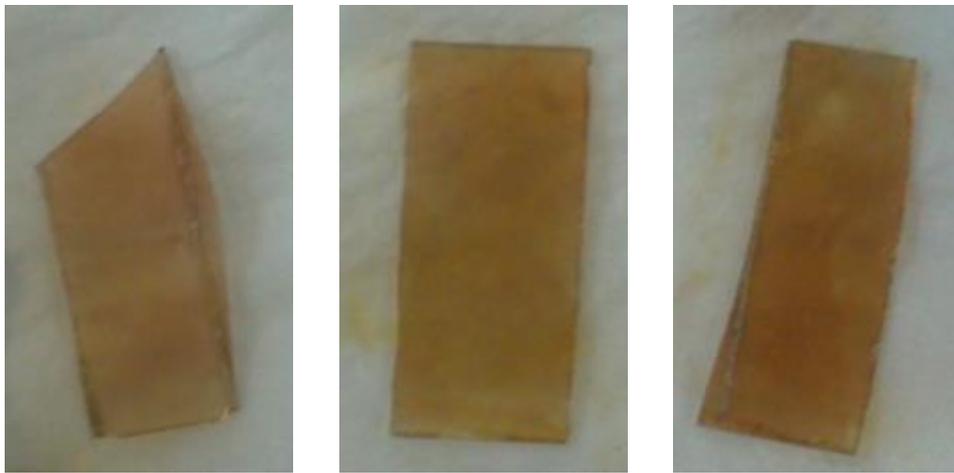


Figura 15: Films SiO_2 - F127, impregnados en Ag durante 30 min. A la izquierda se observa el film preparado a 2 mm/s, en el centro a 3 mm/s y a la derecha a 4 mm/s.

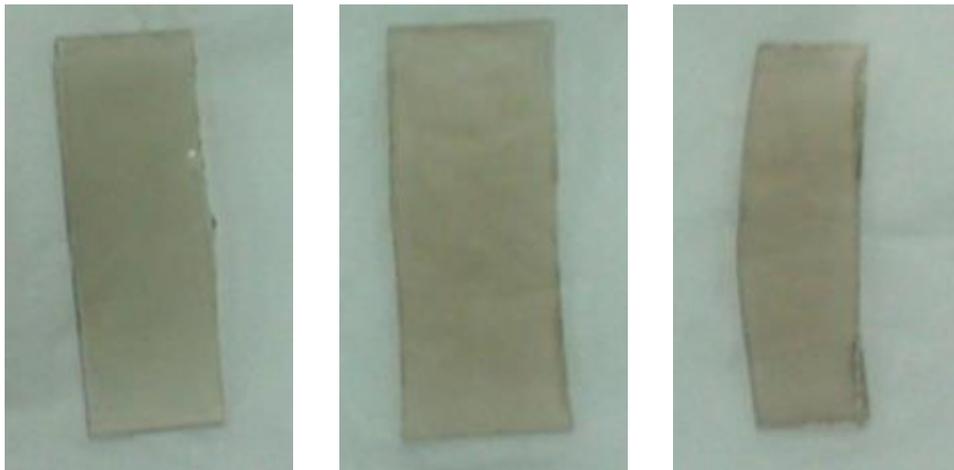


Figura 16: Films SiO_2 Brij 58, impregnados en Ag durante 30 min. A la izquierda se observa el film preparado a 2 mm/s, en el centro a 3 mm/s y a la derecha a 4 mm/s.

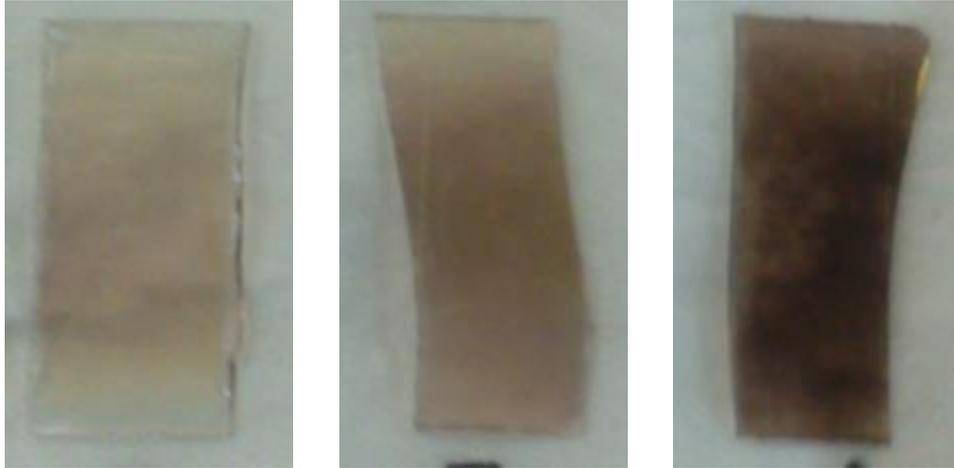


Figura 17: Films TiO₂ - F127, impregnados en Ag durante 30 min. A la izquierda se observa el film preparado a 2 mm/s, en el centro a 3 mm/s y a la derecha a 4 mm/s.

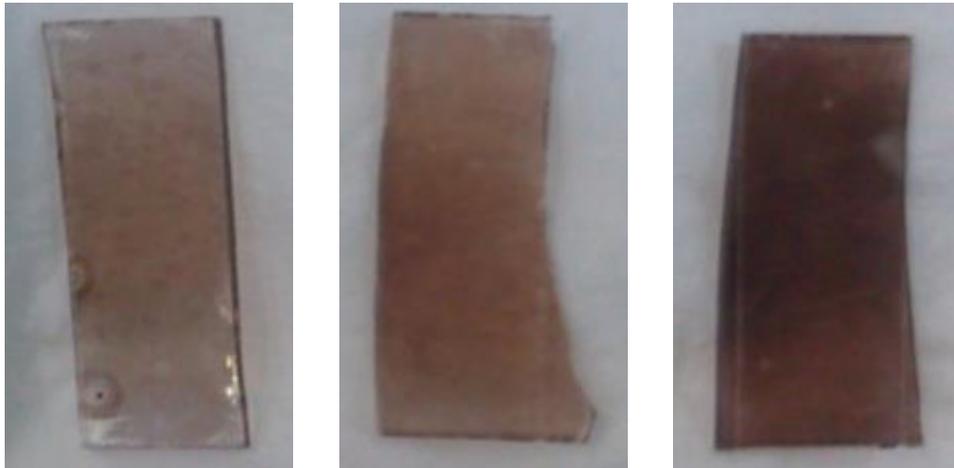


Figura 18: Films TiO₂ - Brij 58, impregnados en Ag durante 30 min. A la izquierda se observa el film preparado a 2 mm/s, en el centro a 3 mm/s y a la derecha a 4 mm/s.

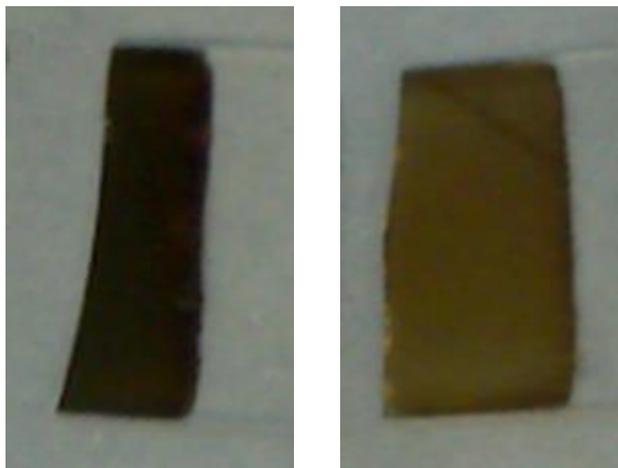


Figura 19: Films ZrO₂ - F127 (izquierda) y ZrO₂ -Brij 58 (derecha), impregnados en Ag durante 30 min preparados a 4 mm/s.

En las Figuras 20 a 37 se muestran los espectros de absorción en el rango 300-1000 nm, para los distintos tiempos de inmersión de cada film en la solución de AgNO_3 . A partir de estos espectros, es posible evaluar la incorporación de las NPs, monitoreando su banda plasmónica característica. A su vez, para cada tipo de óxido y cada tipo de surfactante, se grafican los espectros obtenidos para las diferentes velocidades de síntesis de los films. Los espectros que se muestran a continuación son un ejemplo representativo de al menos tres medidas tomadas en el espectrofotómetro.

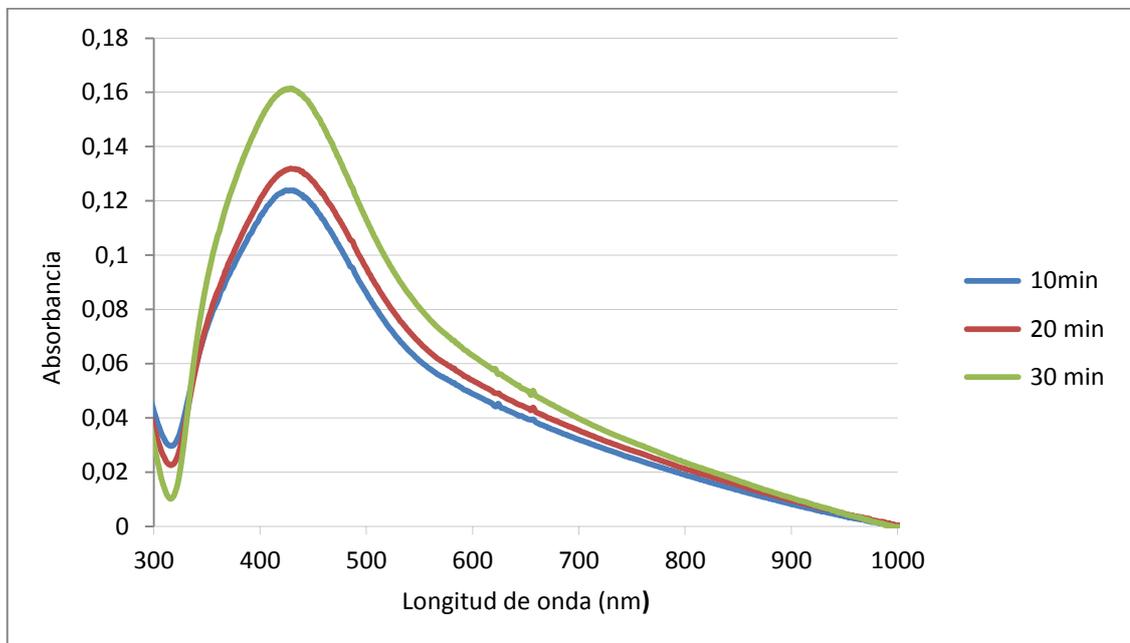


Figura 20: Espectros de absorción para el film SiO_2 -Brij 58 (2mm/s) $[\text{AgNO}_3] = 0,2 \text{ M}$

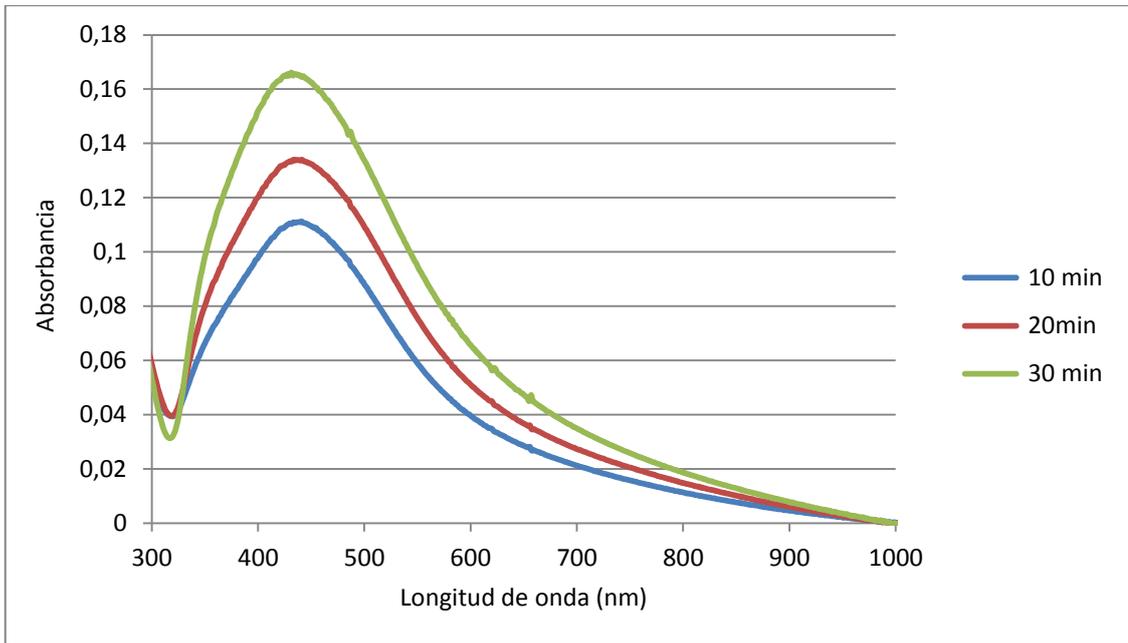


Figura 21: Espectros de absorción para el film SiO₂-Brij 58 (3mm/s) [AgNO₃] = 0,2 M

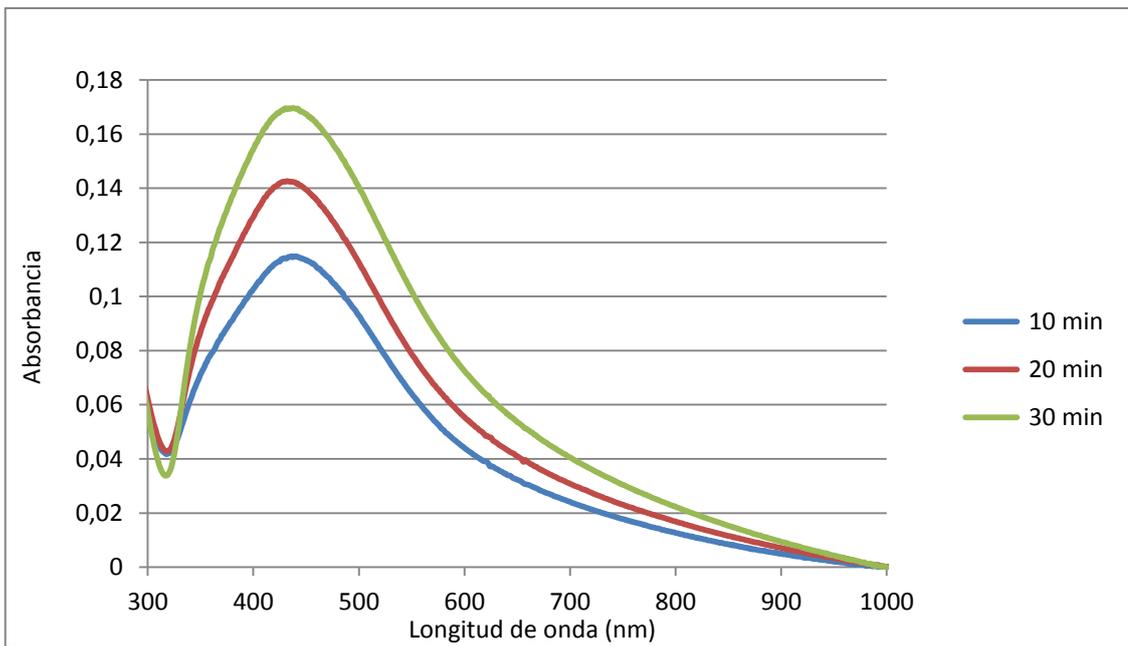


Figura 22: Espectros de absorción para el film SiO₂-Brij 58 (4mm/s) [AgNO₃] = 0,2 M

