



PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA CON PROPIEDADES
ÓPTICAS PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS

JUAN FERNANDO RAMIREZ HENAO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA

MANIZALES

2020

PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ORO Y PLATA CON PROPIEDADES
ÓPTICAS PARA POTENCIALES APLICACIONES BIOMÉDICAS

JUAN FERNANDO RAMIREZ HENAO

Proyecto de grado para optar al título de Magister en Ingeniería

Director:

Dr. Oscar Moscoso Londoño

Codirectora

Dra. Francy Nelly Jiménez García

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MANIZALES

FACULTAD DE INGENIERÍA

MAESTRÍA EN INGENIERÍA

MANIZALES

2020

DEDICATORIA

A mi madre porque soy lo que me ha dado.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Oscar Moscoso Londoño por darme a conocer este campo de la ciencia con tantas aplicaciones potenciales y tanto por descubrir y por la cantidad de horas que tuvo que invertir en el desarrollo y revisión de este trabajo. Adicionalmente agradecer a mi codirectora Francly Nelly Jiménez García por todo el apoyo brindado. También a Myriam Delgado por el apoyo y la disposición en el laboratorio de ciencias básicas. Además, al Dr. Sebastián Calderón Velazco, del International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL, Braga - Portugal) por las medidas de microscopia electrónica de transmisión (TEM). A la Universidad Autónoma de Manizales por la formación que me brindó en esta maestría y el presupuesto asignado al proyecto de investigación. A la Universidad Nacional de Colombia, no solo por el préstamo de equipos sino por mi formación profesional como ingeniero químico y como ciudadano consciente de las problemáticas del país y del mundo.

A nivel personal quiero agradecer a mi novia Luisa Fernanda pilar fundamental en mi vida que me mantiene centrado y mirando hacia el futuro. A mi mamá Fabiola y mi papá José Hernán por forjarme como la persona que soy. A mis hermanas Valentina y Ana Sofía por ser lo más lindo que me ha pasado en la vida (aún recuerdo cuando nacieron). A mis primos Ramiro, Ricardo y Elizabeth por ser unos hermanos más y recibirme siempre con un abrazo. Al resto de mi familia, tanto Ramirez como Henao de los cuales he aprendido mucho y siempre me han demostrado un cariño incondicional. A mis amigos del pregrado en especial Carolina, Sandra y Juan Álvaro y mis compañeros de la Universidad Autónoma de Manizales en especial Reinel y Cristian.

RESUMEN

En el presente trabajo se basó en la síntesis de nanopartículas de oro y plata, las cuales tienen propiedades ópticas y pueden ser usadas en aplicaciones en el campo biomédico. Para su síntesis se implementó la metodología *bottom-up* partiendo de un compuesto precursor: el ácido cloroáurico para las nanopartículas de oro y el nitrato de plata para las de plata. Bajo dicha metodología de síntesis, se modificaron algunos parámetros a fin de obtener sistemas de nanopartículas con diferente tamaño y concentración. En este sentido se planteó el uso de tres diferentes agentes reductores: borohidruro de sodio, etilenglicol y ácido ascórbico para las nanopartículas de plata y ácido cítrico, citrato de potasio y borohidruro de sodio para las nanopartículas de oro. Además, se usaron estabilizantes como polivinilpirrolidona (PVP) y citrato de potasio. Los sistemas obtenidos fueron estudiados mediante espectrofotometría UV-Visible, microscopia electrónica de transmisión (TEM) y absorción atómica, en donde se obtuvieron comportamientos cercanos a los reportados en la literatura científica. Los sistemas de nanopartículas de plata fueron empleados como agentes bactericidas, específicamente se realizaron ensayos sobre cultivos de bacterias de *Escherichia Coli*, *Staphylococcus epidermidis* y placa bacteriana oral. Los resultados indican que los efectos bactericidas están fuertemente ligados con la concentración de nanopartículas de plata. Por otro lado, y conociendo las propiedades de biocompatibilidad de las nanopartículas de oro, con los sistemas sintetizados se llevaron a cabo pruebas de biocompatibilidad en plasma rico en plaquetas, observando que las nanopartículas de oro tienen un mejor desempeño

Palabras Claves: Nanopartículas de oro, nanopartículas de plata, efecto bactericida, biocompatibilidad.

ABSTRACT

The present work was based on the synthesis of gold and silver nanoparticles, which have optical properties and can be used in applications in the biomedical field. For its synthesis, the bottom-up methodology was implemented based on a precursor compound: chloroauric acid for gold nanoparticles and silver nitrate for silver nanoparticles. In this synthesis methodology, some parameters were modified in order to obtain nanoparticle systems with different size and concentration. Three different reducing agents were proposed: sodium borohydride, ethylene glycol and ascorbic acid for silver nanoparticles, and for gold nanoparticles, sodium citrate, citric acid and sodium borohydride. Stabilizers such as polyvinylpyrrolidone (PVP) and potassium citrate were also used. The systems obtained were studied by UV-Visible spectrophotometry, transmission electron microscopy (TEM) and atomic absorption, obtaining similar results to the reported in scientific literature. Silver nanoparticles systems were used as bactericidal agents, specifically tests on bacteria cultures of *Escherichia Coli*, *Staphylococcus epidermidis* and oral bacterial. The results indicate that the bactericidal effects are linked to the concentration of silver nanoparticles. On the other hand, and knowing the biocompatibility properties of gold nanoparticles, with the synthesized systems, biocompatibility tests were carried out in platelet rich plasma, observing that the gold nanoparticles have a better performance.

Key word: Gold nanoparticles, Silver nanoparticles, bactericide effect, biocompatibility.

CONTENIDO

1	PRESENTACIÓN	12
2	ANTECEDENTES	13
3	ÁREA PROBLEMÁTICA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
4	JUSTIFICACIÓN	20
5	REFERENTE TEÓRICO	21
5.1	Síntesis de nanopartículas	21
5.2	Propiedades ópticas de las nanopartículas de oro y plata	22
5.3	Biocompatibilidad. El rol de la funcionalización de las nanopartículas	25
5.4	Propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata	27
6	OBJETIVOS	28
6.1	Objetivo general	28
6.2	Objetivos específicos	28
7	METODOLOGÍA	29
7.1	Síntesis nanopartículas de plata	29
7.1.1	Ácido ascórbico como agente reductor (Ag1)	30
7.1.2	Etilenglicol como agente reductor (Ag2)	31
7.1.3	Borohidruro de sodio como agente reductor (Ag3)	32
7.2	Prueba efecto bactericida	32
7.3	Síntesis de nanopartículas de oro	33
7.3.1	Ácido cítrico como agente reductor (Au1)	33

7.3.2	Citrato de potasio como agente reductor (Au ₂)	34
7.3.3	Borohidruro de sodio como agente reductor (Au ₃)	35
7.4	Técnicas de caracterización	35
7.4.1	Espectrofotometría UV-Visible	35
7.5	Pruebas de biocompatibilidad en plaquetas	38
8	RESULTADOS	40
8.1	Nanopartículas de plata	40
8.1.1	Espectrofotometría UV-Visible	40
8.1.2	Absorción atómica	41
8.1.3	Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	42
8.1.4	Efecto bactericida	43
8.2	Nanopartículas de oro	48
8.2.1	Espectrofotometría Uv-Vis	48
8.2.2	Absorción atómica	49
8.2.3	Microscopía electrónica de transmisión	50
8.2.4	Biocompatibilidad	52
9	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	55
9.1	Efecto Bactericida nanopartículas de plata	55
9.2	Biocompatibilidad de las nanopartículas	56
10	CONCLUSIONES	57
11	RECOMENDACIONES	59

12	REFERENCIAS	60
13	ANEXO	64

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Concentración nanopartículas de plata.....	42
Tabla 2: Concentración nanopartículas de oro	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del fenómeno de plasmón de resonancia. Figura adaptada de la referencia [14]	15
Figura 2: Evolución del mercado de nanopartículas de oro por sectores en los Estados Unidos. [16]	15
Figura 3: Evolución del mercado de nanopartículas de oro en los Estados Unidos. [17]	16
Figura 4: Dispersiones coloidales de nanopartículas de oro de diferentes tamaños y los colores producidos por la absorción de luz. (Figura tomada de [10])	24
Figura 5: Funcionalización nanopartícula (tomado de [24])	26
Figura 6: esquema de síntesis de nanopartículas de plata (adaptado de [27])	29
Figura 7: Colores complementarios.....	36
Figura 8: Uv-VIS nanopartículas de plata	41
Figura 9: Imágenes TEM de las nanopartículas de plata usando como reductores ácido ascórbico – muestra Ag1 (a, b y c) y etilenglicol – muestra Ag2 (d, e y f).....	43
Figura 10: prueba efecto bactericida en E. coli	44
Figura 11: Prueba efecto bactericida en S. epidermidis	45
Figura 12: prueba efecto bactericida en placa oral	45
Figura 13: inhibición S. Epidermidis.....	46
Figura 14: inhibición E. Coli	46
Figura 15: inhibición placa oral.....	47
Figura 16:inhibición bacteriana	47
Figura 17: UV-Vis nanopartículas de oro	49
Figura 18: TEM nanopartículas de oro Au1	50
Figura 19: TEM nanopartículas de oro Au2.....	51
Figura 20: Distribución de tamaño de partícula Nanopartículas de oro Au2	51
Figura 21: imagen de las plaquetas no aglomeradas	52
Figura 22: plaquetas completamente aglomeradas por el efecto de nanopartículas "Ag2" ..	53
Figura 23: porcentaje de plaquetas en función del tiempo	54
Figura 24: índice de inhibición VS logaritmo de la concentración	55

1 PRESENTACIÓN

En el presente trabajo se hace primero una recopilación de antecedentes sobre la síntesis de nanopartículas, especialmente nanopartículas metálicas. Luego se introduce un análisis del área problemática y se plantean dos preguntas de investigación: la primera, relativa a los parámetros que se deben controlar para lograr que la síntesis de nanopartículas de oro y plata sea reproducible y, la segunda sobre aplicaciones se pueden desarrollar con estos sistemas. Posteriormente viene una sección de justificación, en la cual se resalta la importancia del estudio de la síntesis de nanopartículas metálicas con cierto grado de biocompatibilidad. A continuación, se presenta el referente teórico donde aclaran preguntas, tales como: ¿Qué es una nanopartícula? ¿Qué ventajas y desventajas tiene el uso nanopartículas en relación al campo de aplicación?, ¿Qué tipos de nanopartículas existen?, ¿Con qué técnicas se caracterizan las nanopartículas? y particularmente se hace énfasis en la descripción de la resonancia de plasmón de superficie y por qué es de interés en nanopartículas metálicas, ¿Qué usos potenciales tienen las nanopartículas de plata y las de oro?

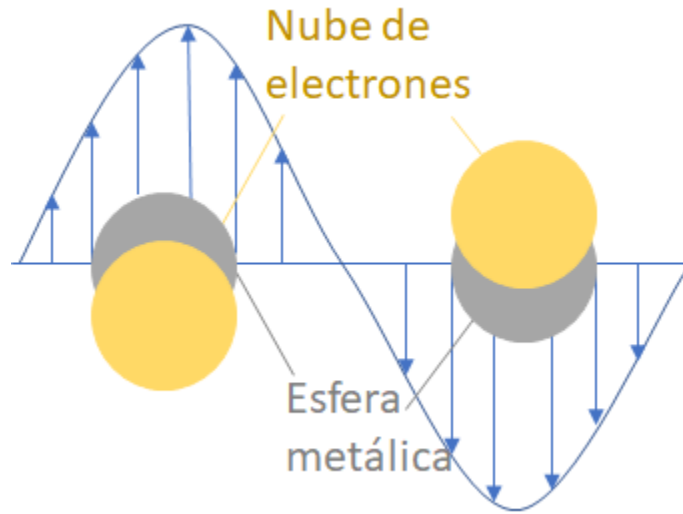
En seguida se presenta el objetivo general y los específicos del proyecto. Los mismos apuntan a la producción de nanopartículas de oro y plata con potenciales aplicaciones bactericidas y biomédicas. Sigue una descripción detallada de la metodología, tanto en la parte de la síntesis de las nanopartículas como en las pruebas realizadas con estas, las cuales incluyen: efecto bactericida de las nanopartículas de plata y biocompatibilidad de las nanopartículas de oro y plata. En seguida se presentan los resultados de los estudios de caracterización: espectrofotometría UV- Visible, absorción atómica, las pruebas de actividad bactericida con *E. coli*, *S. epidermidis* y placa bacteriana oral, así como las pruebas de biocompatibilidad. Estos resultados son analizados en función de diferentes parámetros y finalmente se dan conclusiones sobre la relación entre los protocolos usados en síntesis de nanopartículas, su biocompatibilidad y sus potenciales aplicaciones.