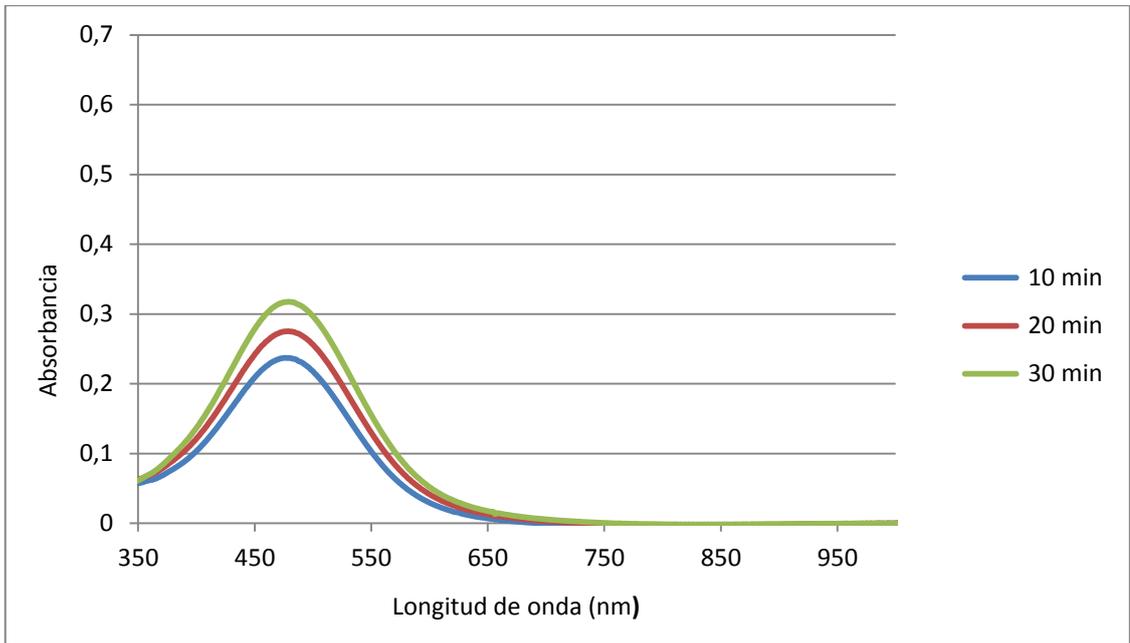


Figura 23: Espectros de absorción para el film SiO₂ – F127 (2mm/s) [AgNO₃] = 0,2 M

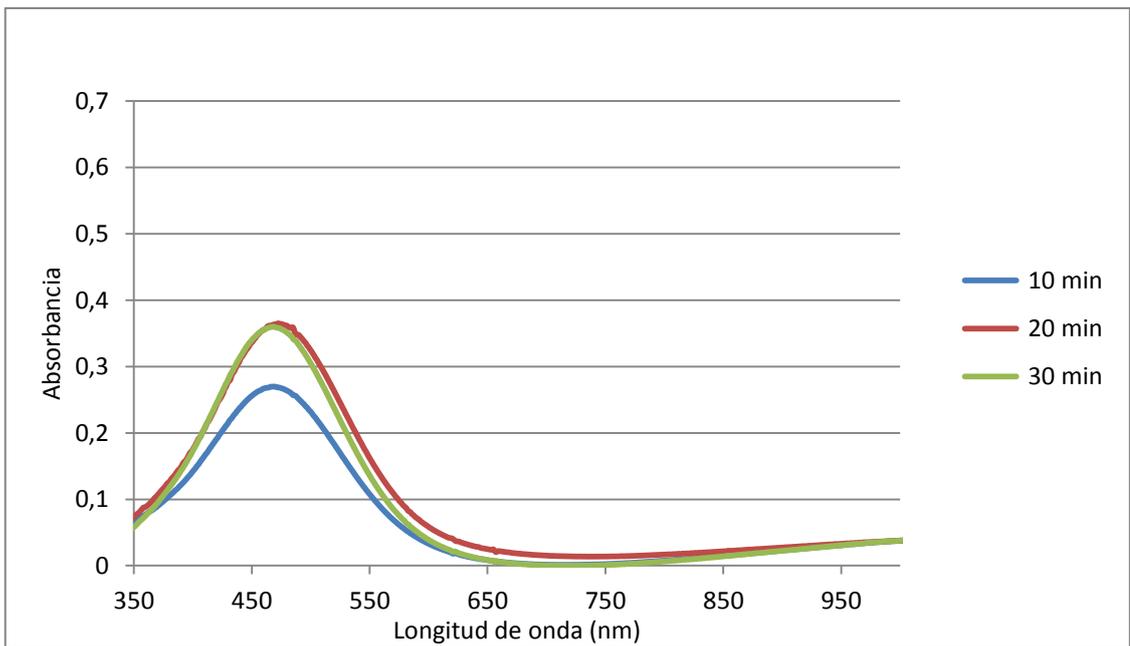


Figura 24: Espectro de absorción del film SiO₂ – F127 (3mm/s) [AgNO₃] = 0,2 M

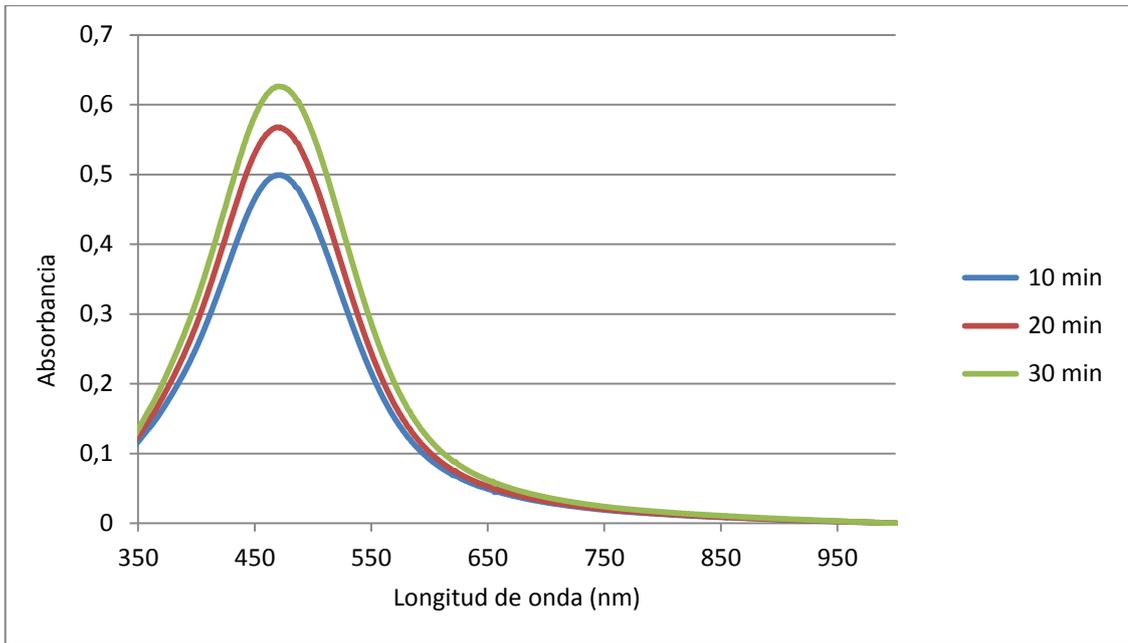


Figura 25: Espectros de absorción para el film SiO₂-F127 (4mm/s) [AgNO₃] = 0,2 M

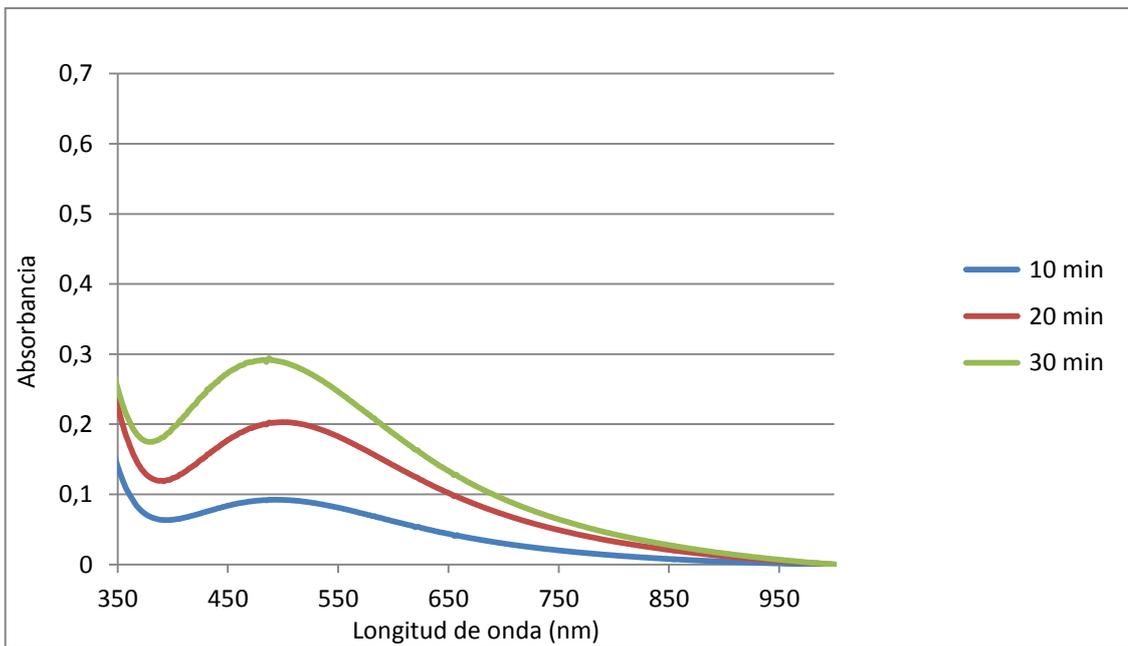


Figura 26: Espectros de absorción para el film TiO₂-Brij 58 (2mm/s) [AgNO₃] = 0,01 M

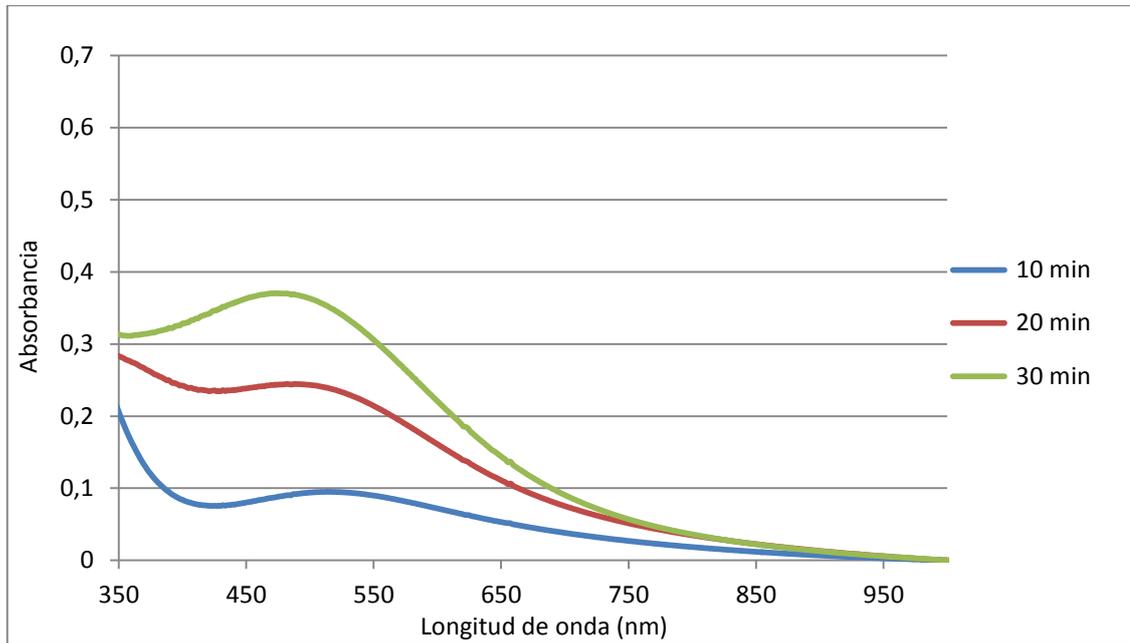


Figura 27: Espectros de absorción para el film TiO_2 -Brij 58 (3mm/s) $[\text{AgNO}_3]=0,01\text{M}$

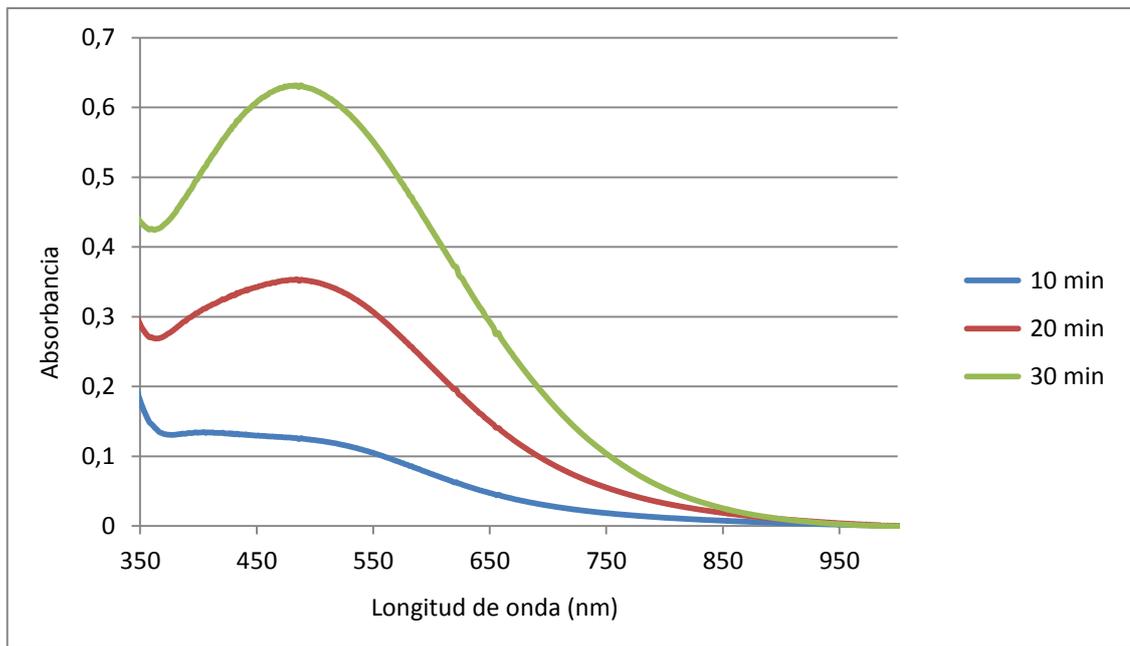


Figura 28: Espectros de absorción para el film TiO_2 -Brij 58 (4mm/s) $[\text{AgNO}_3]=0,01\text{ M}$

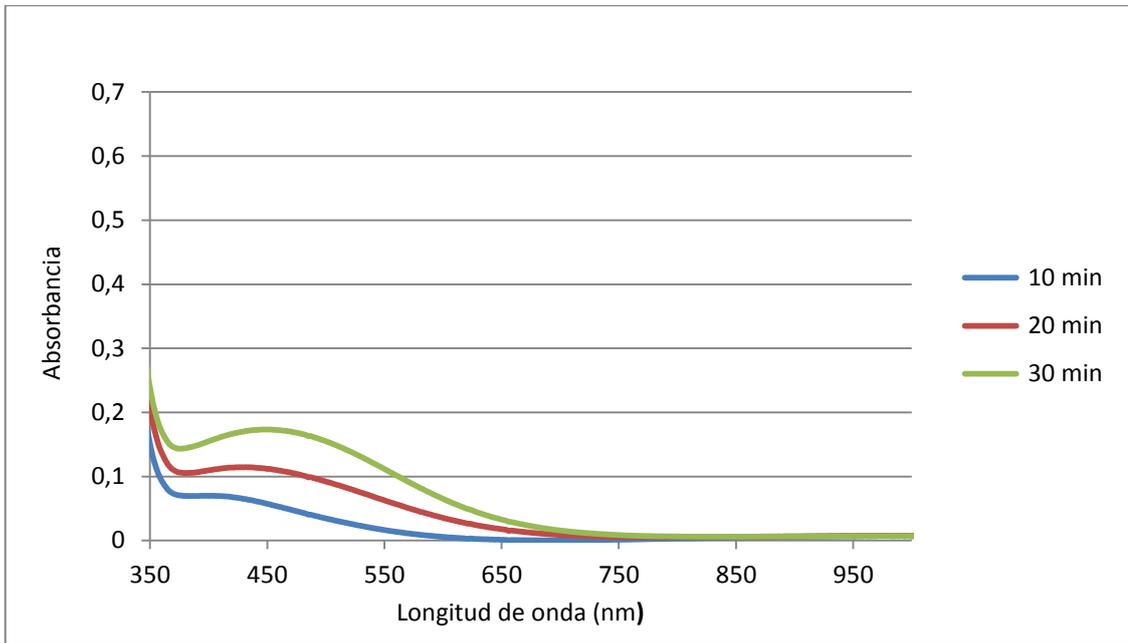


Figura 29: Espectros de absorción para el film TiO_2 – F127 (2mm/s) $[\text{AgNO}_3]=0,01$ M

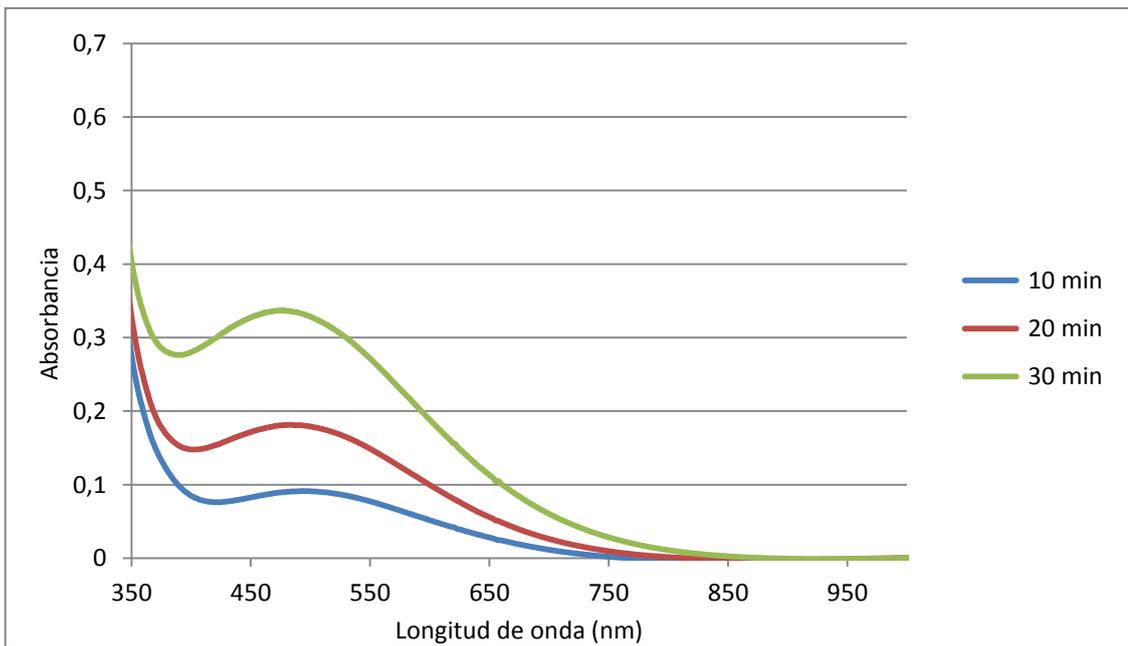


Figura 30: Espectro de absorción del film TiO_2 – F127 (3mm/s) $[\text{AgNO}_3] = 0,01$ M

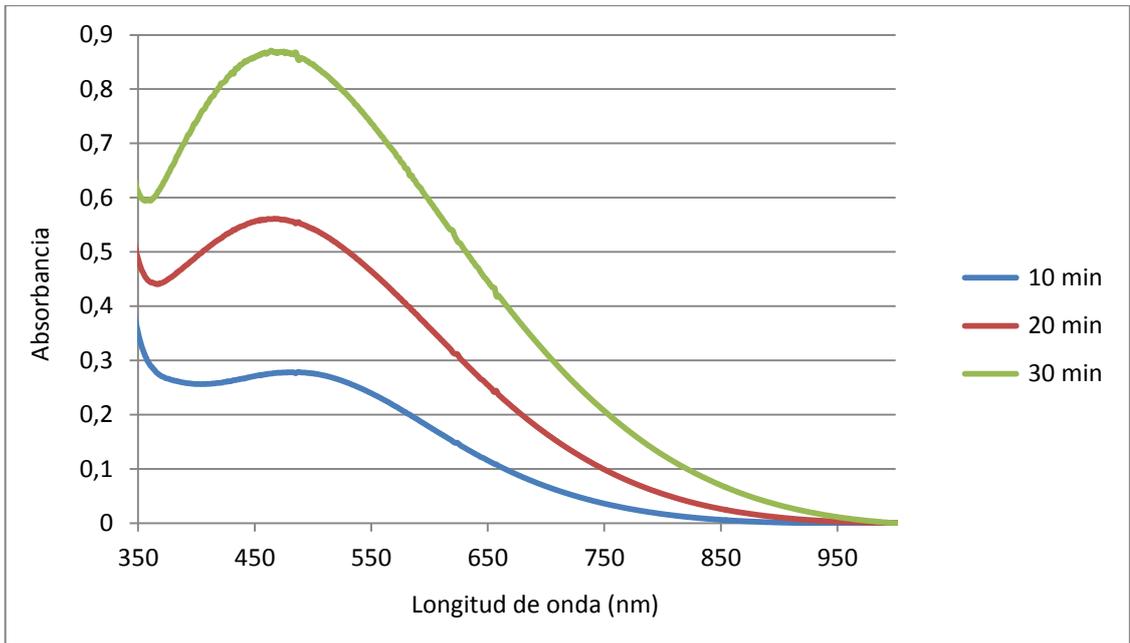


Figura 31: Espectros de absorción para el film TiO_2 -F127 (4mm/s) $[\text{AgNO}_3]=0,01 \text{ M}$

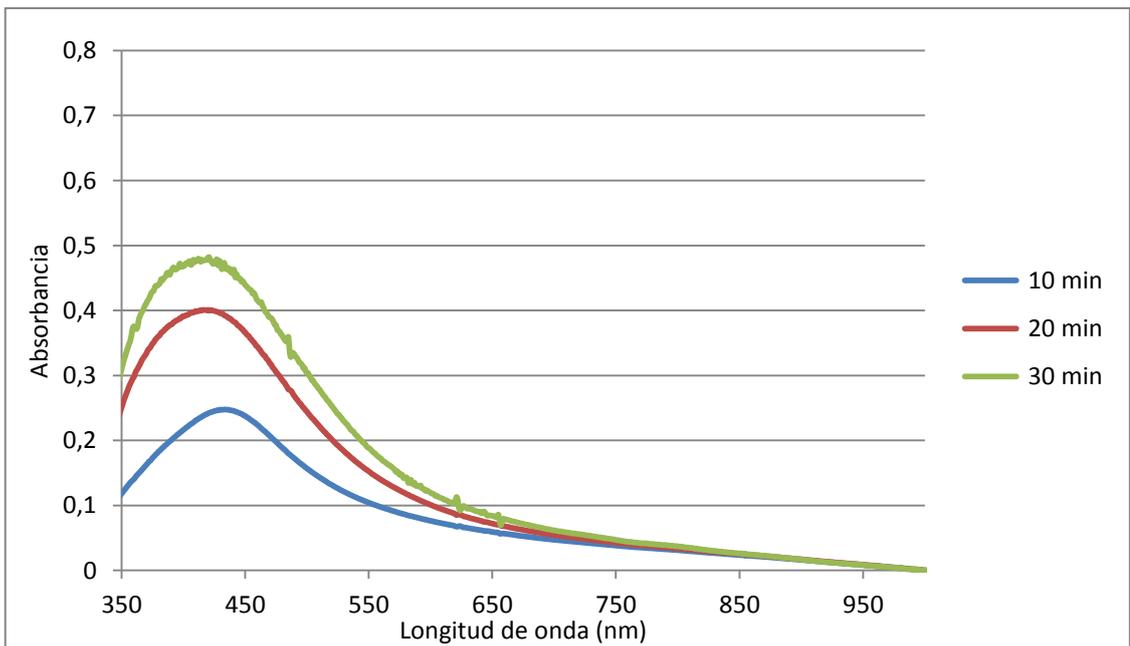


Figura 32: Espectros de absorción para el film ZrO_2 -Brij 58 (2mm/s) $[\text{AgNO}_3]=0,2 \text{ M}$

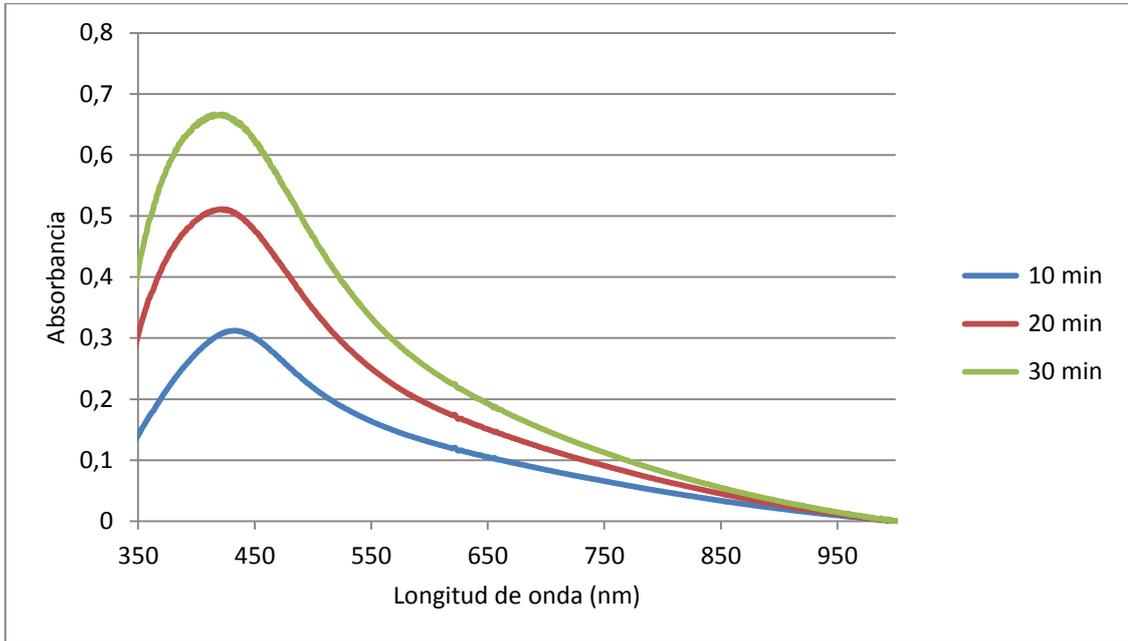


Figura 33: Espectros de absorción para el film ZrO_2 -Brij 58 (3mm/s) $[AgNO_3]= 0,2 M$

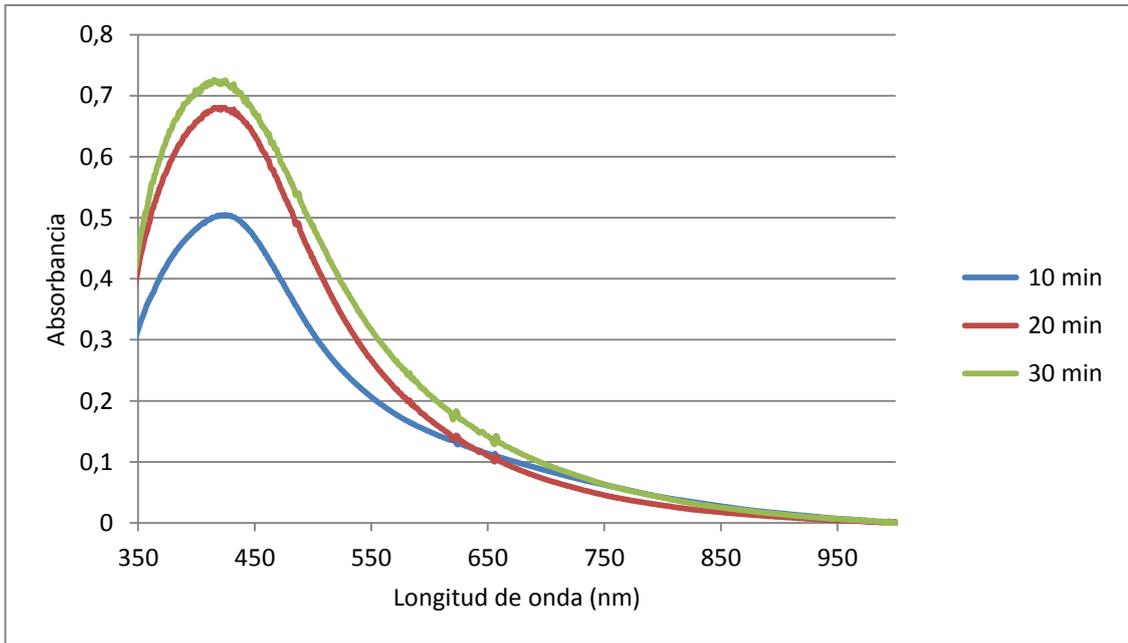


Figura 34: Espectros de absorción para el film ZrO_2 -Brij 58 (4mm/s) $[AgNO_3]= 0,2 M$