2 ANTECEDENTES

Desde hace ya varios años las nanopartículas han llamado la atención de la comunidad científica, esto debido a nuevas propiedades producto de su reducido tamaño. En particular, las nanopartículas metálicas han sido un foco de interés por un sin número de aplicaciones en ingeniería como en ciencias biomédicas [1]. Gracias a las características superficiales de las nanopartículas (relación superficie / volumen), estos sistemas pueden ser funcionalizados o recubiertos con fármacos, anticuerpos, moléculas orgánicas e inorgánicas, así como con una gran variedad de agentes químicos. Esta característica, solo observada en estructuras de tamaño nanométrico (1 a 100 nm), provee a este tipo de estructuras un sinnúmero de funciones, potenciándolas para ser usadas en nuevas aplicaciones. En el caso concreto de las nanopartículas de plata, la literatura científica las cataloga principalmente como agentes antimicrobianos [2], las cuales, en comparación con métodos tradicionales, ofrecen diversas ventajas, incluyendo menor toxicidad y menor costo, entre otros [3]. El efecto bactericida se debe principalmente a la liberación de iones de plata (Ag^+) desde el interior de las nanopartículas de plata, los cuales tienen un efecto tóxico en bacterias u otros microorganismos. Sin embargo, en estudios recientes se evidencia que dicho efecto no solo se debe a los iones liberados de la nanopartícula. Por ejemplo, en los trabajos descritos en las siguientes referencias [4]–[8], se evidencia que al comparar la toxicidad de nanopartículas de plata y sales de plata, en concentraciones equivalentes, las nanopartículas presentan un mayor efecto. Ante este panorama, algunos autores atribuyen la reducción del efecto a posibles enlaces entre la plata (proveniente de las sales) con agentes químicos presentes en el medio, lo cual reduce su bioactividad o biodisponibilidad y por ende sus potenciales efectos bactericidas [9]. Investigaciones recientes sobre el uso de nanopartículas de plata para usos antimicrobianos o bactericidas intentan relacionar y explicar la influencia de la ruta de síntesis, el tamaño, la forma, carga superficial, la solubilidad, el agente funcionalizador u otras características fisicoquímicas con el efecto bactericida o antimicrobiano. En este sentido, el trabajo acá presentado pretende relacionar la influencia del agente reductor, así como otros parámetros de la síntesis, con el efecto bactericida en tres cepas de bacterias *E.*

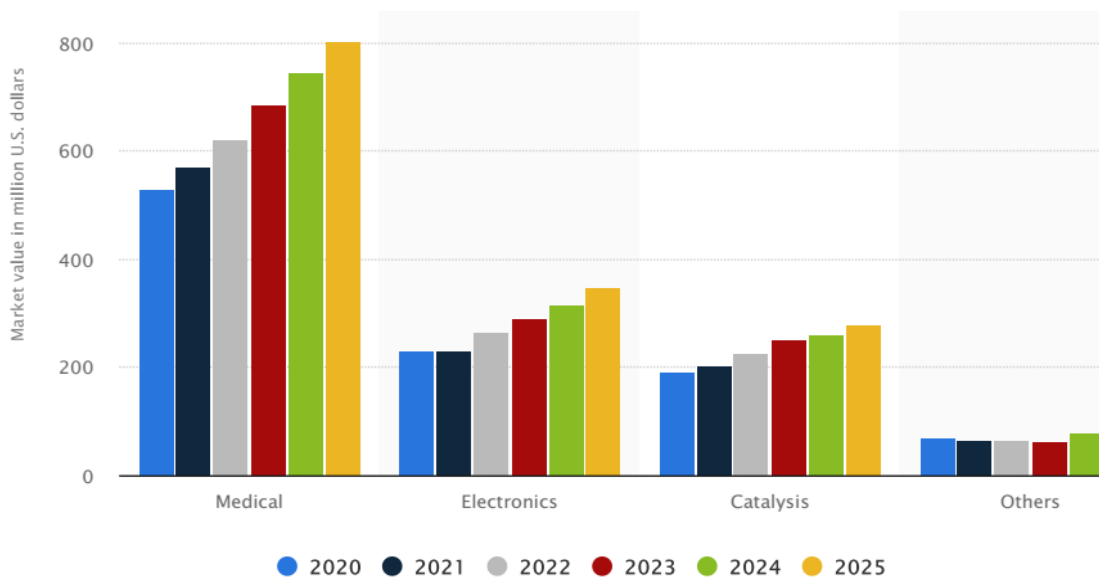
coli, *S. Epidermidis* y placa bacteriana oral. Por otro lado, las nanopartículas de oro han sido usadas en diversos campos de investigación, incluyendo el biomédico y tecnológico. Los primeros coloides metálicos, en especial de oro fueron desarrollados por Michael Faraday en 1857 [10]. Si bien en esa época se desconocía la naturaleza nanométrica de las partículas de oro que componían el coloide, se empezó a relacionar la concentración del soluto con las propiedades ópticas. Dados los diversos colores que podían tomar los coloides metálicos, estos sistemas inicialmente se usaron como pigmentos en vidrios y textiles. Los estudios de Faraday no solo se limitaron a la implementación de estos coloides para aplicaciones en pigmentos, sino también a los diversos métodos y rutas de síntesis. Con ello se desarrolló un método de síntesis que permitió la obtención de nanopartículas de oro a través de una reducción de fosforo. [11] La explicación a los fenómenos ópticos llegó un tiempo después, concretamente en 1861 fueron usadas las ecuaciones de Maxwell para sentar las bases físicas de los fenómenos observados en este tipo de coloides. Posteriormente, Gustav Mie (1904) usó las ecuaciones de Maxwell para describir la dispersión de las ondas electromagnéticas en cuerpos esféricos metálicos [12], [13]. Con estos desarrollos es posible estudiar y cuantificar las propiedades ópticas de diversos tipos de coloides con nanopartículas metálicas. Un parámetro clave para el estudio de las propiedades ópticas de los sistemas estudiados en este trabajo (nanopartículas de oro y plata) es el plasmón de resonancia, el cual está directamente relacionado con las propiedades ópticas de las nanopartículas y el cual depende de factores fisicoquímicos como el tamaño y forma de la nanopartícula o el estado de agregación, entre otros. La naturaleza de este fenómeno se basa en la interacción de las ondas electromagnéticas con la superficie de las nanopartículas. Cuando la radiación electromagnética incide sobre un conjunto de nanopartículas metálicas, se genera una oscilación coherente de los electrones que se encuentran en la superficie del metal. Un esquema de este fenómeno es presentado en la figura 1.

Figura 1: Esquema del fenómeno de plasmón de resonancia. Figura adaptada de la referencia [14]



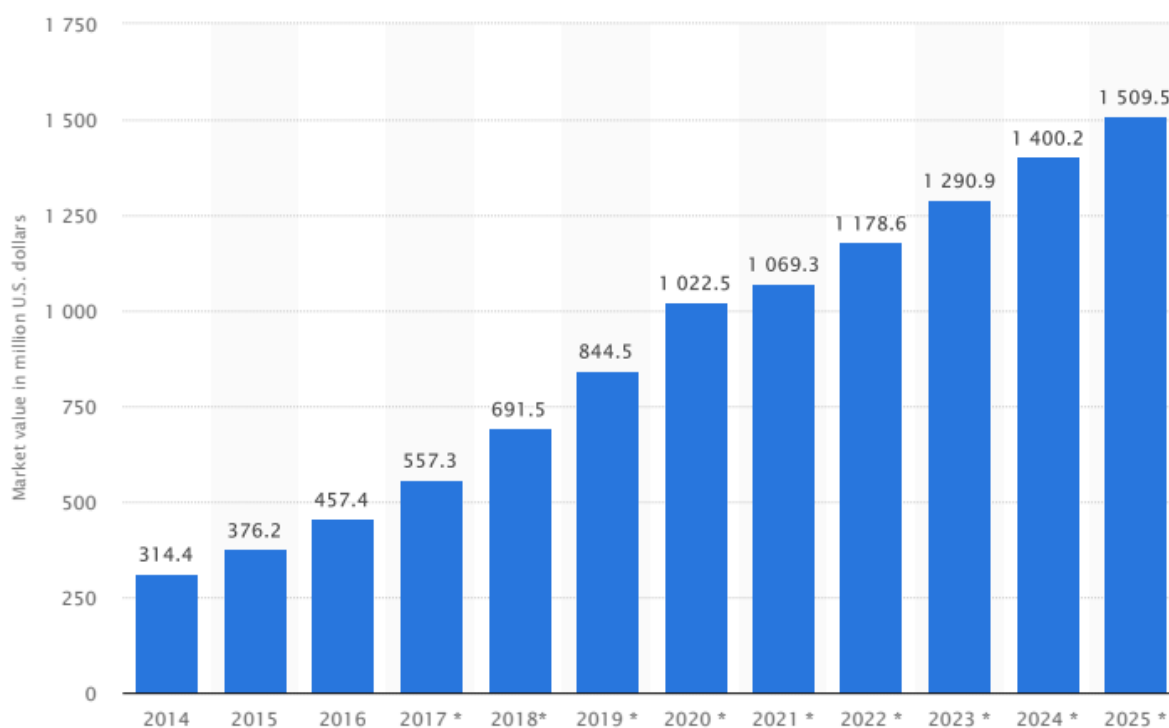
Las nanopartículas de oro han sido evaluadas para usos en diferentes campos, especialmente el médico, el tecnológico o en catálisis química. [14], [15]. De acuerdo con el pronóstico de valor de mercado de los Estados Unidos desde 2020 hasta 2025 [16], el mercado de nanopartículas de oro para uso en el campo médico alcanzará un valor de aproximadamente 800 millones de dólares. Una gráfica, adaptada de la referencia [16] ilustra la evolución del mercado de este tipo de nanopartículas en los próximos cinco años (ver figura 2 y 3).

Figura 2: Evolución del mercado de nanopartículas de oro por sectores en los Estados Unidos. Adaptada de la referencia [16]



Además, la gráfica anterior también muestra cómo evolucionará el mercado de estas nanopartículas en otros campos como el electrónico y catálisis. Como puede notarse, el incremento en el mercado de nanopartículas es notable, especialmente para uso médico. Esta tendencia está relacionada, entre otras, por las características de biocompatibilidad que presentan las nanopartículas de oro.

Figura 3: Evolución del mercado de nanopartículas de oro en los Estados Unidos. Adaptada de la referencia [17]



Como se mencionó anteriormente, las propiedades de biocompatibilidad que presentan los coloides con nanopartículas de oro, hacen que estos sistemas sean especiales candidatos para aplicaciones médicas. Muchos de los reportes encontrados en la literatura resaltan la facilidad que tienen este tipo de nanopartículas para ser funcionalizadas con diferentes moléculas, entre los cuales están los tioles [18], aminos [19], [20], aminoácidos [18], proteínas [21], entre otros. Las múltiples opciones de funcionalización han llevado a la comunidad científica a desarrollar aplicaciones en áreas como el diagnóstico, transporte y liberación de

medicamentos, biosensores, marcadores biológicos, agentes de contraste, [20] entre muchas otras aplicaciones. Es claro que la biocompatibilidad, donde se evalúa el nivel de toxicidad de las nanopartículas de oro, juega un papel clave para el desarrollo de aplicaciones a nivel médico. Un trabajo publicado por R. Shukla y colaboradores (2005) establece que las nanopartículas de oro no son citotóxicas, reducen la producción de especies reactivas de oxígeno y no promueven la producción de citotoxinas inflamatorias. [20] Sin embargo, la biocompatibilidad de estos sistemas, así como de muchos otros coloides con nanopartículas, está ligada a parámetros como el tamaño medio de las partículas, el estado de agregación de las mismas, la composición química o la forma. Actualmente, diversas investigaciones se enfocan en evaluar la citotoxicidad en función de los parámetros antes mencionados. En este trabajo, se prepararon diversos coloides de plata con el objetivo de evaluar la biocompatibilidad en plaquetas en función del tamaño y la concentración de nanopartículas de oro.

3 ÁREA PROBLEMÁTICA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Si bien la producción y estudio de sistemas de nanopartículas ha sido un campo de intensa investigación desde finales del siglo pasado, hoy en día existen muchas preguntas abiertas en relación a los protocolos usados en la síntesis o en las rutas establecidas para la obtención de sistemas reproducibles. Dada la importancia del proceso de síntesis en el resultado final, es necesario vincular el efecto de los parámetros de ésta con las propiedades finales del sistema obtenido.

Hablando particularmente de las rutas de síntesis, se sabe que mínimos cambios en los parámetros de la misma, ya sean ambientales (temperatura, presión, humedad, etc.) o impuestos a propósito (atmosfera, temperatura, velocidad de agitación, entre otros), conllevan a grandes modificaciones en las propiedades físicas y químicas de los productos obtenidos. Así pues, se hace necesario establecer criterios procedimentales, donde el control de cada parámetro sea estricto, de manera que se pueda conocer y explicar su influencia real sobre el producto final.

Como bien es sabido, los efectos de la nanotecnología sobre la calidad de vida han sido enormes, estos han traído consigo múltiples desafíos en diversos campos, desde lo científico hasta lo ético. El auge por desarrollar nuevos sistemas con características específicas, ha llevado a la comunidad científica a desarrollar un sinnúmero de nuevos materiales. La especificidad de éstos ha dado lugar a la aparición de nuevas fenomenologías, muchas de las cuales aún no han podido ser completamente explicadas. Solo por mencionar algunas, hoy día está abierto el debate en cuanto a que efecto tiene la agregación entre nanopartículas sobre diversas propiedades físicas o sobre el grado de biocompatibilidad. Igualmente, hay una discusión vigente, tanto ética como científica, del efecto de las nanopartículas en la salud humana.

De acuerdo a lo anterior surgen una enorme cantidad de interrogantes en diferentes flancos científicos. Desde esta tesis de maestría se pretende aportar resolviendo interrogantes particulares, como, por ejemplo: ¿cuáles parámetros se deben controlar para obtener sistemas de nanopartículas de oro y plata reproducibles, de tal manera que sus características fisicoquímicas se mantengan en el tiempo. Además, para el caso de los coloides de plata se pretende resolver la siguiente pregunta: ¿cuáles parámetros de la síntesis conllevan a obtener coloides de plata con un mayor efecto bactericida? Mientras que, para los coloides con nanopartículas de oro, este trabajo dará respuesta a la siguiente pregunta: ¿Cuáles son los factores de mayor relevancia para que un coloide con nanopartículas de oro tenga propiedades de biocompatibilidad?

4 JUSTIFICACIÓN

El éxito tecnológico que han tenido algunos dispositivos basados en nanomateriales, se debe principalmente a los nuevos mecanismos de síntesis desarrollados en la última década y a las nuevas propiedades que emergen a escala nanométrica. Sin embargo, cada día aparecen reportadas nuevas fenomenologías y con ello nuevos desafíos científicos asociados a la comprensión de los fundamentos que rigen estas fenomenologías. Los retos de la comunidad científica son muy variados, van desde el desarrollo de procesos de síntesis limpias, de mayor control y alta reproducibilidad, hasta la comprensión de nuevos comportamientos y la implementación de aplicaciones.

Como país, región e institución no somos ajenos a los efectos que ha traído la nanotecnología en los diferentes frentes productivos de nuestra sociedad. Ante este escenario, es imperioso que instituciones y centros de investigación nacionales tomen parte en discusiones cada día más relevantes y que en el futuro tendrán efectos sobre nuestra sociedad. Es así, que mediante los resultados que se obtendrán a través de este trabajo se pretende tomar parte de una discusión científica, aportando conocimiento en lo referente a mecanismos de síntesis de nanopartículas con propiedades ópticas, las cuales sean amigables con el medio ambiente y a la vez, reproducibles. Así mismo, mediante el estudio y análisis de las propiedades físicas, químicas, citotóxicas y de biocompatibilidad pretendemos contribuir con conocimiento relevante a los intereses de la comunidad científica.

5 REFERENTE TEÓRICO

En esta sección se presenta una breve descripción y puesta en contexto de los cuatro aspectos fundamentales a desarrollar en este trabajo: (i) síntesis de nanopartículas de oro y plata; (ii) propiedades ópticas de las nanopartículas de oro y plata; (iii) biocompatibilidad de coloides con nanopartículas de oro y el rol de la funcionalización y (iv) efecto bactericida de las nanopartículas de plata.

5.1 Síntesis de nanopartículas

En términos generales se puede decir que hay dos métodos de aproximación para la fabricación de nanomateriales: *bottom-up* y *Top-down*, el primero se basa en la miniaturización de componentes de materiales (hasta el nivel atómico), donde luego con un proceso de autoensamblaje se llega a la formación de nanoestructuras. La segunda aproximación, se basa en el uso de estructuras macroscópicas, las cuales son llevadas a escala nanométrica mediante procesos físicos o químicos. Ambas aproximaciones tienen ventajas y desventajas, las cuales han sido ampliamente discutidas por la comunidad científica [7].

Debido al interés de este trabajo en usar técnicas limpias, de fácil acceso y relativamente económicas, se usarán métodos de síntesis química basadas en aproximaciones *bottom-up* para la fabricación de los sistemas a estudiar. Si bien hay un sin número de protocolos establecidos para la síntesis química de nanopartículas, en este trabajo se implementó un método reportado por Santoro y colaboradores [22], el cual es derivado del método desarrollado por Turkevich en 1951 [23]. Este procedimiento permite obtener suspensiones coloidales de nanopartículas estables en solución acuosa. De acuerdo a los reportes, la reacción los iones de oro o plata (según el sistema a sintetizar) se presenta a los 100 °C, los primeros derivados del ácido tetracloroáurico (HAuCl_4) y los segundos del nitrato de plata (AgNO_3). La reducción química de los iones de plata u oro se realizó empleando un agente reductor, el cual también servirá como agente funcionalizador o recubrimiento que proporcionará estabilidad a las nanopartículas. Para este trabajo se usaron como reductor de los iones de plata una mezcla de ácido ascórbico más citrato de potasio, etilenglicol y

borohidruro de sodio. Para la reducción de los iones de oro, se implementaron como reductores: citrato de potasio, ácido cítrico y borohidruro de sodio. La implementación de diferentes reductores se debió a su efecto sobre el tamaño final de las nanopartículas. Mas detalles de la síntesis podrán ser consultados en la sección 7.

Esta estrategia de síntesis descrita anteriormente permite preparar grandes cantidades de material, de manera sencilla, económica y con rendimientos muy altos. Otra de las ventajas de este método de síntesis radica en que la superficie de las nanopartículas queda funcionalizada o recubierta, evitando pasos posteriores en el proceso. Sin embargo, tiene como contraparte que el control de la distribución de tamaños y formas no es del todo homogéneo.

Si bien el método de propuesto en este trabajo es de habitual uso para la síntesis de coloides de nanopartículas, existe una discusión abierta en cuanto al efecto que tienen ciertos parámetros sobre el producto final. Es en este sentido, este trabajo presenta un estudio del efecto que tienen algunos parámetros de la síntesis sobre algunas propiedades fisicoquímicas.

5.2 Propiedades ópticas de las nanopartículas de oro y plata

Tanto las nanopartículas de oro como las de plata suscitan un gran interés debido a las propiedades ópticas que emergen de su escala nanométrica como por sus posibles aplicaciones. Por ejemplo, el aprovechamiento de este fenómeno se ha implementado en aplicaciones de reconocimiento molecular, sensores biológicos, compatibilidad con *ADN*, entre otras [9], para el caso de los coloides con nanopartículas de oro. Por el lado de las nanopartículas de plata, estas son conocidas por sus efectos bactericidas, lo cual potencia su uso en procedimientos de desinfección y/o tratamiento de aguas [9].

Como ya se mencionó, el efecto óptico de estos nanosistemas al interactuar con la luz proviene de la estructura electrónica inducida por el tamaño y la forma de la nanopartícula.

Los fenómenos relacionados con la interacción de la luz y los electrones de la superficie de las NPs se estudian mediante la resonancia del plasmón de superficie (RPS). Cuando los electrones libres de las bandas de conducción de los átomos que se encuentran en la superficie de las nanopartículas interactúan con la luz, se induce una excitación colectiva de estos electrones, produciendo una oscilación coherente de los electrones de la superficie (ver figura 1). En las nanopartículas de Au y Ag, la resonancia es máxima y su frecuencia se produce en el campo visible del espectro electromagnético. Esta resonancia se origina cuando el tamaño de las nanopartículas es mucho menor que la longitud de onda de la radiación incidente. Por ejemplo, el pico donde se encuentra el máximo de resonancia en los coloides de plata está en torno a 400 nm, mientras que en los coloides de oro se encuentra alrededor de 520 nm. La frecuencia de resonancia y el ancho de la banda de absorción del plasmón para cualquier cuerpo metálico, dependen principalmente de la relación superficie/volumen. Para el caso de sistemas coloidales con nanopartículas metálicas, este depende del tamaño, de la forma y del estado de agregación de las nanopartículas. Esta dependencia permite ajustar la frecuencia de la luz reflejada, es decir, el color. La posibilidad de modificar las frecuencias de resonancia es el origen de algunas propiedades óptico-electrónicas.

En los objetos de escala macroscópica, la mayoría de los electrones se encuentra confinados en el volumen del material, como consecuencia de esto, la energía de los fotones (con longitudes de onda en el espectro visible) no es suficiente para promover una resonancia significativa del plasmón. Por otro lado, en los cuerpos de baja dimensionalidad, como las nanopartículas, la relación superficie/volumen alto, esto quiere decir que el número de átomos que se encuentra en la superficie de la nanopartícula es comparable con el número de átomos que se encuentra en el volumen. En este escenario, la incidencia de los fotones sobre la superficie metálica origina un efecto de resonancia que es apreciable. Este efecto es conocido como plasmón de resonancia superficial o SPR (por sus siglas en inglés) [12]. En el caso de los coloides metálicos, la frecuencia del pico de absorción se encuentra dentro del rango visible, lo cual genera que ciertos sistemas coloidales posean determinado color [24]. Para el caso de los coloides con nanopartículas de plata este es amarillo, mientras los coloides

de oro presentan comúnmente un color rojizo o azul, dependiendo de las características morfológicas de estas nanopartículas.

A medida que las nanopartículas de oro aumentan su tamaño, la longitud de onda del *SRP* se desplaza hacia la zona visible del espectro electromagnético de longitudes de onda mayores, que corresponden al color rojo. Es decir, se absorbe la luz roja y se refleja la luz azul, por lo que una solución coloidal con este tipo de partículas presentará una coloración azul (azul pálido o color púrpura). Cuando el tamaño de la partícula de oro aumenta hasta alcanzar dimensiones macroscópicas, las longitudes de onda del *SRP* se desplazan a la zona infrarroja del espectro electromagnético y la mayor parte de las longitudes de onda del campo visible son reflejadas (no absorbidas), presentando la dispersión coloidal un color claro translúcido. En la figura 4 es presentado los diferentes colores reflejados por suspensiones coloidales de nanopartículas de oro de diferente tamaño.

Figura 4: Dispersiones coloidales de nanopartículas de oro de diferentes tamaños y los colores producidos por la absorción de luz. (Figura tomada de [10])



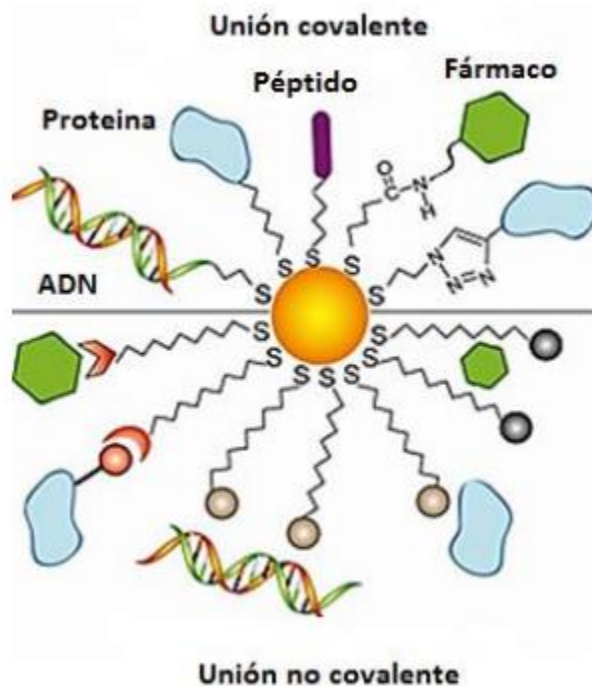
Igualmente, las nanopartículas de plata presentan espectro de absorción en de longitudes de onda que oscilan entre 300 y 400 nm (dependiendo del tamaño, la forma y el estado de agregación). El valor de la longitud del plasmón de resonancia puede variar dentro de un rango de valores, que va desde 393 nm hasta 738 nm. Es decir, suspensiones coloidales con nanopartículas de plata pueden variar su color, desde un amarillo claro a un color verde.