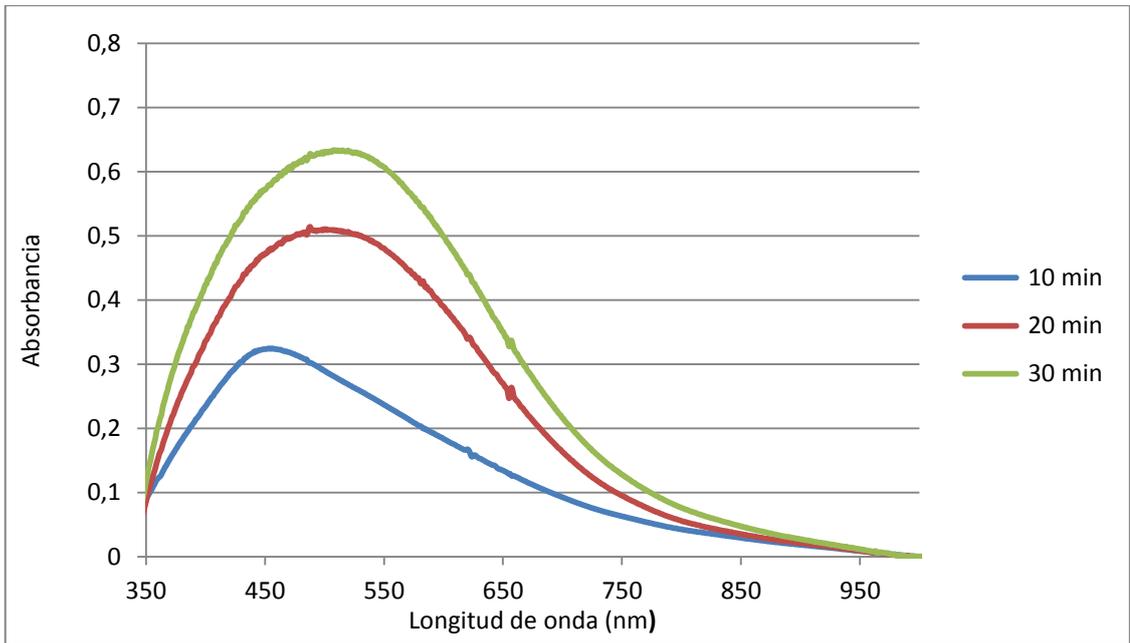


Figura 35: Espectros de absorción para el film ZrO_2 – F127 (2mm/s) $[AgNO_3] = 0,2 M$

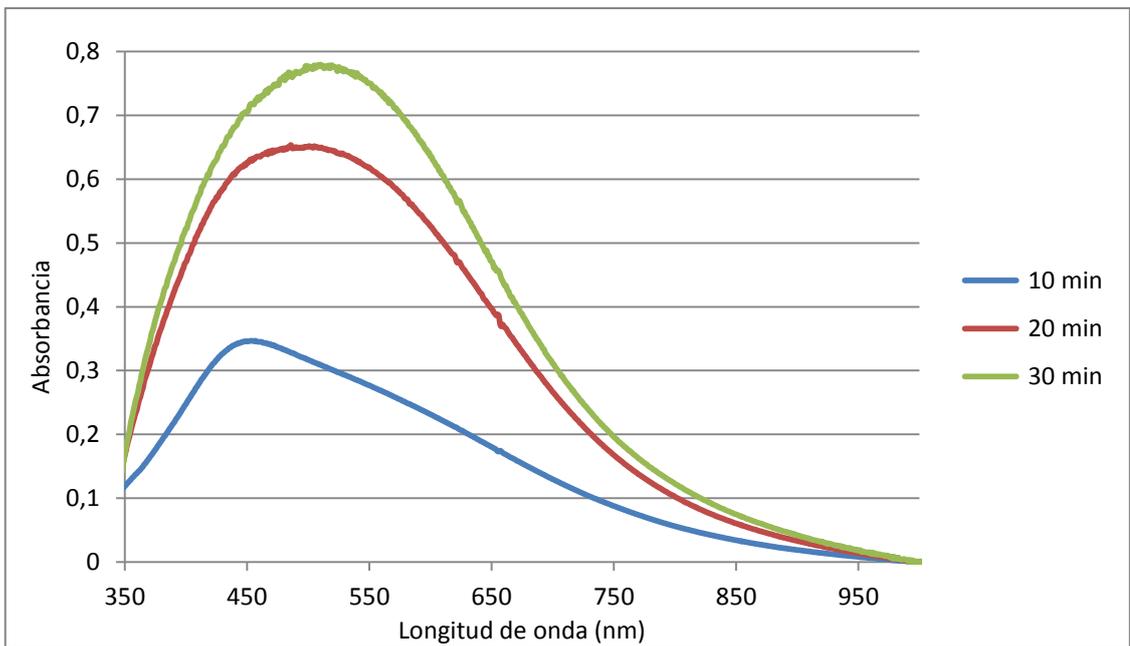


Figura 36: Espectros de absorción para el film ZrO_2 – F127 (3mm/s) $[AgNO_3] = 0,2 M$

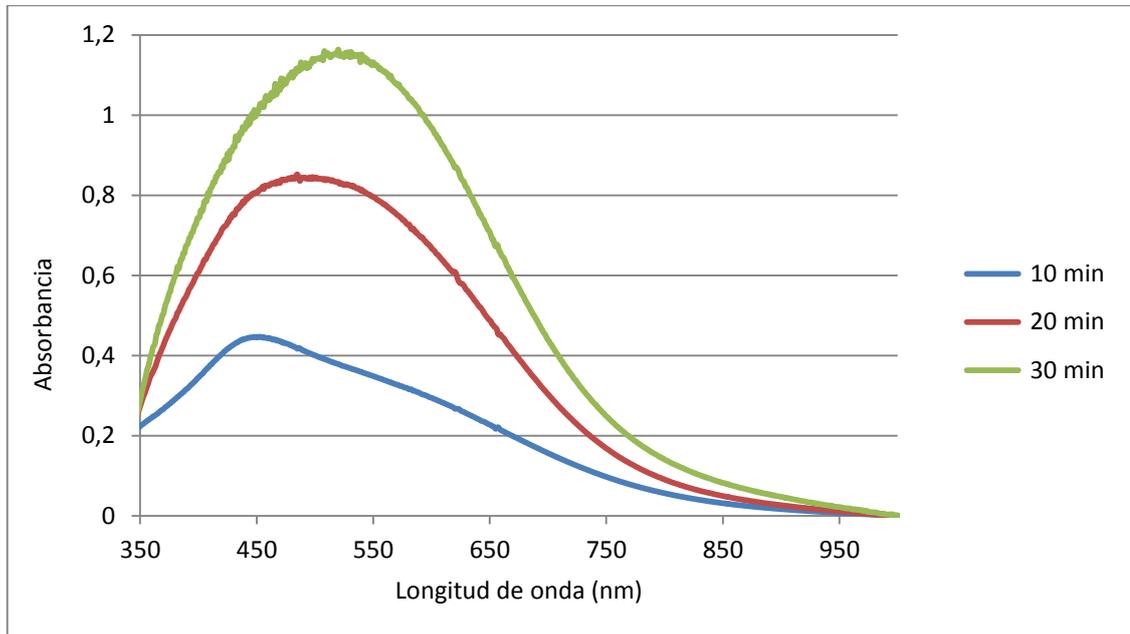


Figura 37: Espectros de absorción para el film $ZrO_2 - F127$ (4mm/s) $[AgNO_3] = 0,2 M$

A medida que aumenta el tiempo de reacción se observan dos tendencias: un aumento de la intensidad de la banda plasmónica, indicando la formación de mayor cantidad de nanopartículas contenidas en el film y un aumento del ancho de la banda, indicando la formación de partículas poli dispersas y muy cercanas entre sí (Fuertes, 2009; Rodríguez y Yun, 2014).

Por otro lado, puede analizarse que a medida que aumenta el espesor de los films se observa la formación de una mayor cantidad de Ag a un mismo tiempo. Este resultado está relacionado con la presencia de mayor cantidad de material y, por lo tanto, la presencia de más sitios para incorporar NPs y es coincidente con lo observado en las imágenes ópticas.

En la Figura 38 se representa una comparación de los espectros de absorción de los films preparados que se utilizaron en el ensayo de las propiedades bactericidas, a fin de poder visualizar las diferencias entre los distintos sistemas empleados.

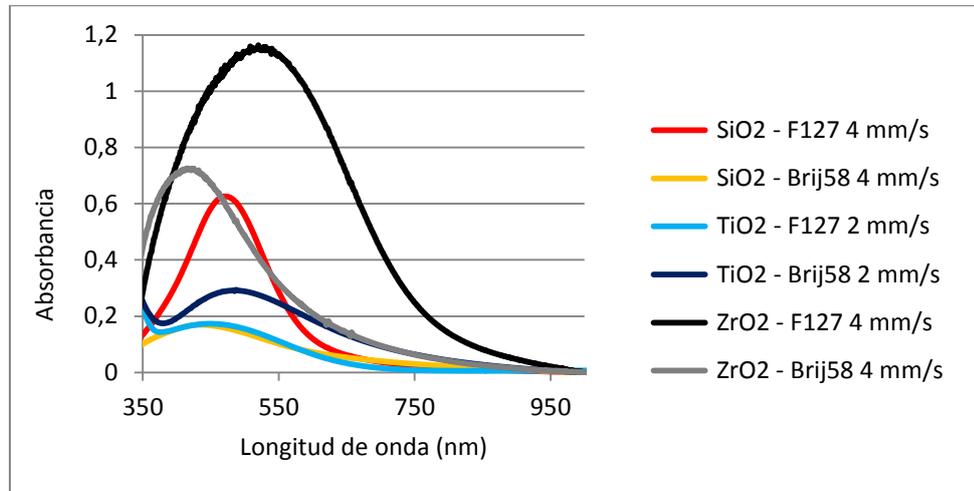


Figura 38: espectros de absorción comparados (tiempo de impregnación = 30 minutos)

Se observa claramente que la cantidad de Ag cargada es muy diferente entre los distintos sistemas sintetizados, siendo los de ZrO₂-F127 los que mayor cantidad de NPs incorporan.

5.2.2 Caracterización por EDS

Una vez incorporadas las NPs de Ag, se volvieron a efectuar medidas de microscopía electrónica de barrido, a fin de comprobar la carga de Ag dentro de los poros. A continuación, se muestran las imágenes obtenidas para los sistemas TiO₂-F127, ZrO₂-F127 y ZrO₂-Brij 58 (Figuras 39 a 41). Las imágenes mostradas son representativas de las características de las muestras y han sido seleccionadas de entre todas las imágenes tomadas (al menos 5 para cada muestra).

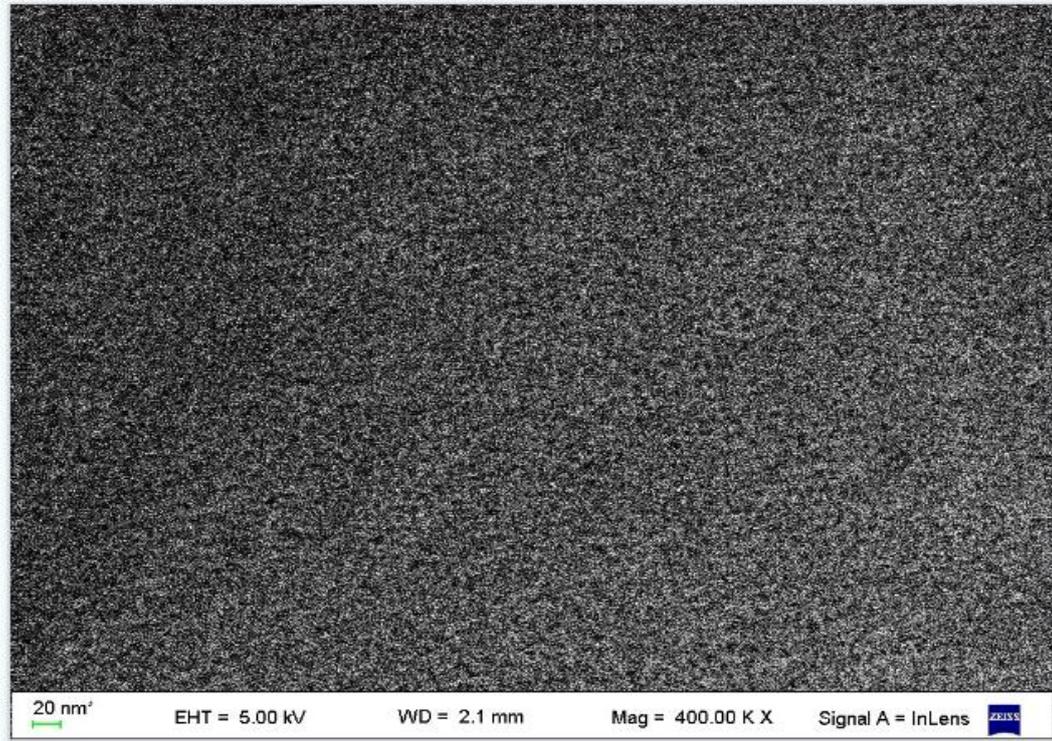


Figura 39: Imagen SEM del film TiO₂-F127 con NPs de Ag

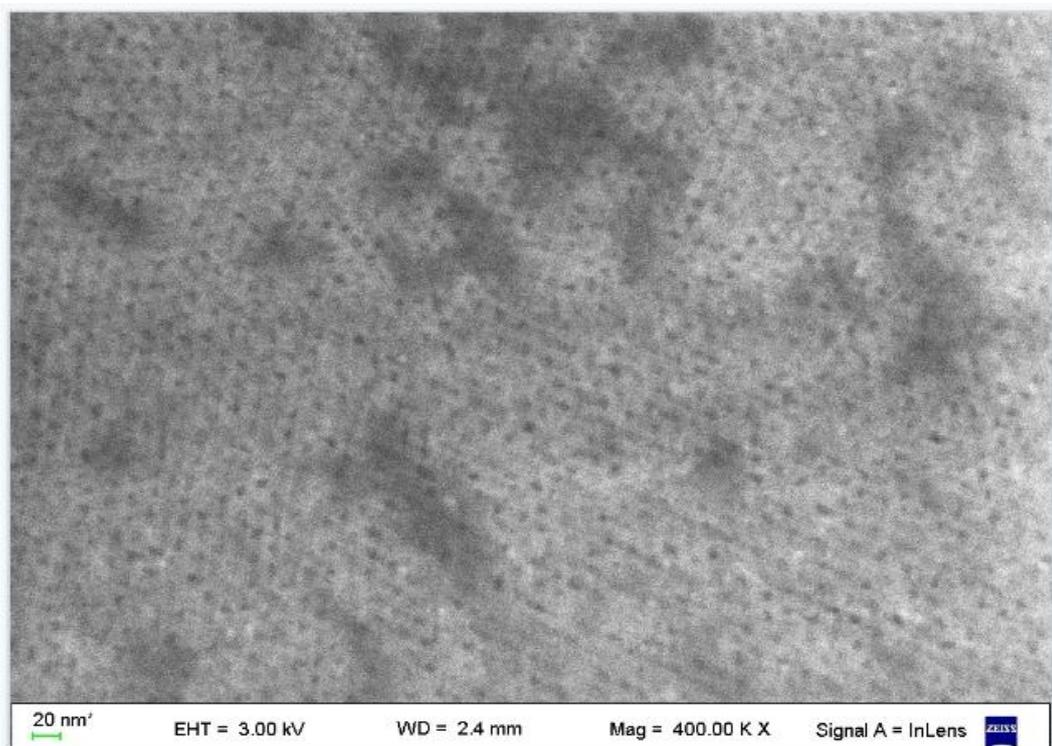


Figura 40: Imagen SEM del film ZrO₂-F127 con NPs de Ag

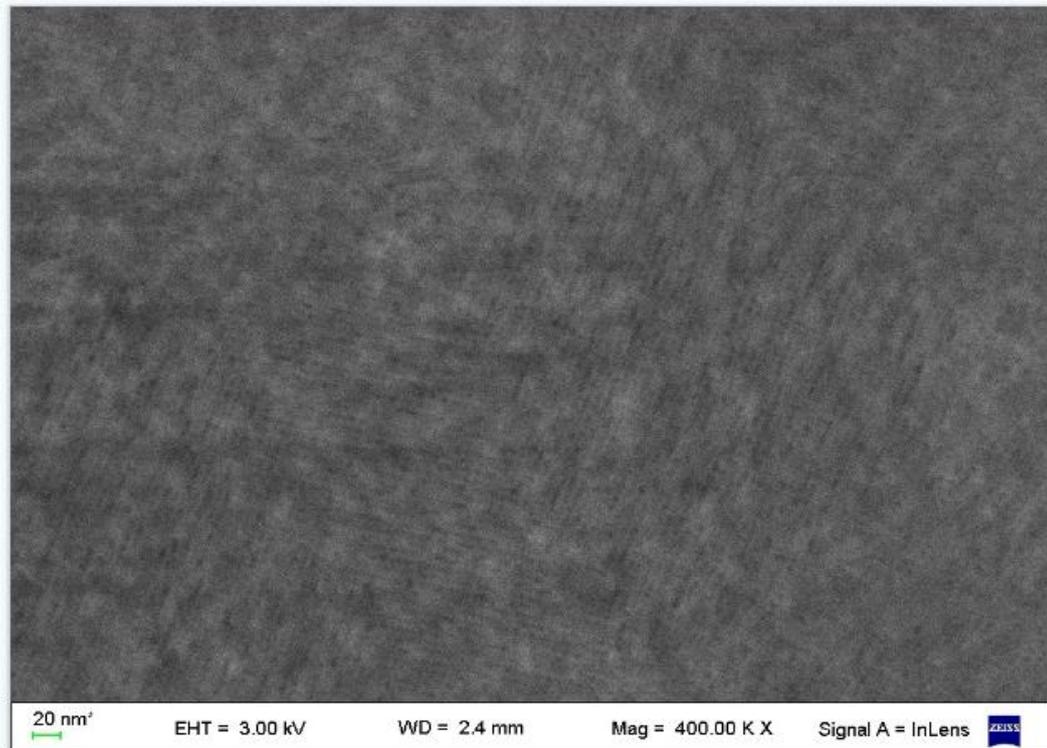


Figura 41: Imagen SEM del film ZrO_2 -Brij 58 con NPs de Ag

Se observa que los films no se modificaron durante la incorporación de las NPs de Ag: aparece una distribución ordenada de los poros y se conservó el tamaño y la forma de los mismos. Además, no se aprecian NPs de Ag en la superficie, en forma de cúmulos, se ven claramente los poros, lo que indica que la Ag se encuentra en el interior de los mismos.

A su vez, en algunos casos como en el film TiO_2 -F127 con NPs de Ag, ZrO_2 -F127 con NPs de Ag (Figuras 40 y 41), se observan puntos brillantes que podrían ser las NPs de plata dentro de los poros.

En cuanto a los otros sistemas, la cantidad de carga acumulada sobre la superficie del film durante la medida impidió una buena definición para obtener imágenes de buena calidad.

5.2.3 Relación Ag/Si, Ag/Ti y Ag/Zr: espectroscopia de rayos X dispersiva en energía (EDS)

En las Figuras 42 a 47, se muestran ejemplos representativos de los espectros EDS obtenidos durante las medidas de SEM. Este análisis ha permitido corroborar que se ha

logrado la incorporación de la Ag y, a su vez, permite cuantificar su contenido dentro de los films.

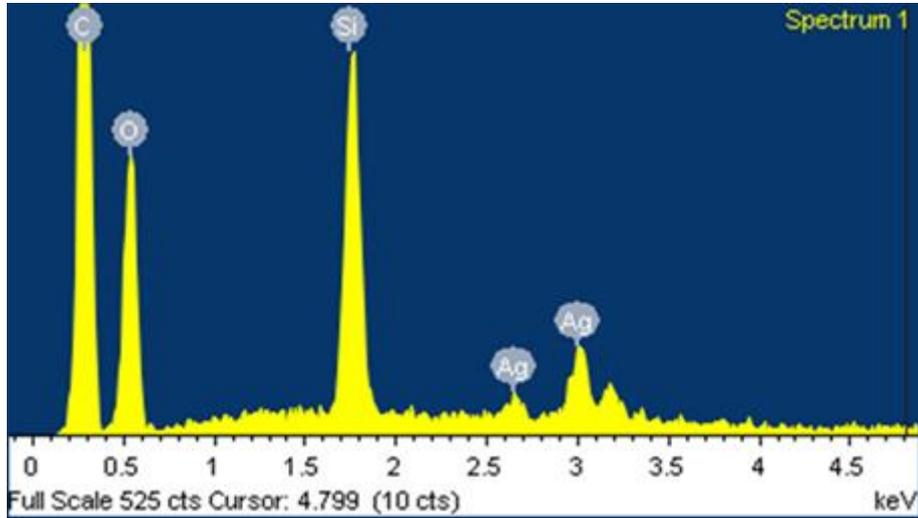


Figura 42: Espectro de EDS del film SiO₂-F127 con NPs de Ag

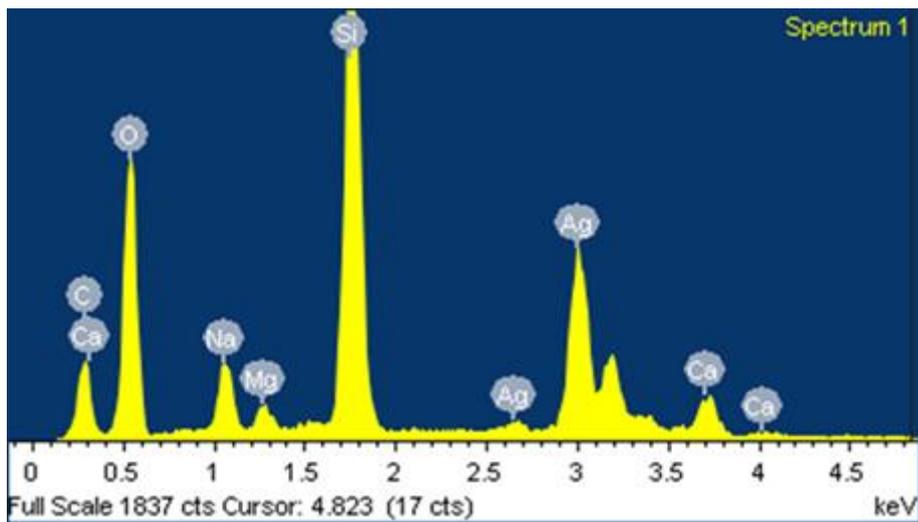


Figura 43: Espectro de EDS del film SiO₂-Brij 58 con NPs de Ag

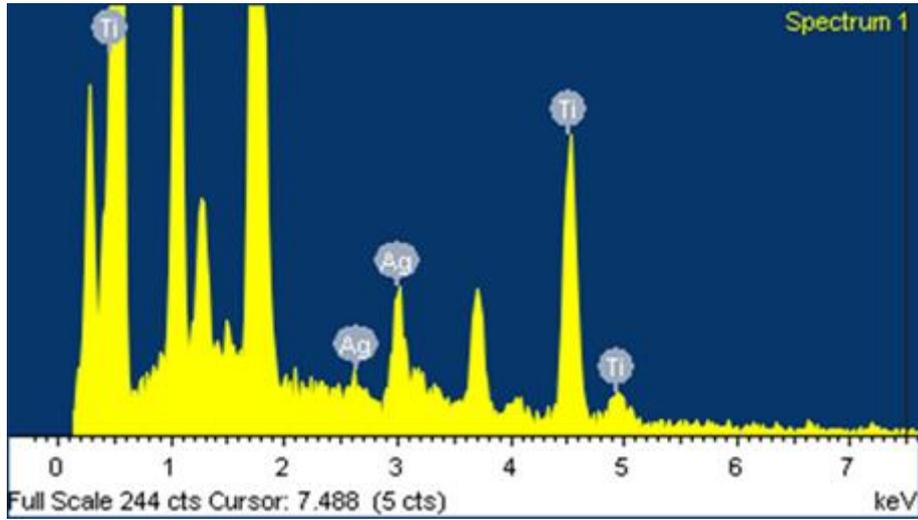


Figura 44: Espectro de EDS del film TiO_2 -F127 con NPs de Ag

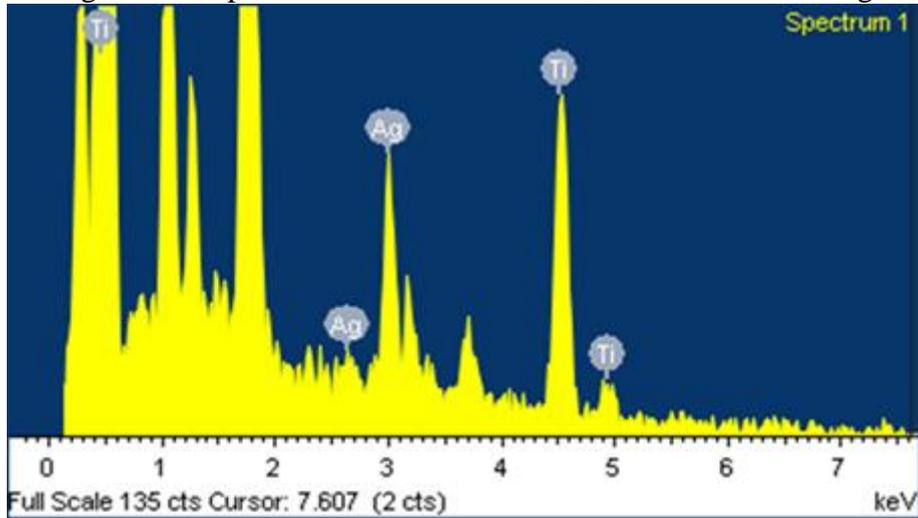


Figura 45: Espectro de EDS del film TiO_2 -Brij 58 con NPs de Ag

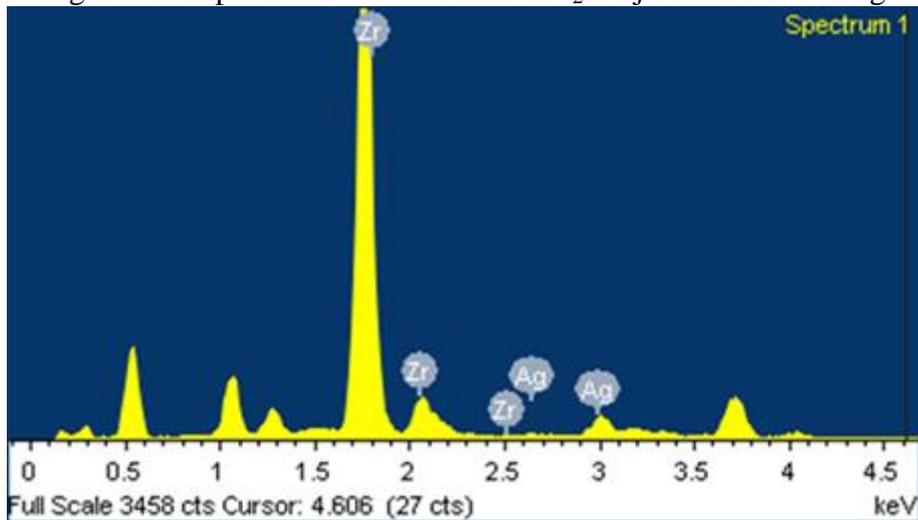


Figura 46: Espectro de EDS del film ZrO_2 -F127 con NPs de Ag

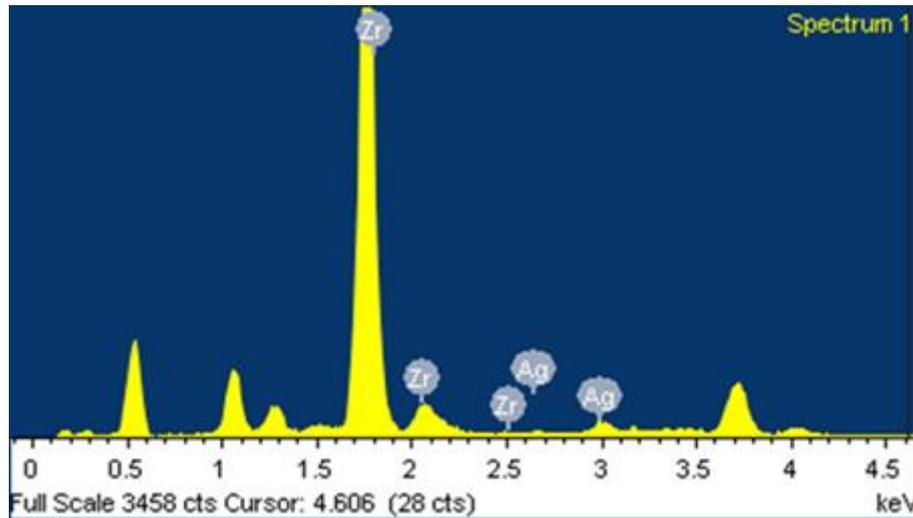


Figura 47: Espectro de EDS del film ZrO_2 -Brij 58 con NPs de Ag

Para cada tipo de film se efectuaron varias mediciones de EDS en diferentes sectores de la muestra, a partir de las cuales se evaluaron los valores promedio obtenidos de la relación atómica Ag/Metal, los cuales se detallan en la Tabla VII, acompañados de la correspondiente desviación estándar.