5.3 Biocompatibilidad. El rol de la funcionalización de las nanopartículas

El estudio de la biocompatibilidad de diferentes materiales ha llamado la atención de los investigadores desde mediados del siglo pasado. Las primeras investigaciones se llevaron a cabo en un contexto de implantes médicos y su interacción con el cuerpo. En 2010, Kohane y Langer definieron la biocompatibilidad, en el contexto del suministro de fármacos, definiendo ésta como "una expresión de la benignidad de la relación entre un material y su entorno biológico" [25]. Sin bien se ha discutido mucho sobre la biocompatibilidad de ciertos materiales, hoy en día la falta de datos certeros sobre algunos procesos biológicos específicos en respuesta a materiales extraños ha limitado la comprensión de la biocompatibilidad bajo ciertas condiciones. En este sentido, se hace necesario la evaluación de la biocompatibilidad de los biomateriales caso por caso, en un tejido particular y en una aplicación específica.

La síntesis, el estudio de las propiedades fisicoquímicas y el uso de nanopartículas biocompatibles para aplicaciones específicas se remonta a los últimos años. Muchas de las nanopartículas de materiales inorgánicos carecen de propiedades biocompatibles, sin embargo, al funcionalizar o recubrir su superficie con un agente éstas pueden tornarse aptas para aplicaciones que requieran su interacción con tejidos biológicos [12]. Básicamente hay dos estrategias cuando se decide de alterar la superficie de un conjunto de nanopartículas: recubrimiento con capas orgánicas, que incluyen surfactantes, polímeros, moléculas biológicas entre otras; y el recubrimiento con componentes inorgánicos, lo cuales pueden ser óxido de silicio (SiO_2), carbono, metales u óxidos [13]. Si bien la funcionalización de nanopartículas puede proveer propiedades de biocompatibilidad, este proceso también juega un papel importante en el control del estado de agregación, la agregación y la interacción entre las nanopartículas [14]. Aspectos fundamentales cuando se trata de pensar en aplicaciones de tipo biomédico. En la figura 5 se presenta un esquema de la funcionalización de una nanopartícula.

Figura 5: Funcionalización nanopartícula (tomado de [24])



Cuando se trabaja con nanopartículas en medios acuosos, surge un problema asociado con la estabilidad de éstas, es decir, cuando han pasado largos periodos de tiempo, las nanopartículas tienden a formar aglomerados en orden de reducir la energía superficial asociada con la elevada relación superficie/volumen. Por otro lado, muchas de las fases que se consiguen fabricar en tamaños nanométricos son químicamente activas, lo cual produce cambios en su estructura cuando entran en contacto con agentes químicos externos. En este orden de ideas, se hace imperioso desarrollar estrategias para controlar aglomeraciones y/o transformaciones de fase.

Si bien la funcionalización tiene por objetivo la estabilización, protección y posiblemente la biocompatibilidad de las nanopartículas, este proceso también resulta ser útil para ligar marcadores químicos y/o biológicos, lo cual abre la puerta a un sin número de aplicaciones, sobre todo en el transporte y liberación controlada de medicamentos o en el área de los biosensores.

5.4 Propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata

En el año 1940 se descubrió que la *Escherichia Coli* generaba una enzima capaz de hidrolizar la penicilina, esta fue la primera vez que se describió un mecanismo de resistencia de las bacterias a los antibióticos, hoy en día con la proliferación de bacterias multirresistentes se hace imperativo la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos [26]. Los efectos bactericidas de la plata se conocen desde la antigüedad, pues Hipócrates describió el uso de plata en polvo para la curación de heridas [27]. En la actualidad se ha estudiado el efecto de las nanopartículas de plata en bacterias, hongos [28], virus[29], células cancerígenas [30] e incluso parásitos. Si bien no se ha llegado a un consenso definitivo en cuanto a los mecanismos específicos en cada microorganismo, se tienen resultados alentadores. En bacterias se tienen reportes con *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros [30]. En hongos se tiene reportes con *Aspergillus Niger*, *Candida Albicans*, *Trichoderma Sp. Trichosporon Asahii* y varios más [28]. El efecto de varios sistemas de nanopartículas en virus se ha evaluado en varios casos; por ejemplo, se han reportado efectos contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B (VHB) [30]. Por último, en parásitos se tienen estudios con *Cryptosporidium parvum* [31], *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* y *Rhipicephalus microplus* [32].

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Producir nanopartículas de metálicas de oro y plata con propiedades ópticas para potenciales aplicaciones biomédicas.

6.2 Objetivos específicos

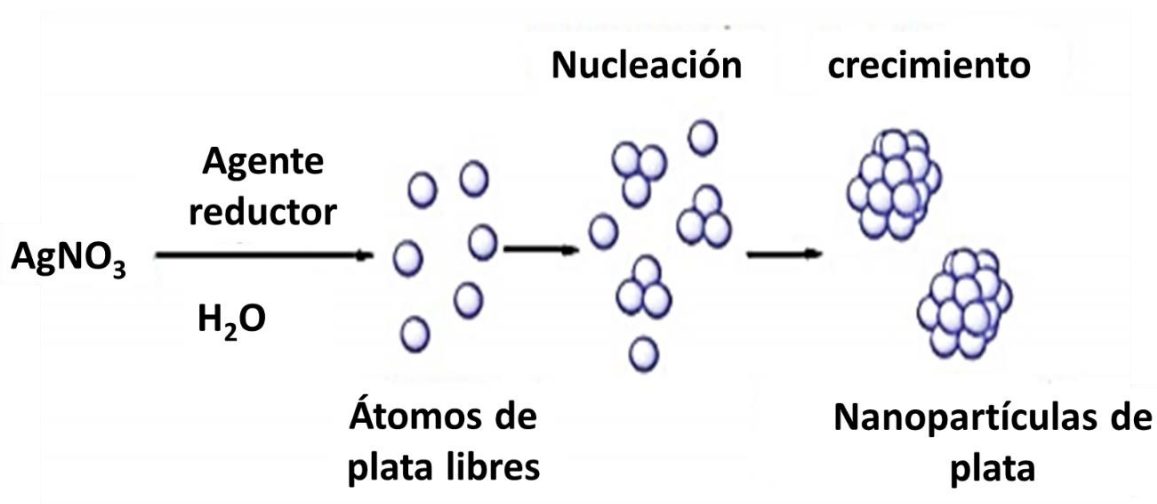
- Diseñar procedimientos de síntesis de nanopartículas metálicas de oro y plata con propiedades ópticas.
- Determinar las propiedades físicas, químicas y físico-químicas de los sistemas sintetizados en función del tamaño, tipo de recubrimiento, morfología y estado de agregación.
- Realizar análisis de biocompatibilidad de las nanopartículas obtenidas en función de tamaño, polidispersidad, tipo de recubrimiento, forma y estado de agregación.

7 METODOLOGÍA

7.1 Síntesis nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata se obtuvieron por síntesis química con una solución de nitrato de plata (AgNO_3) como agente precursor de la plata y un agente reductor el cual permite liberar los átomos de plata de la molécula de nitrato de plata como se ilustra en la figura 6. Se controlaron parámetros como el pH, la temperatura de la reacción y la relación agente precursor / agente reductor. Debido al carácter corrosivo de varios reactivos, es necesario conocer las fichas de seguridad de estos y manipularlos con las precauciones necesarias. Por ejemplo: uso de guantes, gafas de seguridad y tapabocas, en especial cuando se manipula nitrato de plata o borohidruro de sodio.

Figura 6: esquema de síntesis de nanopartículas de plata (adaptado de [27])



7.1.1 Ácido ascórbico como agente reductor (Ag1)

El ácido ascórbico (vitamina C), el cual está presente en gran cantidad de alimentos se usa como agente reductor, en este caso se utilizó además un agente estabilizante, citrato de potasio el cual recubre las nanopartículas y evita que estas se unan entre ellas y formen partículas demasiado grandes que precipiten. El pH de la solución se controló usando hidróxido de sodio, en este caso para aumentar el pH. Se realizaron experimentos previos para ver que rango de temperatura permitía la síntesis de nanopartículas estables en solución coloidal, con temperaturas cada 10°C entre 20°C (aproximadamente la temperatura ambiente de Manizales) y 90°C (temperatura a la cual empieza la ebullición en según las condiciones atmosféricas del lugar de síntesis). El procedimiento general utilizado es el siguiente:

- Solución de citrato de potasio 0,003 M: se pesan 0,0196 g de citrato de potasio grado analítico y se disuelven en 21 mL de agua destilada.
- Solución de ácido ascórbico 0,0006 M: se pesan 0,0024 g de ácido ascórbico grado analítico y se disuelve en 23 mL de agua destilada.
- Solución nitrato de plata: 0,1124 g de nitrato de plata grado analítico se disuelven en 6,5 mL de agua destilada.
- A un beaker con 20 mL de agua destilada se adiciona 4 mL de la solución anterior de citrato de potasio y 4 mL de la solución anterior de ácido ascórbico.
- Se adicionan gotas de una solución NaOH hasta que el pH este entre 8 y 12.
- Se calienta hasta una temperatura 80 °C y se gotea bajo agitación 0,10 mL de la solución anterior de nitrato de plata.

En la serie de experimentos previos se pudo observar que las temperaturas inferiores a 60 °C no formaban un coloide con las nanopartículas estables, sino que estas se agregaban, tornando la solución turbia y finalmente precipitando. Además, para temperaturas por encima de 85 °C la solución empieza a producir burbujas, evaporándose una considerable cantidad de agua cambiando por completo las concentraciones. En este orden de ideas, el sistema coloidal con nanopartículas de plata obtenido con esta ruta de síntesis se llevó a cabo a una temperatura entre 80 °C. Volúmenes de la solución de nitrato mayores a 0,15 mL también conllevan a un

oscurecimiento notable de la solución, lo cual puede estar relacionado con un exceso de nanopartículas de oro o con la formación de agregados. Es notable que las soluciones obtenidas por esta ruta son estables durante varias semanas o tal vez meses.

La muestra coloidal con nanopartículas de plata obtenidas mediante esta ruta se sintetizó se etiquetó como “Ag1”.

7.1.2 Etilenglicol como agente reductor (Ag2)

El etilenglicol es un diol (compuesto con dos grupos hidroxilos) con un punto de ebullición de 197.6 °C. En las síntesis que se llevaron a cabo con etilenglicol como agente reductor, se utilizó polivinilpirrolidona (PVP) como agente estabilizante. Se realizaron pruebas previas con temperaturas entre 10 °C y 110 °C, obteniéndose mejores resultados a temperaturas altas, además el elevado punto de ebullición del solvente permite alcanzar el rango superior fácilmente. El proceso general utilizado fue el siguiente:

- Solución de nitrato de plata 0,25 M: se diluye 1,05 g de nitrato de plata en 25 mL de etilenglicol.
- Solución de PVP 0,375 M: se diluye 0,025 g de PVP (PM 40 000) en 25 mL de etilenglicol. Ya que el PVP tiene una solubilidad reducida en etilenglicol se debe calentar la solución y agitarla.
- 10 mL de etilenglicol se mezclan con 4 mL de la solución de PVP, se lleva a calentamiento hasta 100 °C y se gotea lentamente 4mL de solución de nitrato de plata bajo agitación.
- En cuestión de segundos a minutos la solución toma un color amarillo intenso.

La muestra coloidal con nanopartículas de plata obtenidas mediante esta ruta se sintetizó se etiquetó como “Ag2”.

7.1.3 Borohidruro de sodio como agente reductor (Ag3)

En la literatura científica, el borohidruro es uno de los compuestos que se utiliza con mayor frecuencia para síntesis de nanopartículas metálicas, esto se debe a su gran efecto reductor, lo cual promueve una alta eficiencia en la síntesis. Sin embargo, su manipulación debe hacerse con mucha precaución ya que al descomponerse produce hidrogeno, el cual es altamente inflamable. Por ese motivo, las pruebas se realizaron llevando la solución a una temperatura máxima de 60 °C. Finalmente, se decidió realizar la síntesis con una temperatura de 50 °C. El proceso general para la síntesis de nanopartículas usando Borohidruro de sodio como agente reductor es el siguiente:

- Solución de nitrato de plata 0,001 M: 0,0165 g de nitrato de plata se disuelven en 97 mL de agua.
- Solución borohidruro de sodio 0,002 M: 0,0146 g de borohidruro de sodio se disuelven en 192 mL de agua.
- En un beaker con 10 mL de agua se le agrega 30 mL de la solución de borohidruro de sodio, se aumenta la temperatura hasta 50 °C y se adiciona poco a poco 10 mL de la solución de nitrato de plata.
- La solución adquiere un color amarillo/ naranja el cual se mantiene estable unos pocos días. Si se desea un coloide estable por más tiempo se puede agregar un agente estabilizante como el PVP que se utilizó en la ruta anterior.

La muestra coloidal con nanopartículas de plata obtenidas mediante esta ruta se síntesis se etiquetó como “Ag3”.

7.2 Prueba efecto bactericida

Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia Coli*, *Staphylococcus epidermidis*, y placa oral bacteriana. Las cepas fueron primero cultivadas en varios platos de *Petri* con agar sangre, sembradas por agotamiento e incubados de 24 a 36 horas para obtener disponibilidad

microorganismo para todas las pruebas. Luego de eso se procedió a sembrar varias cajas de *Petri* con los diferentes microorganismos (un solo microorganismo por caja). Se implementó el método de siembra masiva, el cual da como resultado una caja con crecimiento bacteriano homogéneo. Se impregnaron sensidiscos de 9 mm de diámetro con las diferentes soluciones de nanopartículas y se depositaron sobre las placas, asegurando que se establezca contacto con el agar ya inoculado. Como blancos y muestras de control se usaron sensidiscos impregnados con agua, con nitrato de plata a la misma concentración que se usó para la síntesis y con etilenglicol. Las soluciones con nanopartículas fueron previamente esterilizadas con exposición a luz ultravioleta. En unas cajas de *Petri* no se sembró ninguna bacteria, sino que se depositaron directamente los sensidiscos para comprobar la esterilidad de las soluciones con nanopartículas. Todas las cajas de *Petri* se incubaron a 37°C. La incubación de la *E. Coli* fue de 18 horas, de 24 horas para la *S. epidermidis* y 36 horas para la placa bacteriana oral. La diferencia de los tiempos de incubación se debe a que estos microorganismos, aún en ausencia de nanopartículas crecieron a ritmos diferentes, las cajas sin bacteria se dejaron por 48 horas sin observar crecimiento alguno de bacterias.

7.3 Síntesis de nanopartículas de oro

Para los 3 métodos de síntesis, el agente precursor del oro fue ácido cloroáurico 1 mM, el cual se prepara de la siguiente manera: se diluyen 0,0233 g de ácido cloroáurico puro en 68,8 mL de agua destilada, se debe poner especial cuidado con este compuesto y usar los implementos de seguridad en el laboratorio ya que se trata de un ácido fuerte. También se debe tener en cuenta que no puede entrar en contacto con ningún metal.

7.3.1 Ácido cítrico como agente reductor (Au¹)

El ácido cítrico es un compuesto que se puede encontrar en diversas frutas, como por ejemplo el limón o la naranja, por lo cual una síntesis de nanopartículas usando este compuesto

reductor y un adecuado recubrimiento podría resultar en partículas biocompatibles. El proceso que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Preparación solución de ácido cítrico 17 mM: se disuelve 0,0163 g de citrato de potasio en 5mL de agua destilada.
- En un beaker con 20 mL de agua destilada se adiciona 4 mL de ácido cloroáurico y se lleva a una temperatura de 85 °C.
- Se agrega 2 mL de la solución de ácido cítrico y se mantiene a 85 °C durante 20 minutos. Para compensar la pérdida de agua debido a evaporación, se agrega periódicamente agua destilada cuidando de mantener constante el volumen.

La muestra coloidal con nanopartículas de oro obtenidas mediante esta ruta de síntesis se etiquetó como “Au1”.

7.3.2 Citrato de potasio como agente reductor (Au2)

El citrato de potasio es un compuesto ampliamente usado en la industria alimenticia como regulador de acidez, por lo cual una síntesis de nanopartículas usando este compuesto podría resultar en partículas biocompatibles. El proceso que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Preparación solución de citrato de potasio 17 mM: se disuelve 0,0260 g de citrato de potasio en 5 mL de agua destilada.
- En un beaker con 20 mL de agua destilada se adiciona 4 mL de ácido cloroáurico y se lleva a una temperatura de 85 °C.
- Se agrega 2 mL de la solución de citrato de potasio y se mantiene a 85 °C durante 20 minutos. Para compensar la pérdida de agua debido a evaporación, se agrega periódicamente agua destilada cuidando de mantener constante el volumen.

La muestra coloidal con nanopartículas de oro obtenidas mediante esta ruta de síntesis se etiquetó como “Au2”.

7.3.3 Borohidruro de sodio como agente reductor (Au³)

El borohidruro de sodio es un compuesto usado en la síntesis de diversos compuestos orgánicos. El proceso que se llevó a cabo fue el siguiente:

- Preparación solución de borohidruro de sodio 17 mM: se disuelve 0,0032 g de borohidruro en 5 mL de agua destilada.
- En un beaker con 20 mL de agua destilada se adiciona 4 mL de ácido cloroáurico y se lleva a ebullición
- Se agrega 2 mL de la solución de borohidruro de sodio y se mantiene a 85 °C durante 20 minutos Para compensar la pérdida de agua debido a evaporación, se agrega periódicamente agua destilada cuidando de mantener constante el volumen.

La muestra coloidal con nanopartículas de oro obtenidas mediante esta ruta se sintetizó se etiquetó como “Au³”.

7.4 Técnicas de caracterización

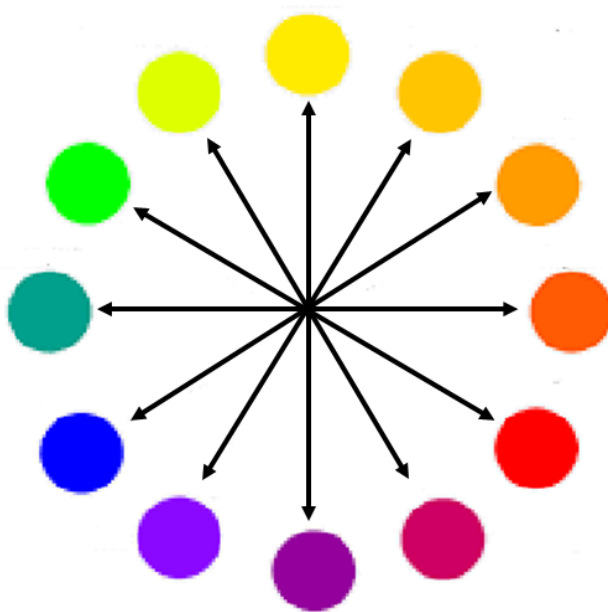
En esta sección se discutirán de manera breve las técnicas de espectrofotometría UV-Visible, espectroscopia de absorción atómica y microscopia electrónica de transmisión (TEM), las cuales fueron usadas para caracterizar y estudiar los sistemas sintetizados.

7.4.1 Espectrofotometría UV-Visible

La espectrofotometría es una técnica de caracterización basada en la interacción de la luz, con longitudes de onda en el espectro UV y visible con la muestra en cuestión. Básicamente consiste en irradiar una muestra con ondas electromagnéticas en el espectro ultravioleta y visible, generalmente entre 190 nm y 800 nm. El instrumento detecta las ondas transmitidas (I_T) y, dado que se conocen las propiedades de las ondas incidentes (I_0), se puede determinar

las ondas absorbidas (I_A) por medio de la expresión $I_0 = I_A + I_T$. Esta técnica es muy útil en la caracterización de sistemas coloidales con nanopartículas debido al fenómeno de resonancia del plasmón de superficie. Como ya se mencionó, este efecto está directamente ligado al tipo y tamaño de la nanopartícula. Las nanopartículas de plata tienen un pico en la absorbancia alrededor de los 400 nm, mientras que las nanopartículas de oro tienen un pico en la absorbancia un poco por encima de los 500 nm. Cabe resaltar que el resultado de la prueba nos muestra las longitudes de ondas absorbidas por lo tanto la muestra se verá con el color complementario. La figura 7 muestra los colores complementarios.

Figura 7: Colores complementarios. Realización propia



Las medidas de espectrofotometría UV-Vis fueron llevadas a cabo en el Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.

7.4.2 Espectroscopía de absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica es una técnica de caracterización que permite determinar la concentración de determinada especie química en una mezcla que puede ser

una solución líquida o bien un sólido. El método consiste en dispersar la muestra en un líquido (si esta es sólida) y atomizarla para crear una niebla. Posteriormente, por medio de una llama se logra la desolvatación y finalmente se expone a la energía específica del analito a determinar.

7.4.3 Microscopía electrónica de transmisión

Es claro que el tamaño de las nanopartículas es pequeño para la resolución de cualquier microscopio óptico, la morfología de estas se puede observar con un microscopio electrónico. La principal diferencia entre un microscopio óptico y uno electrónico es que el segundo no se usa lentes para amplificar la imagen obtenida directamente por una fuente de luz, sino que se utiliza una fuente de electrones, lo cual permite obtener incluso, para el caso de los más potentes microscopios electrónicos, imágenes a escala atómica. En este caso se utilizó un microscopio electrónico de transmisión (JOEL-TEM). La resolución es directamente proporcional a $\lambda^{3/4}$, donde λ es la longitud de onda de los electrones. A partir de las imágenes obtenidas por TEM se puede determinar el tamaño de las nanopartículas, composición, visualizar su forma y estado de agregación.

En la microscopía TEM el haz de electrones se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. Cuando el haz de electrones incide sobre la muestra se pueden presentar dos situaciones, primero que los electrones del haz atraviesen la muestra o que choquen con un átomo de la misma y terminen su recorrido. De este modo se obtiene información estructural de la muestra según las pérdidas específicas de los diferentes tipos de electrones del haz. El conjunto de electrones que atraviesan la muestra es proyectado sobre una pantalla formando una imagen visible. Para aumentar la resolución de un microscopio TEM es necesario disminuir la longitud de onda de los electrones, lo que se consigue empleando mayores potenciales de aceleración.

Las medidas de microscopía electrónica de transmisión (TEM) fueron realizadas en el International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL, Braga - Portugal) en un microscopio

JOEL – TEM, con la colaboración del Dr. Sebastian Calderon Velazco. Las muestras se prepararon usando una solución diluida del coloide, de la cual se tomó una gota y se dejó secar en un porta muestras Ted Pella.

7.5 Pruebas de biocompatibilidad en plaquetas

En esta sección se describirá el protocolo usado para realizar las pruebas de biocompatibilidad en plaquetas de algunos de los sistemas coloidales de nanopartículas sintetizados. Es importante notar que la ficha de seguridad del borohidruro de sodio, usado en algunos casos como agente reductor, establece que este es un compuesto altamente tóxico. En este sentido se desistió de realizar las pruebas de biocompatibilidad de los sistemas de nanopartículas en donde se usó este compuesto como agente reductor. Estas pruebas se centraron en los sistemas de nanopartículas en donde se usaron los otros agentes reductores.

Para el análisis de biocompatibilidad se tuvo como referencia la norma ISO 10993 “*Biological evaluation of medical devices*” en este caso se utilizó la *PARTE 4* de dicha norma, la cual es titulada como “*Selection of tests for interactions with blood*” [33]. Empleando protocolo establecido en dicha norma se observó el comportamiento (morfología y tamaño) de plaquetas en presencia y ausencia de nanopartículas. La metodología empleada se realizó usando el siguiente procedimiento:

- Se extraen del voluntario 10 mL de sangre, la cual se centrifuga a 5500 rpm por 5 minutos para separar el plasma pobre en plaquetas. Este último se centrifuga a 2000 rpm por 5 minutos para extraer el plasma rico en plaquetas, de esta forma se obtienen aproximadamente 3 mL.
- En tubos de ensayo se ponen 0,5 mL de plasma rico en plaquetas y 50 μ L de solución con nanopartículas. En uno de los tubos, en vez de nanopartículas se adiciona 50 μ l de agua destilada en orden de tener una muestra control.
- Se incuban las muestras a 37°C

- Se depositan 10 μ l de cada muestra en una cámara de Neubauer.
- Se observan las muestras al microscopio óptico usando un proscopio y el software Proscope Capture para almacenar y procesar las fotografías. Este proceso se realiza cada 3 horas durante las primeras 12 horas.
- Se hace el conteo de plaquetas utilizando el software imageJ

Se realizaron pruebas de biocompatibilidad a dos muestras de nanopartículas de plata y dos muestras de nanopartículas de oro con las siguientes características:

Ag1: Sintetizadas utilizando ácido ascórbico y citrato de potasio. Concentración de nanopartículas: 51.08 mg/L.