Tabla VII: Resultados de cuantificación de Ag

Muestra	Promedio de la relación atómica Ag:Metal (%)
SiO_2 -F127	$0,16 \pm 0,05$
SiO_2 -Brij 58	$0,13 \pm 0,03$
TiO_2 -F127	$0,3 \pm 0,1$
TiO_2 -Brij 58	$0,5 \pm 0,3$
ZrO_2 -F127	$0,6 \pm 0,04$
ZrO_2 -Brij 58	$0,44 \pm 0,05$

Para cada film, las diferentes regiones medidas presentan una relación molar similar entre los dos elementos teniendo en cuenta el error, lo cual indica que la carga con NPs Ag se efectuó de manera homogénea a lo largo de todo el film. En base a ello es posible realizar los ensayos sobre el efecto bactericida cortando el soporte en trozos más pequeños.

Se observa, además, que al comparar los distintos agentes moldeantes para un mismo óxido no aparece una gran variación en la relación Ag:M teniendo en cuenta el error de medición, lo que en principio indica que la misma no depende del tamaño de poros generado, sino que está regida por la superficie específica de cada óxido. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos previamente en el grupo de la Gerencia Química de CNEA (Fuertes, 2009).

Finalmente, se puede observar que los films de ZrO_2 son los que incorporaron la mayor cantidad de Ag, y los de SiO_2 son los que presentan la menor incorporación. Ambos resultados son congruentes con lo observado en espectroscopia UV-visible donde las curvas con mayor intensidad indican que hay mayor cantidad de Ag incorporada. (Figura 38)

5.3. Estudio de Efecto Bactericida

Para ensayar el efecto bactericida en solución se emplearon todos los films con un tiempo de impregnación en solución de $AgNO_3$ de 30 minutos. La velocidad de *dip coating* fue de 2 mm/s para TiO_2 y de 4 mm/s para SiO_2 y ZrO_2 . En todos los casos se utilizó como blanco un film equivalente sin cargar con NPs de Ag. (Figura 48).

Se realizaron ensayos en dos sistemas: en placa, donde se midió el halo de lisis de bacterias, y en solución donde se midió la densidad óptica. En ambos casos, los resultados se evaluaron de manera cualitativa.

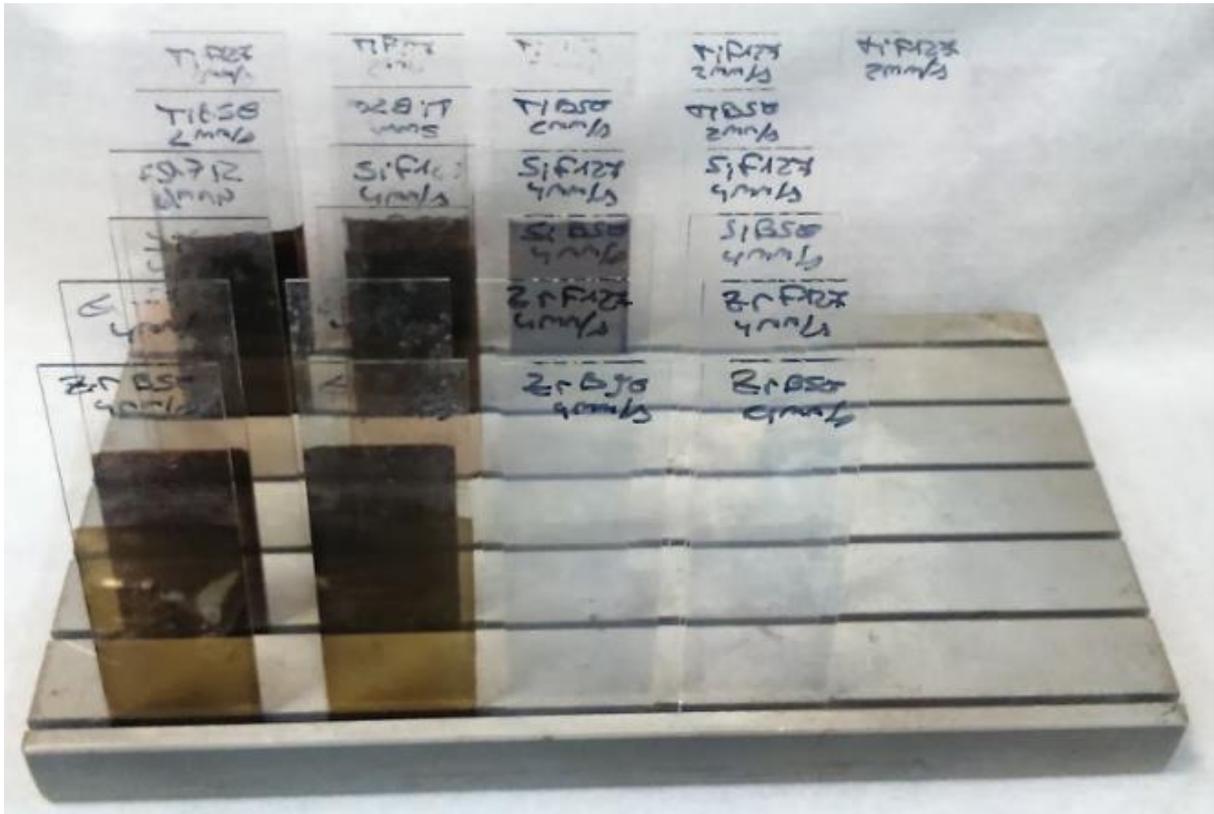


Figura 48: films utilizados para evaluar el efecto bactericida. A la izquierda se presentan cargados con las NPs de Ag y a la derecha sin cargar (blanco)

5.3.1. Halos de lisis en placa

Para realizar el siguiente ensayo se incubaron durante 24 horas los films en placas de agar sembradas con una solución de cultivo bacteriano *Escherichia coli* a fin de observar si se produce la formación de un halo de lisis alrededor de los films cargados con Ag en comparación con los sistemas sin tratar.

En las Figuras 49 a 54 se observan las imágenes de las placas obtenidas, tras 24 hs de incubación.

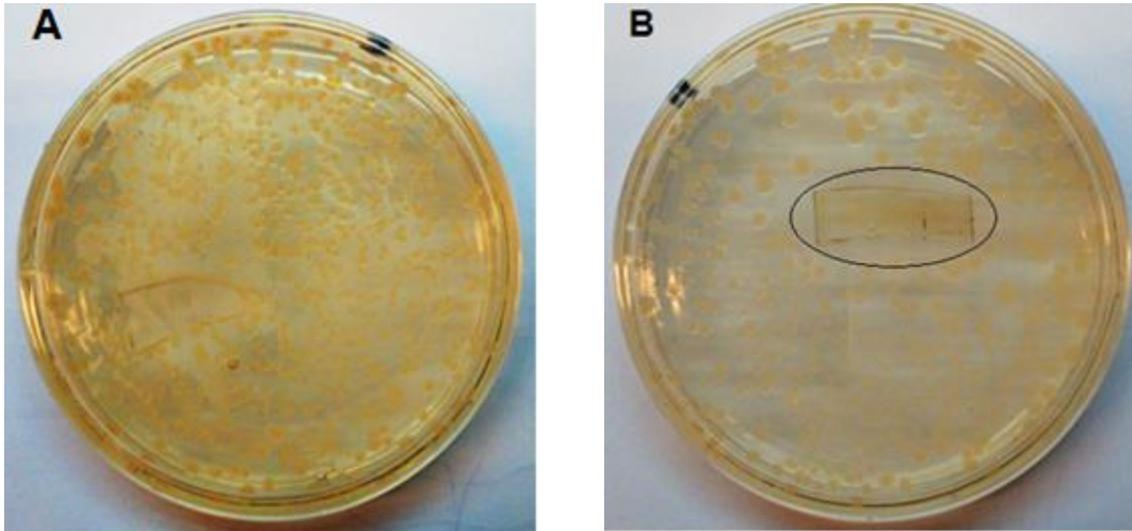


Figura 49: (A) Film blanco SiO_2 - F127 4 mm/s vs (B) film SiO_2 - F127 4 mm/s + Ag

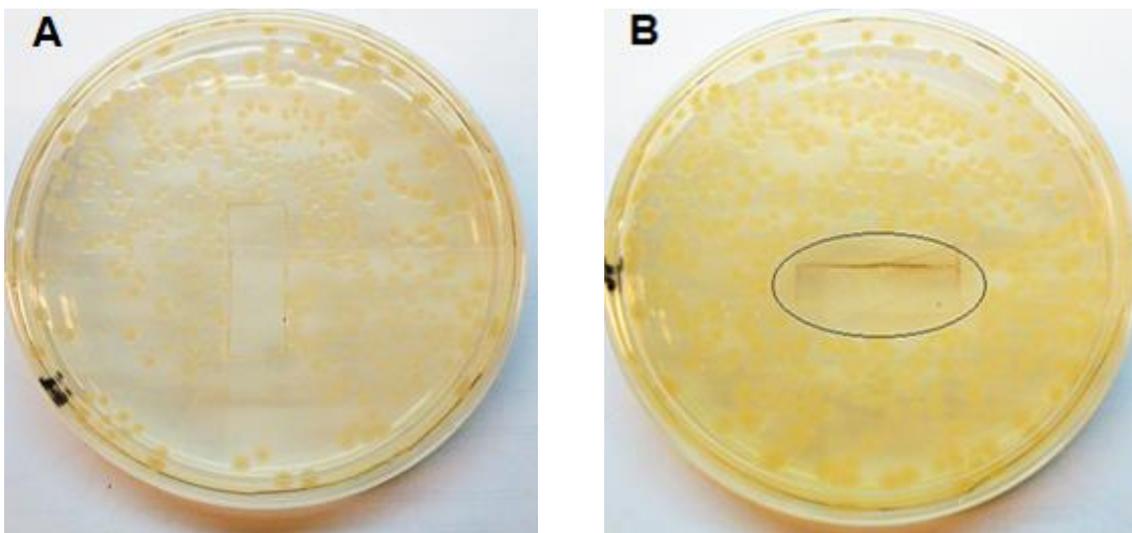


Figura 50: (A) Film blanco SiO_2 - Brij 58 4 mm/s vs (B) film SiO_2 - Brij 58 4 mm/s + Ag

Para los films blanco de SiO_2 se observa el crecimiento bacteriano sobre el borde y alrededores (Figuras 49 A y 50 A) y un halo de lisis bien definido en las placas donde se utilizó el film cargado (Figuras 49 B y 50 B). Los resultados son similares para ambos tipos de agente moldeante.

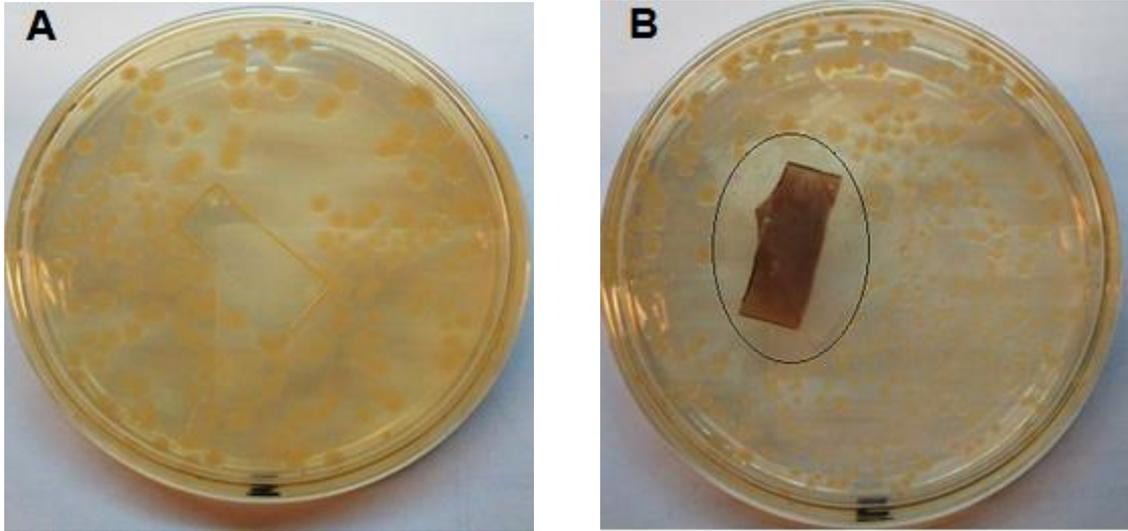


Figura 51: (A) Film blanco TiO_2 - F127 2 mm/s vs (B) film TiO_2 - F127 2 mm/s + Ag

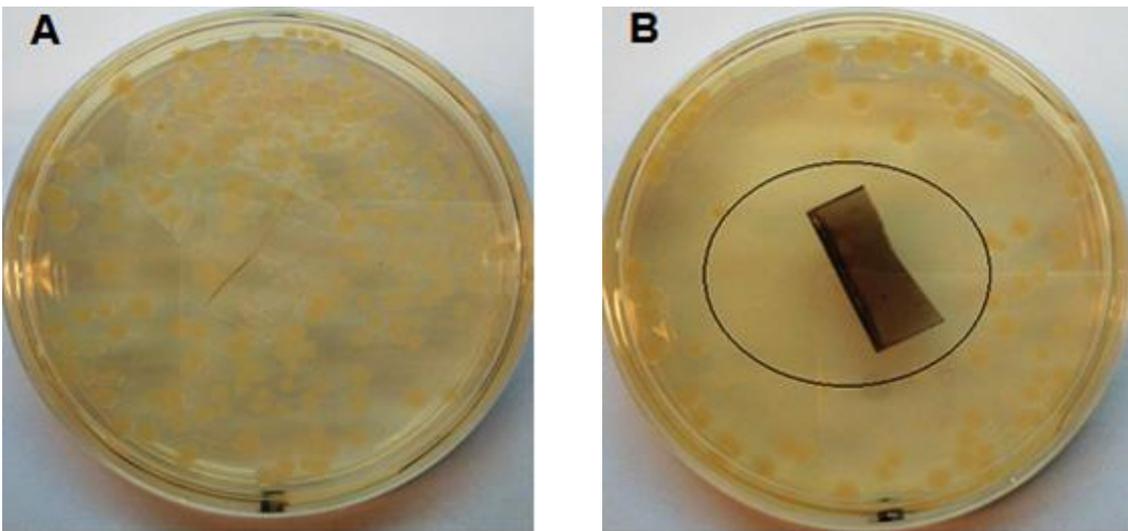


Figura 52: (A) Film blanco TiO_2 - Brij 58 2 mm/s vs (B) film TiO_2 - Brij 58 2 mm/s + Ag

En estos ensayos también se puede apreciar la ausencia de formación de un halo de lisis en los films sin cargar (Figuras 51 A y 52 A) al compararlos con los films que contienen las NPs de Ag donde se observa un marcado halo de lisis (Figuras 51 B y 52 B).

Se distingue que la superficie del halo para el film de TiO_2 - Brij 58 es mayor que para el preparado con F127. Estos resultados coinciden con lo observado mediante espectroscopia UV-visible donde se corroboró una mayor cantidad de Ag incorporada para los films moldeados con Brij 58 (mayor intensidad de la banda plasmónica).