Ag2: Sintetizadas utilizando Etilenglicol y PVP. Concentración de nanopartículas: 5766 mg/L.

Au1: Sintetizadas utilizando ácido cítrico. Concentración de nanopartículas: 21,58 mg/L.

Au2: Sintetizadas utilizando citrato de potasio. concentración de nanopartículas: 7,9 mg/L.

8 RESULTADOS

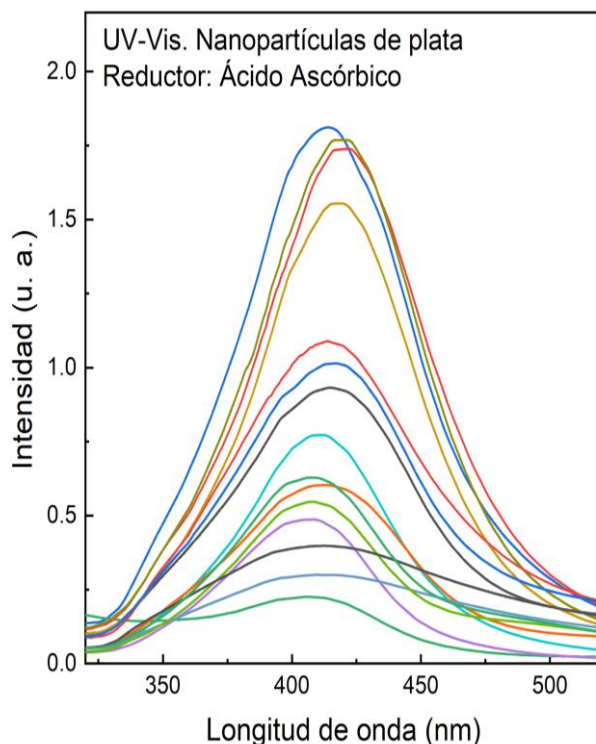
8.1 Nanopartículas de plata

De los tres sistemas coloidales con nanopartículas de plata, se seleccionaron aquellos en donde fueron usados el ácido ascórbico y etilenglicol como agentes reductores. Se descartó la muestra reducida con borohidruro de sodio (compuesto de alta toxicidad) ya que uno de los objetivos es evaluar las potenciales características de biocompatibilidad de estos sistemas cuando hay baja concentración de nanopartículas de plata.

8.1.1 Espectrofotometría UV-Visible

Tal como se esperaba, los sistemas coloidales obtenidos luego de la reducción de los átomos de plata, forman soluciones de color. De acuerdo con la figura 8, en donde se presentan los espectros de absorción UV-Vis de todas las muestras coloidales con nanopartículas de plata, se observa un pico cerca de los 400 nm [34]. En dicha figura también se observa que, tanto a la derecha como a la izquierda del máximo, se presenta una caída abrupta. Es notorio también que hay pequeñas diferencias en dicho máximo, lo cual puede estar relacionado con diferencias en el tamaño y estado de agregación de las nanopartículas, producto de diferencias en la ruta de síntesis, especialmente de los cambios en la temperatura de esta, lo cual afecta la dinámica de crecimiento de las nanopartículas. De acuerdo con la literatura, el valor de los picos de absorción obtenidos está relacionado con nanopartículas de plata de forma esférica con diámetros en el orden 1-50 nm presentan su pico de absorbancia cerca de los 400nm

Figura 8: Uv-VIS nanopartículas de plata. Realización propia



De acuerdo con los resultados, es claro hay diferencias tanto en la intensidad del pico como en el valor de éste. Esto último, como ya se indicó es un indicio de diferencias en el tamaño, la morfología o estado de agregación. Es importante notar que la concentración de nanopartículas de plata no afecta los modos de vibración y por ende es independiente de la absorbancia del sistema coloidal. Nótese que los picos representan las longitudes de onda absorbidas en mayor cantidad. Estas se encuentran en longitudes de onda entre 400 y 422nm, correspondientes al color violeta, por lo tanto, las soluciones tienen un color amarillo/naranja ya que reflejan en mayor medida las ondas de luz con las longitudes de onda correspondientes a dichos colores. Los resultados de dicha prueba son pertinentes con los encontrados en la literatura para coloides con nanopartículas de plata.

8.1.2 Absorción atómica

La técnica de absorción atómica fue empleada para determinar concentración de plata presente en las soluciones. De acuerdo con los resultados, se determinó que la concentración de plata en los coloides obtenidos usando etilenglicol como agente reductor fueron de

alrededor de dos órdenes de magnitud mayor a la concentración de plata cuando se utilizó ácido ascórbico como reductor. Esto era de esperarse ya que la cantidad de nitrato de plata utilizada en dicha ruta de síntesis es también mayor.

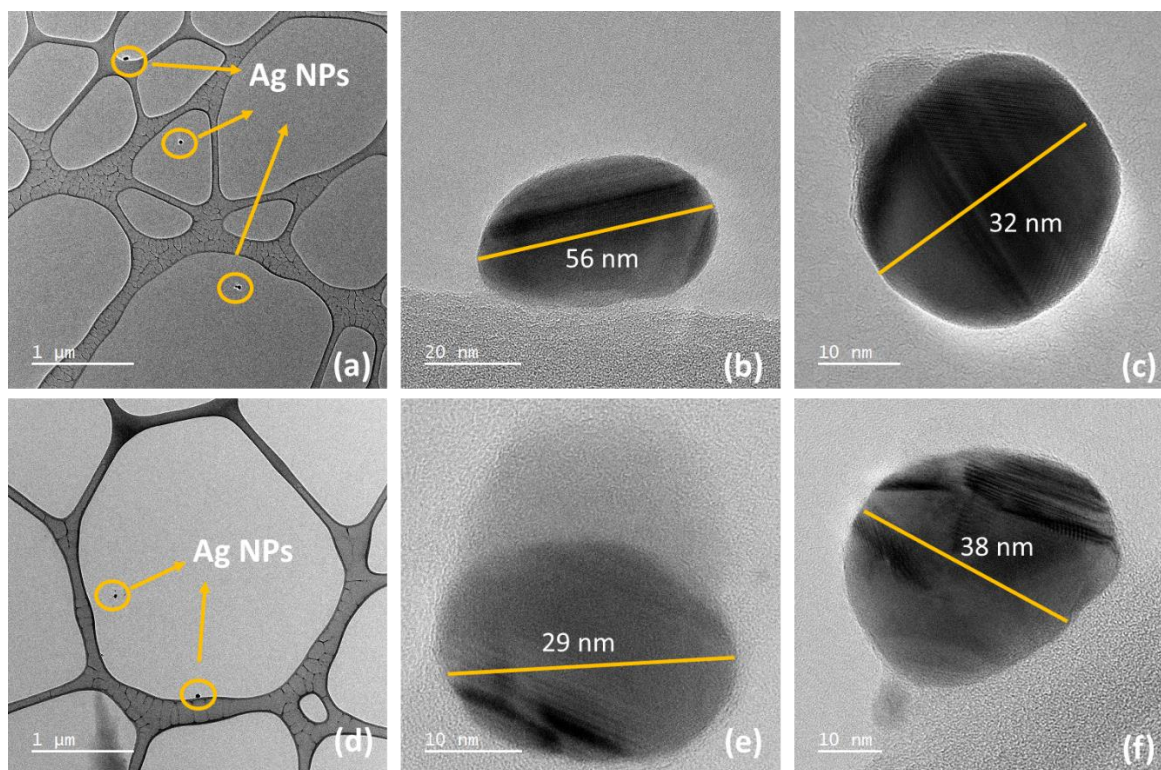
Tabla 1: Concentración nanopartículas de plata obtenidas mediante absorción atómica. Realización propia

RUTA	Concentración mínima de plata en mg/L	Concentración promedio de plata en mg/L	Concentración máxima de plata en mg/L
Ácido ascórbico/ citrato de potasio (Ag1)	2,65	31,11	74,79
Etilenglicol (Ag2)	234,44	4388,73	8206

8.1.3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la figura 9 se presentan los resultados de microscopia electrónica obtenidas de las muestras Ag1 (a, b y c) y de la muestra Ag2 (d, e y f). Debido a la alta dilución de los coloides al momento de preparar las muestras, no fue posible obtener una cantidad representativa de nanopartículas para construir una distribución de tamaños, sin embargo, los resultados muestran que en ninguno de los dos casos se presentan aglomerados, factor fundamental para la funcionalización y la mayoría de aplicaciones. A partir de estos resultados también puede decirse que las nanopartículas presentan una forma cuasi esférica en donde es posible notar diferentes familias de planos o facetas, esto último hace pensar que el crecimiento de las nanopartículas no se presenta en un solo paso, sino que luego de la nucleación se presenta un crecimiento en múltiples etapas. En ambos casos se presume una distribución amplia de tamaños, ya que, por ejemplo, en la muestra Ag1 es posibles observar una variación del diámetro entre 20 nm y 50 nm. Similar tendencia se observa en la muestra Ag2.

Figura 9: Imágenes TEM de las nanopartículas de plata usando como reductores ácido ascórbico – muestra Ag1 (a, b y c) y etilenglicol – muestra Ag2 (d, e y f). Realización propia



8.1.4 Efecto bactericida

Según los resultados de las pruebas bactericidas, las nanopartículas de plata producidas usando con etilenglicol como agente reductor (Ag2) mostraron un efecto bactericida notable sobre los cultivos de *E. coli*, *S. epidermidis* y placa oral. En contraste, el sistema coloidal en donde la plata se redujo con ácido ascórbico más citrato de potasio (Ag1), mostró inhibición levemente menor sobre las bacterias. Este efecto podría estar relacionado con la menor concentración de nanopartículas en la muestra Ag1, el cual fue confirmado mediante absorción atómica. Las nanopartículas producidas por borohidruro de sodio no fueron lo suficientemente estables para probar satisfactoriamente el efecto bactericida, igualmente debido a la toxicidad de dicho componente se descartó su uso. Con el propósito de comparar el efecto bactericida de los coloides de plata con la sal precursora, se realizaron pruebas del

efecto bactericida con nitrato de plata. Como se observa en las figuras 10, 11 y 12, este compuesto tiene un efecto no observable sobre los cultivos de bacterias.

Para el análisis cuantitativo del poder bactericida se utilizó la ecuación (1) reportada por Adams:

$$IIC = \frac{DIZ - DD}{DD} \quad (1)$$

En la cual *IIC* es el índice de inhibición, *DIZ* diámetro de la zona de inhibición y *DD* diámetro del sensidisco.

En las figuras 10 a 12, se pueden observar cajas de Petri con agar inoculadas con las bacterias. Los sensidiscos, que pueden ser identificados como discos en medio de los cultivos, fueron sumergidos por una hora en los coloides con nanopartículas de plata. En la figura se indica el coloide de plata utilizado en cada una de las pruebas.

Figura 10: prueba efecto bactericida en *E. coli*. Realización propia

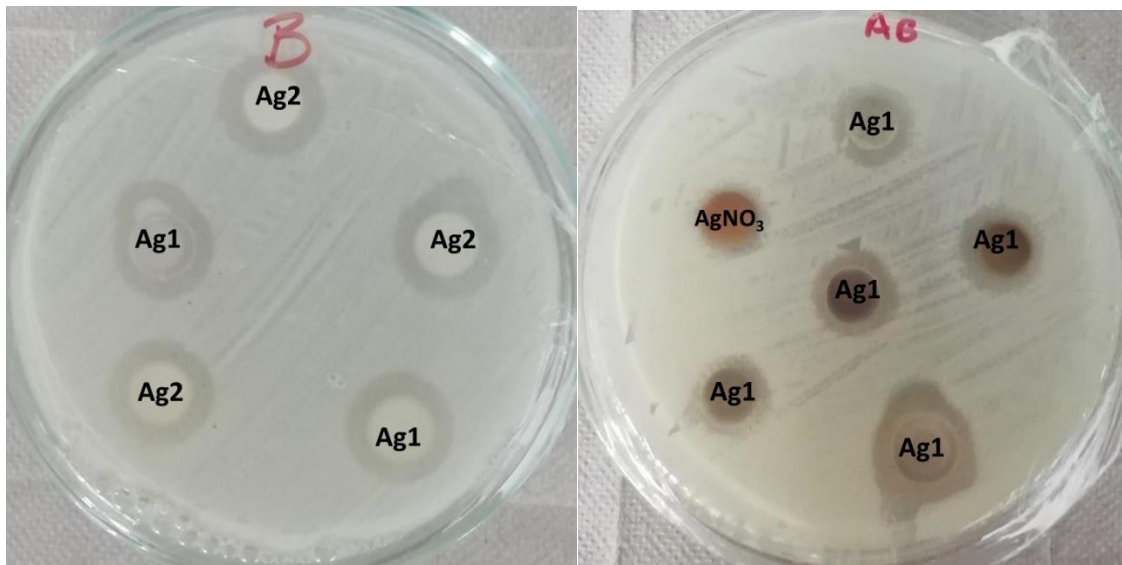


Figura 11: Prueba efecto bactericida en *S. epidermidis*. Realización propia

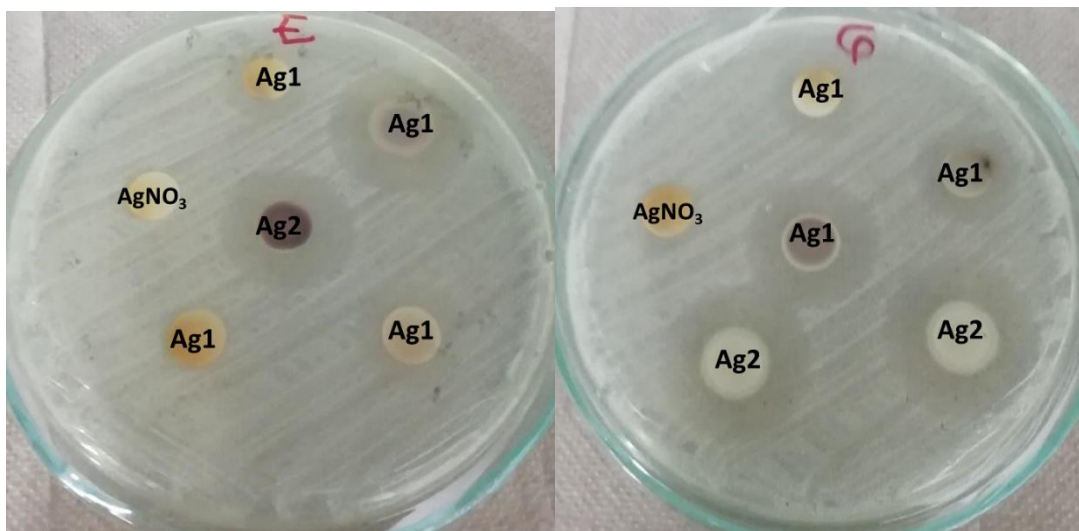
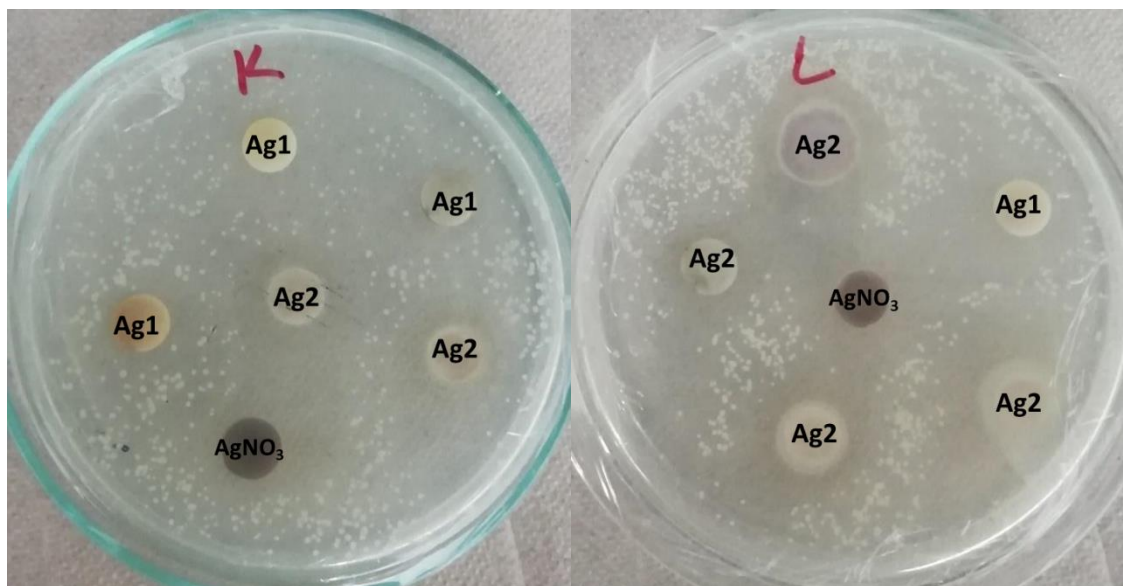


Figura 12: prueba efecto bactericida en placa oral. Realización propia



En las figuras 13 a 15 se puede ver como varía el índice de inhibición (IIC) sobre cada bacteria dependiendo de la concentración de nanopartículas de plata. Un resumen del comportamiento del IIC se presenta en la figura 16, donde se tienen todos los datos agrupados sin importar el tipo de microorganismo.

Figura 13: inhibición *S. Epidermidis*. Realización propia

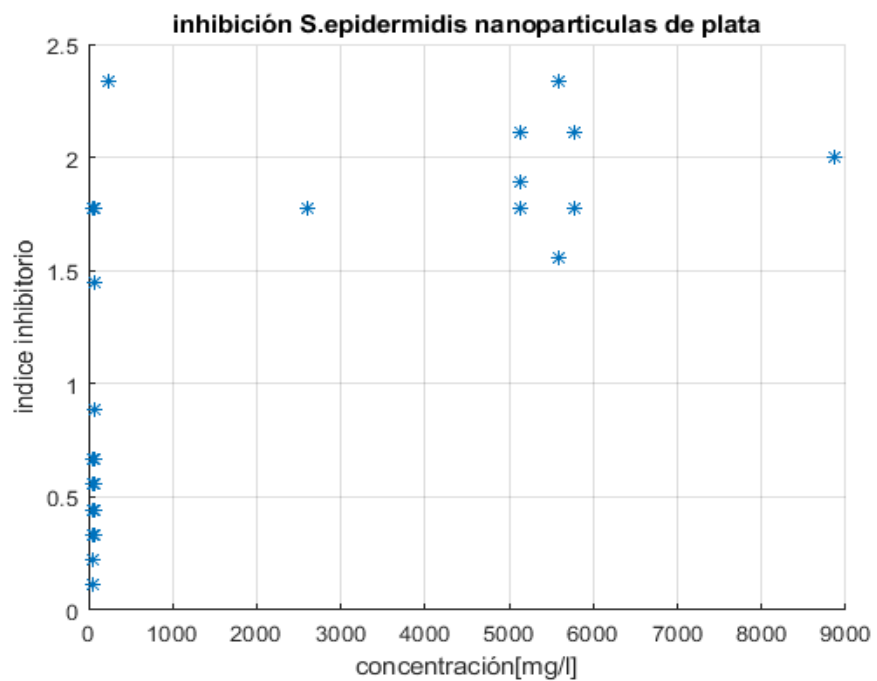


Figura 14: inhibición *E. Coli*. Realización propia

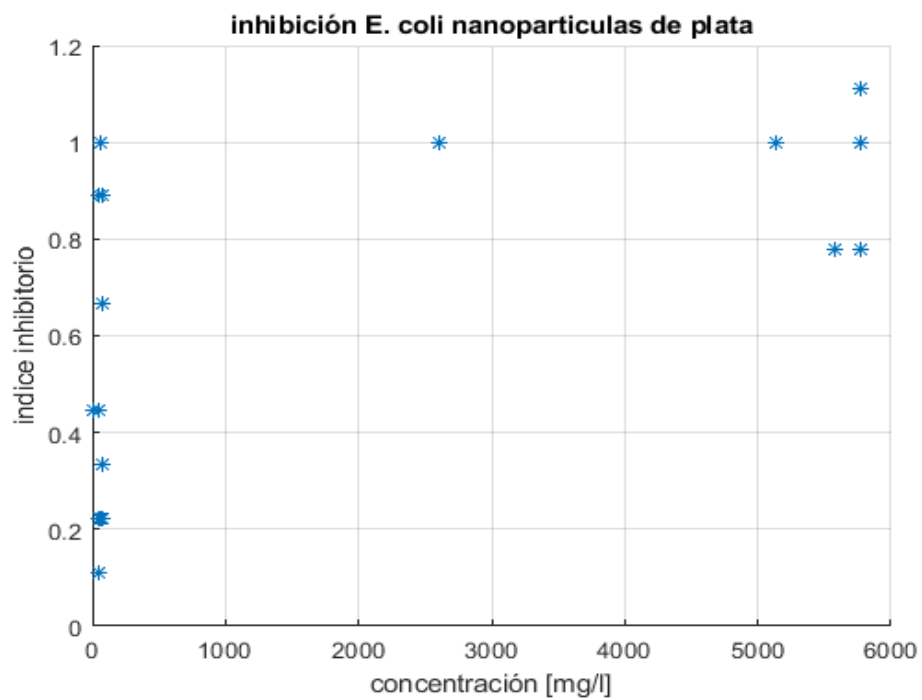


Figura 15: inhibición placa oral. Realización propia

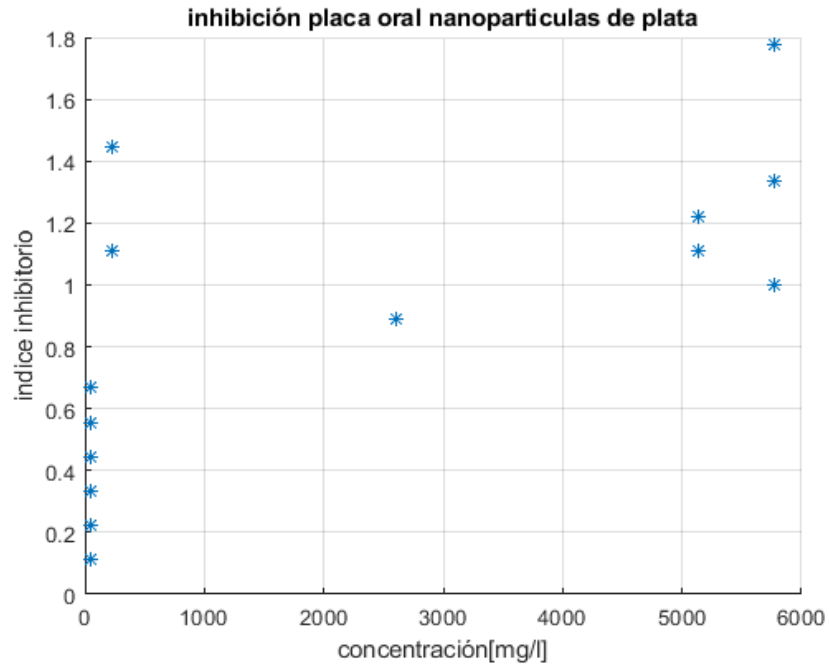
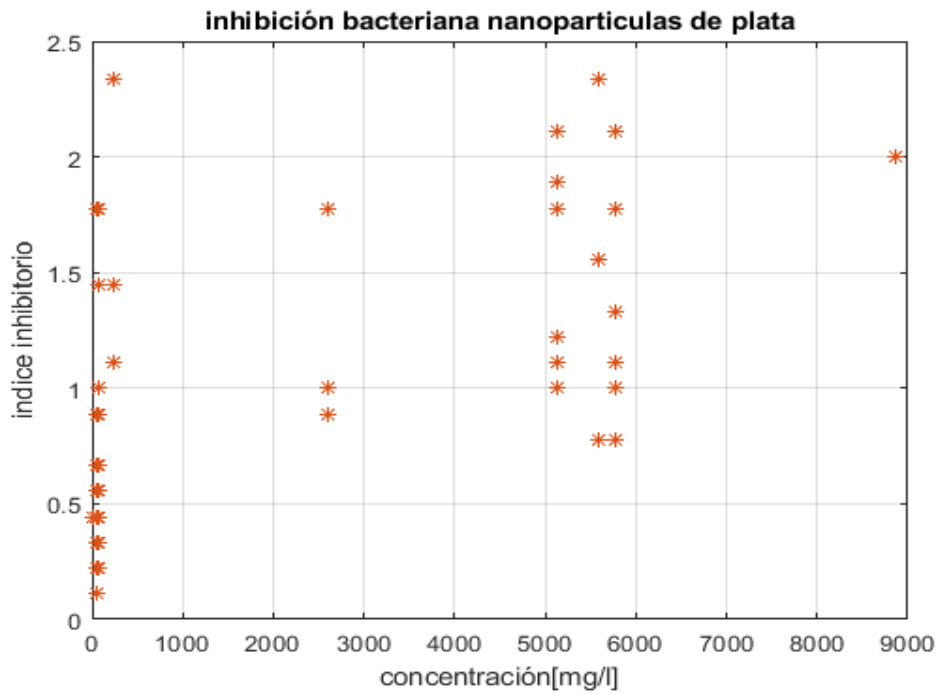