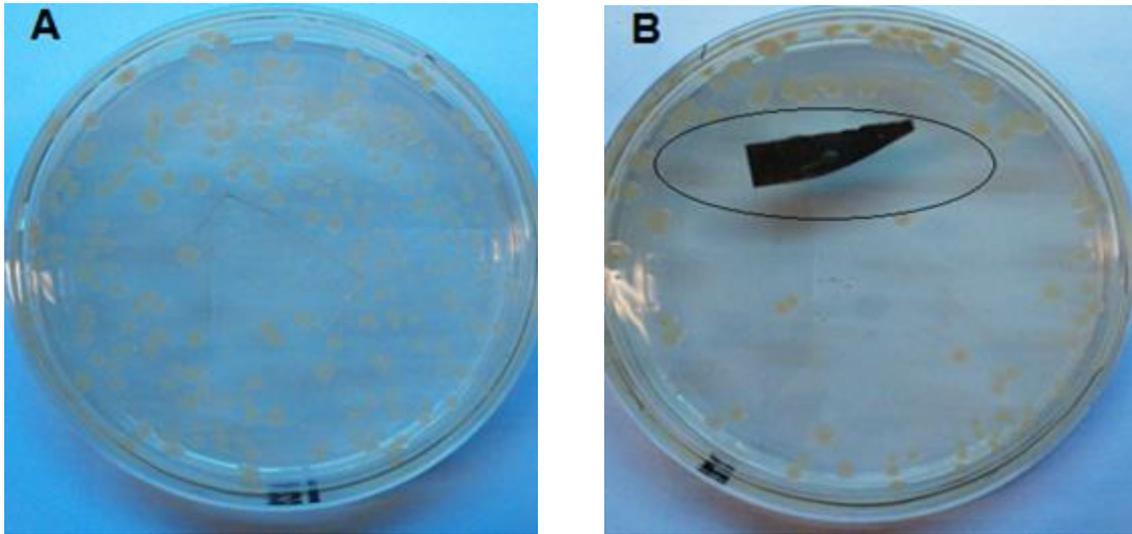


Figura 53: (A) Film blanco ZrO_2 - F127 4 mm/s vs (B) film ZrO_2 - F127 4 mm/s + Ag

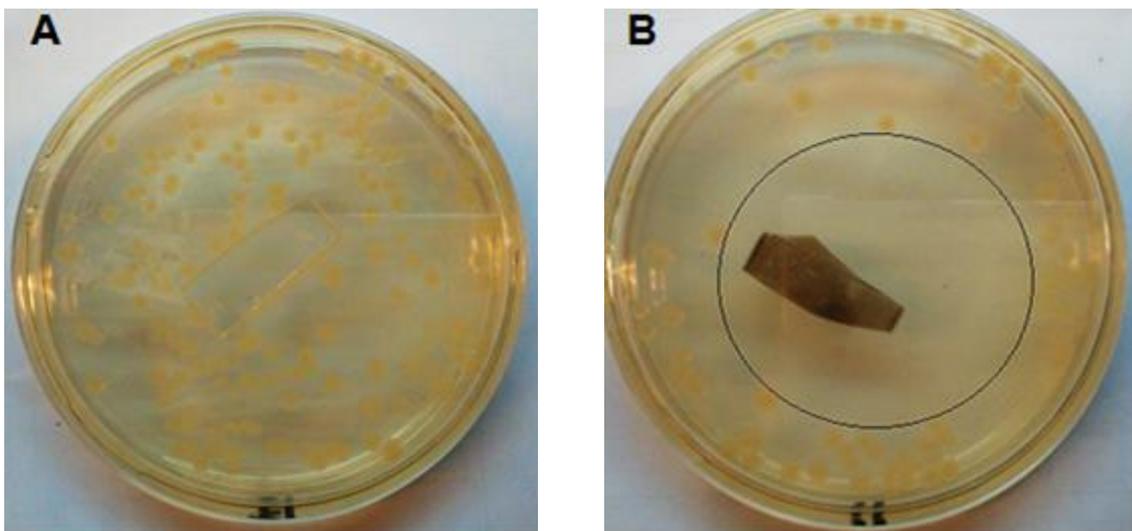


Figura 54: (A) Film blanco ZrO_2 - Brij 58 4 mm/s vs (B) film ZrO_2 - Brij 58 4 mm/s + Ag

Al igual que en los casos anteriores, los films de ZrO_2 promovieron la formación de halos de lisis debido a la difusión de las NPs de Ag contenidas en sus poros hacia el medio (Figuras 53 B y 54 B).

En la Tabla VIII se muestran las superficies de los halos obtenidos para todos los films analizados.

Tabla VIII: Superficie de medidas de halos de lisis

Muestra	Superficie del halo de lisis (cm ²)
SiO ₂ -F127	3,36
SiO ₂ -Brij 58	3,86
TiO ₂ -F127	6,43
TiO ₂ -Brij 58	10,79
ZrO ₂ -F127	6,38
ZrO ₂ -Brij 58	15,72

Finalizado el experimento, las placas fueron depositadas nuevamente a 37°C durante siete días no habiéndose observado, luego de este período, alguna modificación (expansión/reducción) de los halos formados.

5.3.2. Ensayos en solución

En las Figuras (55 a 60) se observan las absorbancias obtenidas en función de los distintos tiempos de incubación, para cada sistema empleado y su respectivo blanco (soporte preparado sin efectuar la carga con NPs de Ag). Los gráficos se muestran con dos escalas diferentes: la primera (a la izquierda) para los tiempos cortos de incubación, en el que se realizaron medidas cada 30 minutos y la segunda (a la derecha), incluyendo el punto obtenido tras 24 hs de incubación.

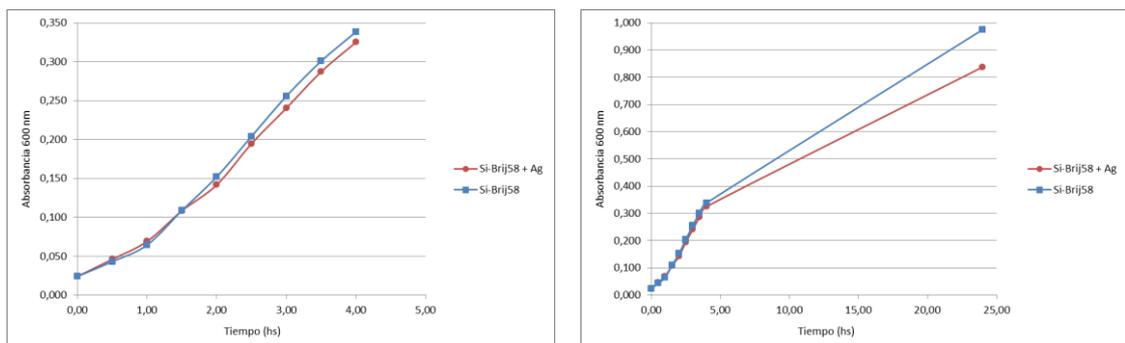


Figura 55: Efecto bactericida en solución para el film SiO₂ Brij 58 4 mm/s

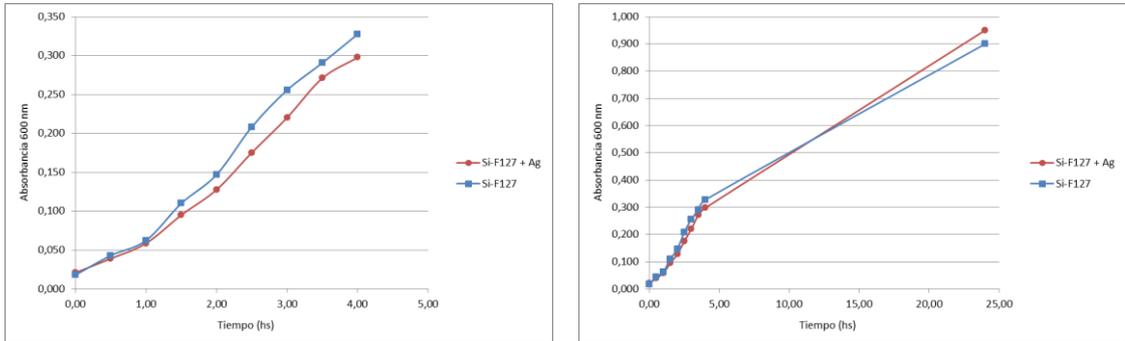


Figura 56: Efecto bactericida en solución para el film SiO₂ F127 4 mm/s

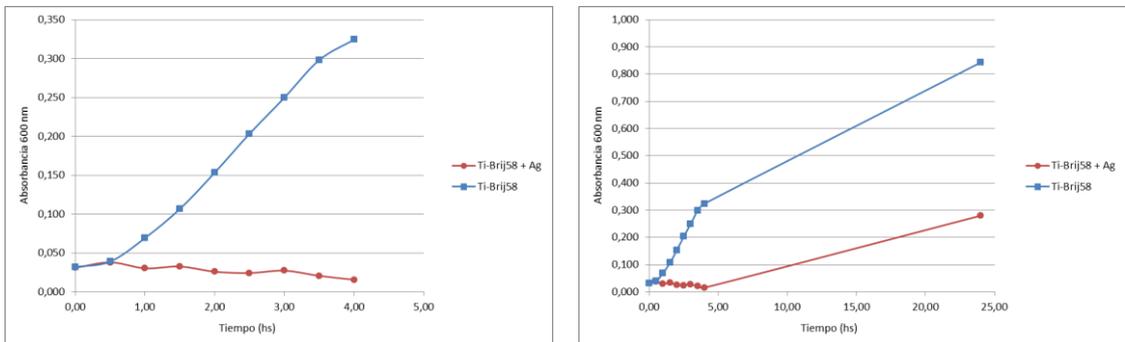


Figura 57: Efecto bactericida en solución para el film TiO₂Brij 58 2 mm/s

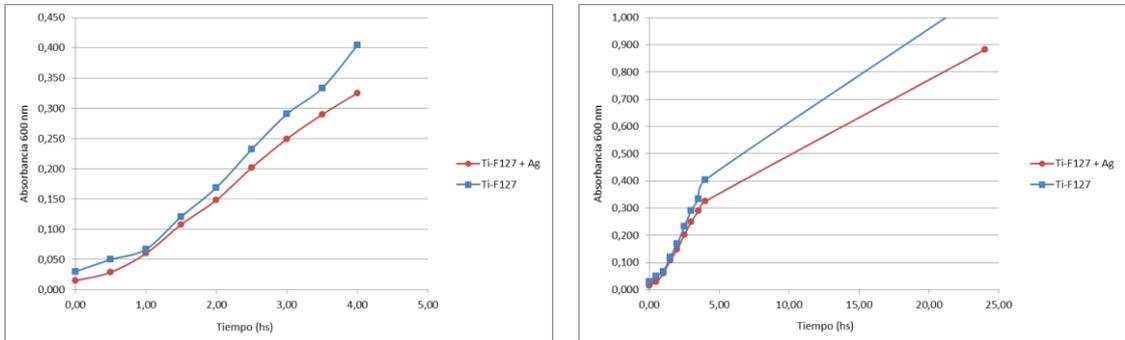


Figura 58: Efecto bactericida en solución para el film TiO₂ F127 2 mm/s

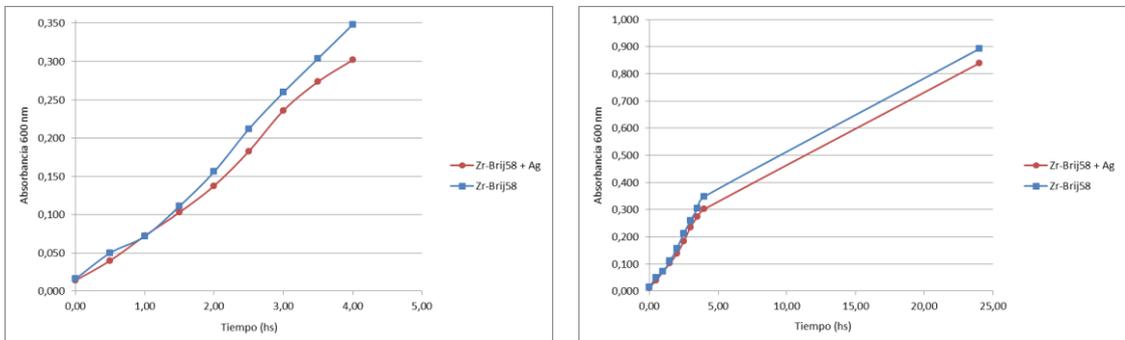


Figura 59: Efecto bactericida en solución para el film ZrO₂Brij 58 4 mm/s

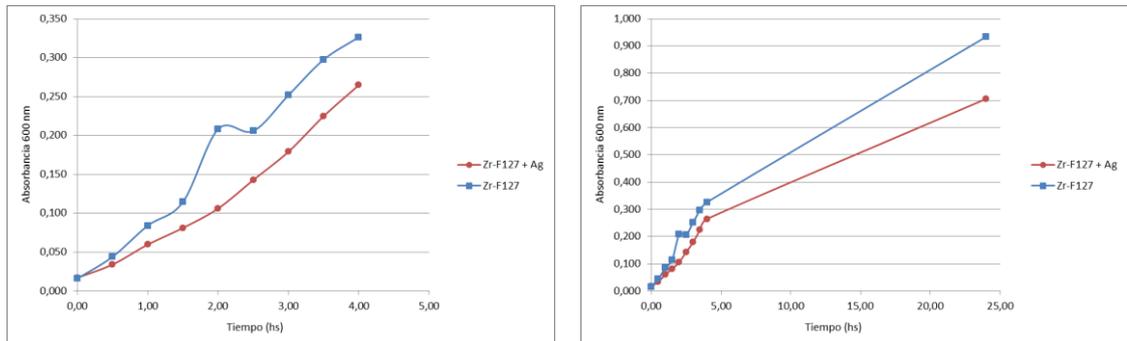


Figura 60: Efecto bactericida en solución para el film ZrO_2 F127 4 mm/s

En todos los casos se observa que el film tratado produjo una disminución de la absorbancia comparando con el caso del film blanco, siendo más notoria la diferencia para el caso de TiO_2 -Brij 58 y ZrO_2 -F127. Estos resultados son similares a los obtenidos en los ensayos por contacto (halos de lisis) mostrados anteriormente.

Los resultados obtenidos son alentadores, ya que parecen indicar una reducción del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo en las soluciones que estuvieron en contacto con los diferentes films cargados con NPs de Ag. Sin embargo, para dar información cuantitativa y evaluar si las diferencias observadas resultan significativas, se requiere realizar una mayor cantidad de mediciones y un análisis estadístico adecuado, que ha quedado fuera del alcance de este PFI.

Por último, es interesante mostrar que la difusión o disolución de las NPs cargadas en el film se hizo evidente al comprobar que el film iba perdiendo su coloración a medida que transcurría el tiempo de incubación. En las Figuras 61 a 66 se muestran los distintos films intactos y luego de 24 horas de incubación dentro del cultivo bacteriano.

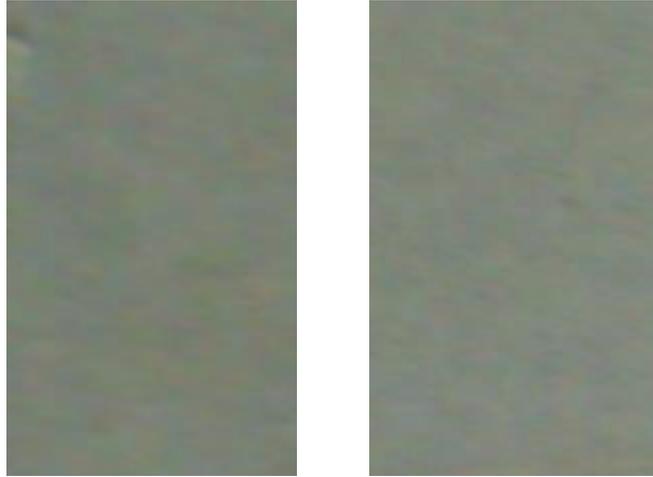


Figura 61: Imagen del film de SiO₂-Brij 58 4 mm/s antes (derecha) y luego de 24 hs de incubación (izquierda)

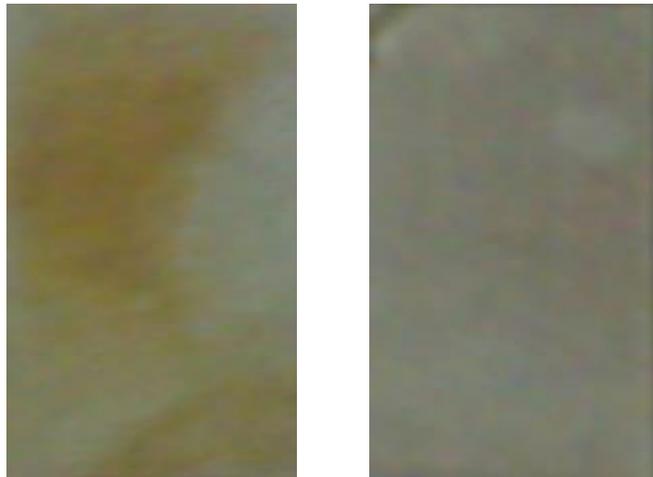


Figura 62: Imagen del film de SiO₂-F127 4 mm/s antes (derecha) y luego de 24 hs de incubación (izquierda)

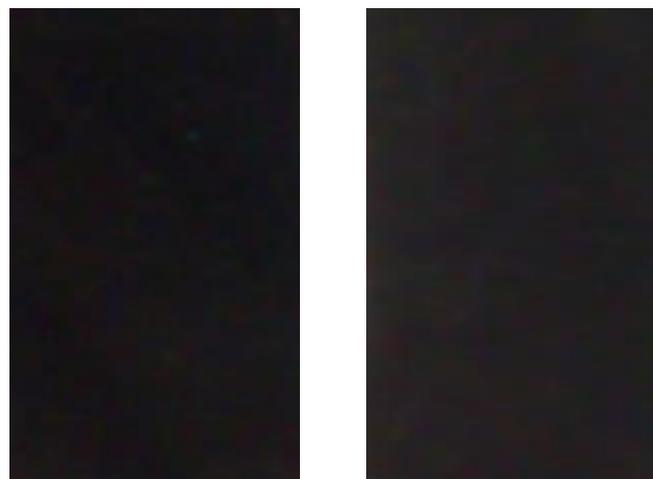


Figura 63: Imagen del film de TiO₂-Brij 58 2 mm/s antes (derecha) y luego de 24 hs de incubación (izquierda)



Figura 64: Imagen del film de TiO_2 -F127 2 mm/s antes (derecha) y luego de 24 hs de incubación (izquierda)

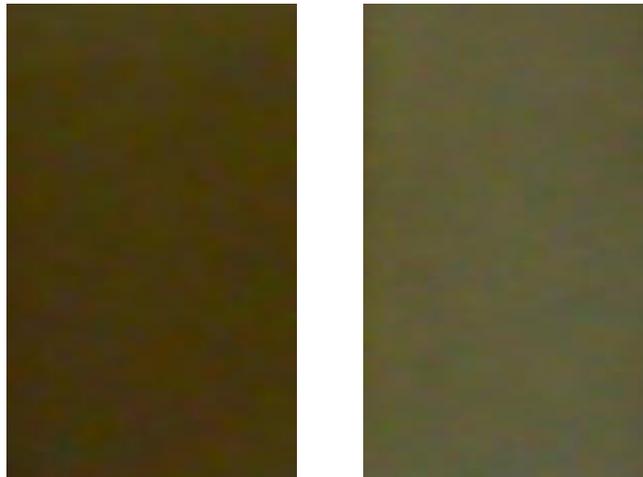


Figura 65: Imagen del film de ZrO_2 -Brij 58 4 mm/s antes (derecha) y luego de 24 hs de incubación (izquierda)

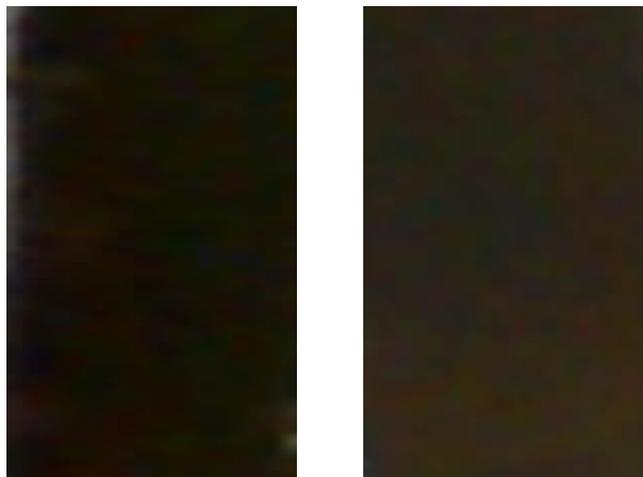


Figura 66: Imagen del film de ZrO_2 -F127 4 mm/s antes (derecha) y luego de 24 hs de incubación (izquierda)

Se aprecia claramente una pérdida de coloración en los films, que indica que se han perdido las NP de Ag que se encontraban originalmente incorporadas. Esta diferencia es mucho más clara en el caso de los films de SiO₂, que para el resto de los óxidos estudiados.

Este comportamiento puede deberse a una suma de factores entre los que se incluye:

- disolución del film (es sabido que el SiO₂ mesoporoso puede disolverse a pH cercano a 7) (Bass *et al*, 2007)
- disolución de las NPs de Ag, que se oxidan a Ag⁺
- desprendimiento de las NPs al medio de reacción

Se requieren estudios más específicos (por ejemplo, medición de concentración de Ag⁺ en solución) para determinar cuál de estas opciones es la preponderante en cada uno de los casos.

6. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar films delgados de óxidos mesoporosos (TiO_2 , SiO_2 y ZrO_2) y se les incorporó nanopartículas de Ag. La cantidad de Ag incorporada depende del tipo de óxido usado como soporte, su espesor y el tiempo de inmersión en la solución. Específicamente, los films de ZrO_2 son los que mayor cantidad de Ag pueden incorporar y los de SiO_2 los que menos metal incorporan. Además, a mayores tiempos de inmersión y mayor espesor de los films, se incorpora una mayor cantidad de NPs de Ag. El tamaño del molde utilizado para generar los poros, en cambio, no influye en la incorporación del metal cuando se compara la relación Ag:óxido.

Se evaluaron cualitativamente las propiedades bactericidas de los materiales preparados, encontrándose que en todos los casos los films cargados con Ag disminuyen la concentración bacteriana tanto por contacto como en solución. Aquellos films que, por sus características, incorporaron una mayor cantidad de Ag (TiO_2 -Brij58 y ZrO_2 -F127) tuvieron un efecto más notorio.

Sin embargo, la cantidad de Ag incorporada no parece ser el único factor que influye en la actividad bactericida, ya que en el caso del film SiO_2 -F127, se observó una gran cantidad de plata incorporada pero su efecto bactericida fue bajo, lo que lleva a pensar que hay una baja capacidad de liberación de la Ag (o Ag^+) en este tipo de films.

En otros casos, como los dos sistemas basados en ZrO_2 , coincidió la mayor cantidad de plata incorporada con un efectivo efecto bactericida tanto en placa como en solución. Además, se observó que el tamaño del poro no influye en la acción bactericida, lo que parece estar relacionado con el hecho de que la relación atómica Ag:Metal no presentó una diferencia notable teniendo en cuenta el error de medición entre distintos sistemas del mismo óxido.

Los resultados obtenidos representan una mejora respecto al trabajo previo en esta misma temática. En primer lugar, se estudiaron óxidos de zirconio y se pudo comprobar su efectividad, incluso mayor que para los óxidos de silicio y titanio. Por otro lado, se prepararon films más gruesos, los cuales incorporaron mayor cantidad de plata, lo que permitió obtener efecto bactericida sobre suspensiones bacterianas, que no había sido observado previamente.

Si bien los resultados obtenidos son muy prometedores, aún resta realizar un análisis cuantitativo de los mismos, incluyendo la realización de una mayor cantidad de ensayos y un análisis estadístico de éstos.

Además, resta comprender mejor el mecanismo de liberación de Ag desde los films. En este sentido, para trabajos futuros, se propone evaluar la concentración de Ag⁺ en solución a través de espectrometría de absorción atómica. Para el caso de los ensayos en placa, podrían hacerse experimentos equivalentes marcando la Ag y realizando un seguimiento de la misma en función del tiempo.

Finalmente, es importante destacar que los films preparados tienen potencialidad para aplicarse como recubrimientos de objetos de uso cotidiano, dando lugar a superficies bactericidas.

7. BIBLIOGRAFIA

Angelomé Paula C., Fuertes M. C., Soler-Illia G. J. A. A, “*Multifunctional, Multilayer, Multiscale: Integrative Synthesis of Complex Macroporous and Mesoporous Thin Films with Spatial Separation of Porosity and Function*” Adv. Mater. 2006, 18, 2397

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. Buenos Aires, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, 2008.

Angelomé P. y Liz-Marzán L., “*Synthesis and applications of mesoporous nanocomposites containing metal nanoparticles*” Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2014. Vol. 70 (2): 180-190. ISSN 0928-0707.

Antonelli D. M., Ying J. Y., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1995, 34, 2014.

Attard G. S., Glyde J. C., Göltner C. G., Nature, 1995, 378, 366.

Bagshaw S. A., Prouzet E., Pinnavaia T. J., Science, 1995, 269, 1242.

Bass, J. D.; Grosso, D.; Boissiere, C.; Belamie, E.; Coradin, T.; Sanchez, C. “*Stability of Mesoporous Oxide and Mixed Metal Oxide Materials under Biologically Relevant Conditions*”. Chemistry of Materials 2007, 19 (17), 4349-4356.

Beck J. S., Vartuli J. C., Kennedy G. J., Kresge C. T., Roth W. J., Schramm S. E., Chem. Mater., 1994, 6, 1816.

Brinker C. J., Lu Y., Sellinger A., Fan H., Adv. Mater., 1999, 11, 579.

Campbell, D.J. y Xia, Y., “*Plasmons: why should we care*”, Journal of Chem, 2007 Ed.: 84, 91-96.

Ciesla U., Schacht S., Stucky G. D., Unger K. K., Schüth F., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1996, 35, 541.

Chen C. Y., Burkett S. L., Li H. X., Davis M. E., Microp.Mater., 1993, 2, 27.

Epple M. y Chernousova S., *“Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal”*, *Angewandte Chemie International Edition*, 51: 2-20, 2012.

Fuertes, María Cecilia, *“Materiales funcionales multiescala basados en películas de óxidos mesoporosos”*. Tesis de Doctorado en Materiales. Buenos Aires, Argentina: Instituto Sábató-Universidad de San Martín, 2009.

Fuertes et al, *“Controlled Deposition of Silver Nanoparticles in Mesoporous Single- or Multilayer Thin Films: From Tuned Pore Filling to Selective Spatial Location of Nanometric Objects”* *Small* 2009b, 5, No. 2, 272–280

Huo Q., Margolese D. I., Ciesla U., Feng P., Gier T. E., Sieger P., Leon R., Petroff P. M., Schüth F., Stucky G. D., *Nature*, 1994, 368, 317.

Kresge C. T., Leonowicz M. E., Roth W. J., Vartuli J. C., Beck J. S., *Nature*, 1992, 359, 710

Martínez E., Bellino M., Soler Illia G. J. A. A., *“Patterned Production of Silver-Mesoporous Titania Nanocomposite Thin Films Using Lithography-Assisted Metal Reduction”* Gerencia de Química, CNEA, Centro Atómico Constituyentes, Avenida Gral. Paz 1499, San Martín B1650KNA, Argentina. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2009, 1 (4), 746–749.

Martínez E., Granja L., Bellino M., Soler-Illia G. J. A. A., *“Electrical conductivity in patterned silver–mesoporous titania nanocomposite thin films: towards robust 3D nano-electrodes”*. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2010, 12, 14445–14448.

Monnier A., Schüth F., Huo Q., Kumar D., Margolese D., Maxwell R. S., Stucky G. D., Krishnamurty M., Petroff P., Firouzi A., Janicke M., Chmelka B. F., *Science*, 1993, 261, 1299.

Mulvaney, P., *“Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles”*, *Langmuir*, 1996, 12, 788-800.

Ozin G. A., Arsenault A., *“Nanochemistry. A chemical approach to nanomaterials”*, RSC Publishing Group, 1ª Edición, 2005.

Rodríguez, María Verónica; Yun, Alejandro Martín, *“Recubrimientos Porosos con Propiedades Bactericidas”*, 2014.

SolerIllia G. J. A. A., Sánchez C., Lebeau B., Patarin J., Chem. Rev., 2002, 102, 4093.

SolerIllia G. J. A. A., Innocenzi P., Chem. Eur. J., 2006, 12, 4478.

Soler-Illia G. J. A. A., Angelomé P. C., Fuertes M. C., Grosso D., Boissiere C., *“Critical aspects in the production of periodically ordered mesoporous titania thin films”* Nanoscale, 2012, 4, 2549.

Tanev P., Pinnavaia T. J., Science, 1995, 267, 865.

Ulapaggan N. y Rao C. N. R., Chem. Commun., 1996, 1685.

Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Jr., Rejeski, D. and Hull, M. S. *“Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory”*. Beilstein Journal of Nanotechnology, 2015, 6, 1769-1780.

Wolosiuk, A.; Tognalli, N. G.; Martínez, E. D.; Granada, M.; Fuertes, M. C.; Troiani, H.; Bilmes, S. A.; Fainstein, A.; Soler-Illia, G. J. A. A. *“Silver Nanoparticle-Mesoporous Oxide Nanocomposite Thin Films: A Platform for Spatially Homogeneous SERS-Active Substrates with Enhanced Stability”*. ACS Applied Materials & Interfaces 2014, 6 (7), 5263-5272.

Zelcer A., Soler-Illia G. J. A. A., *“One-step preparation of UV transparent highly ordered mesoporous zirconia thin films”* Journal of Materials Chemistry C, 2013, 1, 1359.

Zhao D., Feng J., Huo Q., Melosh N., Fredrickson G. H., Chmelka B. F., Stucky G. D., Science, 1998, 279, 548