Figura 16: inhibición bacteriana. Realización propia



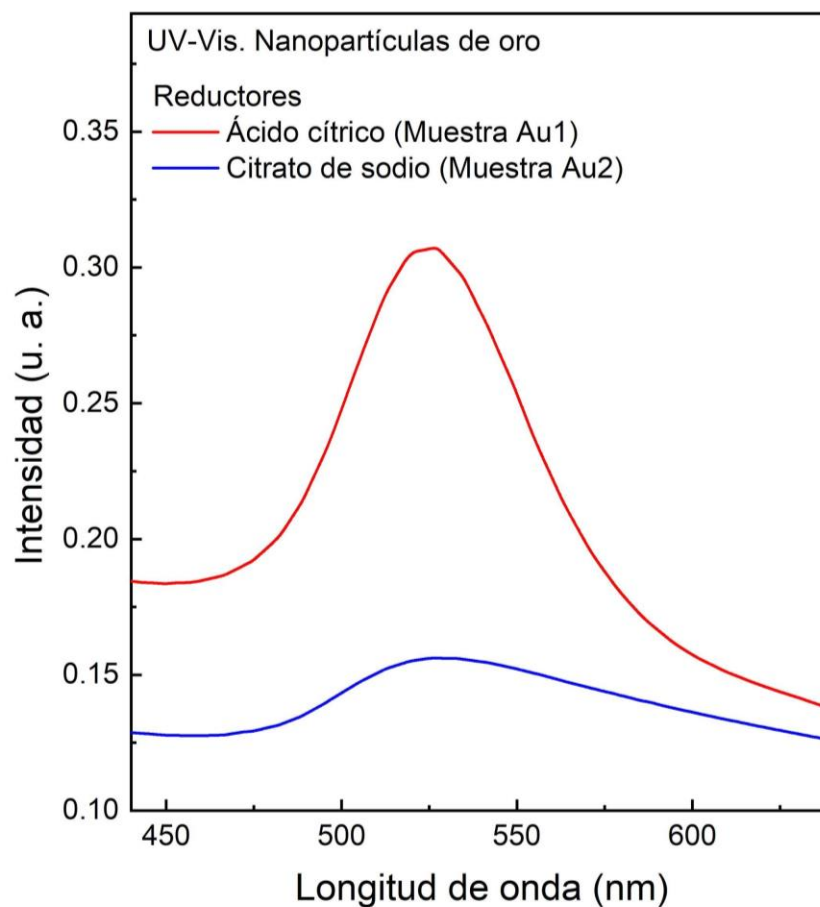
8.2 Nanopartículas de oro

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de la caracterización (UV-Vis y TEM) sobre dos sistemas coloidales con nanopartículas de oro. Los reductores usados para la obtención de los coloides fueron ácido cítrico (muestra Au1) y citrato de potasio (muestra Au2). Así mismo, se presentan los resultados de la biocompatibilidad de estos sistemas con plasma rico en plaquetas, en donde se presenta el porcentaje de plaquetas viables (identificadas según su morfología y estado de agregación) a diferentes periodos de tiempo. A modo de comparación, también se presenta el análisis de biocompatibilidad, bajo el mismo protocolo, de la muestra Ag1.

8.2.1 Espectrofotometría Uv-Vis

En la figura 17 se presenta el resultado de las pruebas de espectrofotometría UV- Vis para los diferentes coloides con nanopartículas de oro. Como es de esperarse, estos coloides presentaron un color violeta-rojo. Para ambas muestras, se observa un máximo de absorción bien definido alrededor de 520 nm. Además, a la derecha de ambos espectros se nota una caída abrupta del espectro, indicando que para longitudes de onda mayores de 650 nm ($\lambda > 650$ nm) prácticamente no se presenta absorción. A la izquierda de los espectros, es claro la aparición de un mínimo relativo, el cual es típico de los coloides de oro y cuya altura es aproximadamente 2/3 de la altura del máximo de absorción. [11]

Figura 17: UV-Vis nanopartículas de oro. Realización propia



8.2.2 Absorción atómica

En la tabla 2 se muestra las concentraciones de nanopartículas de oro obtenido por medio de la prueba de absorción atómica, no existieron diferencias notables en los resultados de las dos rutas de síntesis.

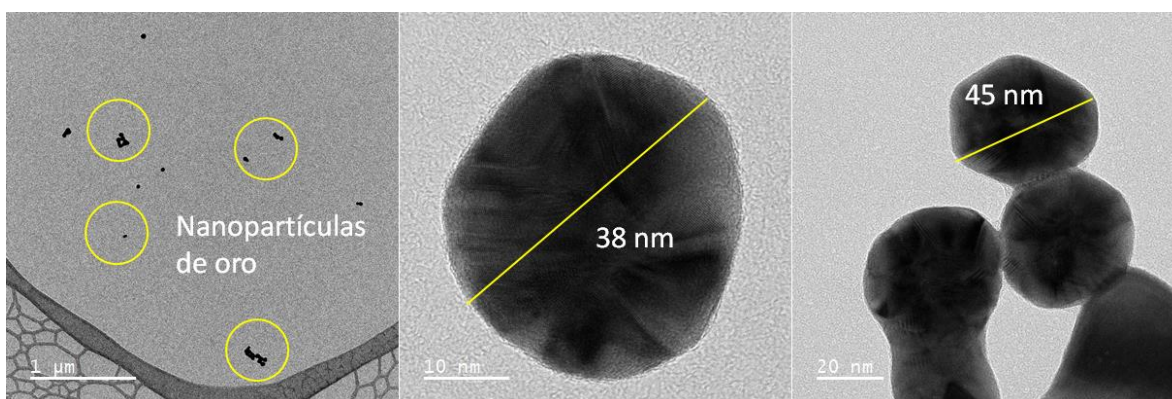
Tabla 2: Concentración nanopartículas de oro. Realización propia

Concentración mínima	Concentración promedio	Concentración máxima
0,45 mg/L	11,04 mg/L	21,58 mg/L

8.2.3 Microscopía electrónica de transmisión

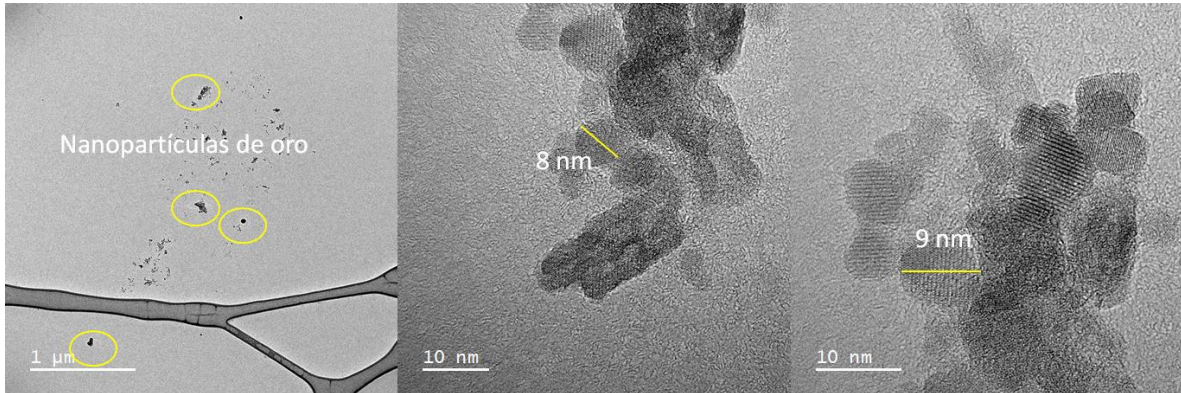
En la figura 18 se puede observar diversas imágenes de TEM de las nanopartículas de oro formadas usando ácido cítrico como agente reductor (Au 1). Según las imágenes las nanopartículas de oro tienen una forma regular (cuasi esférica), claramente definidas y con principios de agregación. De acuerdo a los resultados el tamaño de partícula se encuentra en el rango 30 a 50 nm.

Figura 18: TEM nanopartículas de oro Au1. Realización propia



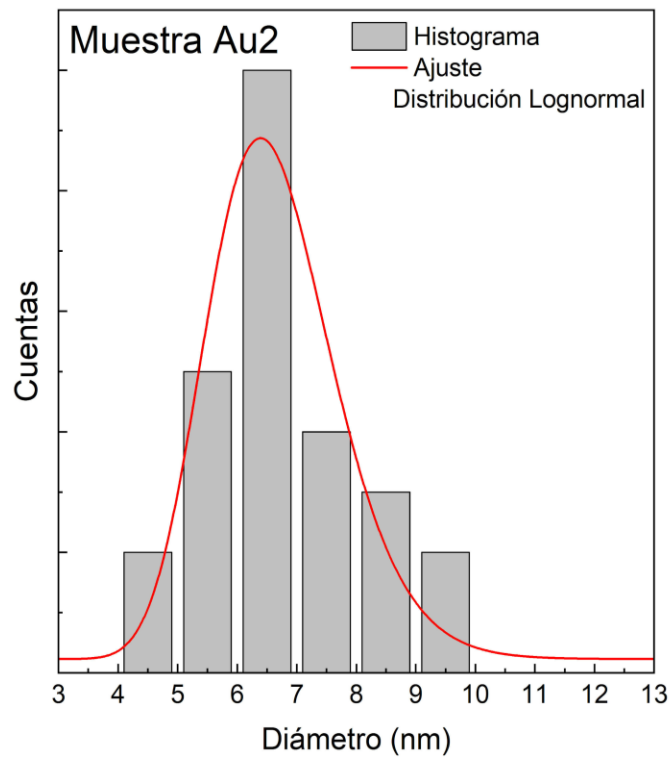
Por otro lado, las imágenes también dejan ver regiones, en una sola nanopartícula, más oscuras. Este fenómeno podría estar revelando la existencia de distintos planos cristalográficos, lo cual está relacionado con un crecimiento por etapas

Figura 19: TEM nanopartículas de oro Au2. Realización propia



En la figura 19 se puede observar gracias a una microscopia electrónica de transmisión las nanopartículas de oro formadas usando citrato de potasio como agente reductor (Au2) se observan partículas mucho más pequeñas (entre 5 y 12 nm) que se agregaron formando cúmulos.

Figura 20: Distribución de tamaño de partícula Nanopartículas de oro Au2. Realización propia



En la figura 20 se observa la distribución de tamaño de partículas de la muestra Au2. Adicionalmente se muestra el ajuste lognormal con el cual se obtuvo un diámetro promedio de $6,56 \pm 0,12$ nm y un valor de R^2 de 0,92.

8.2.4 Biocompatibilidad

La figura 21 muestra una imagen de las plaquetas en la cámara de Neubauer en el instante inicial, se puede observar que cada plaqueta está separada e independiente de sus vecinas. Cuando estas sienten una sustancia extraña tienden a activarse y finalmente a aglomerarse. Esto se puede ver en la figura 22 correspondientes al comportamiento de las plaquetas puestas en contacto con nanopartículas “Ag2”. En las demás muestras, incluyendo la muestra control, se obtuvieron ciertos grados de aglomeración, sin llegar al extremo de la figura 15, que fueron aumentando con el tiempo y a diferentes medidas según que nanopartícula se tenía.

Figura 21: imagen de las plaquetas no aglomeradas. Realización propia

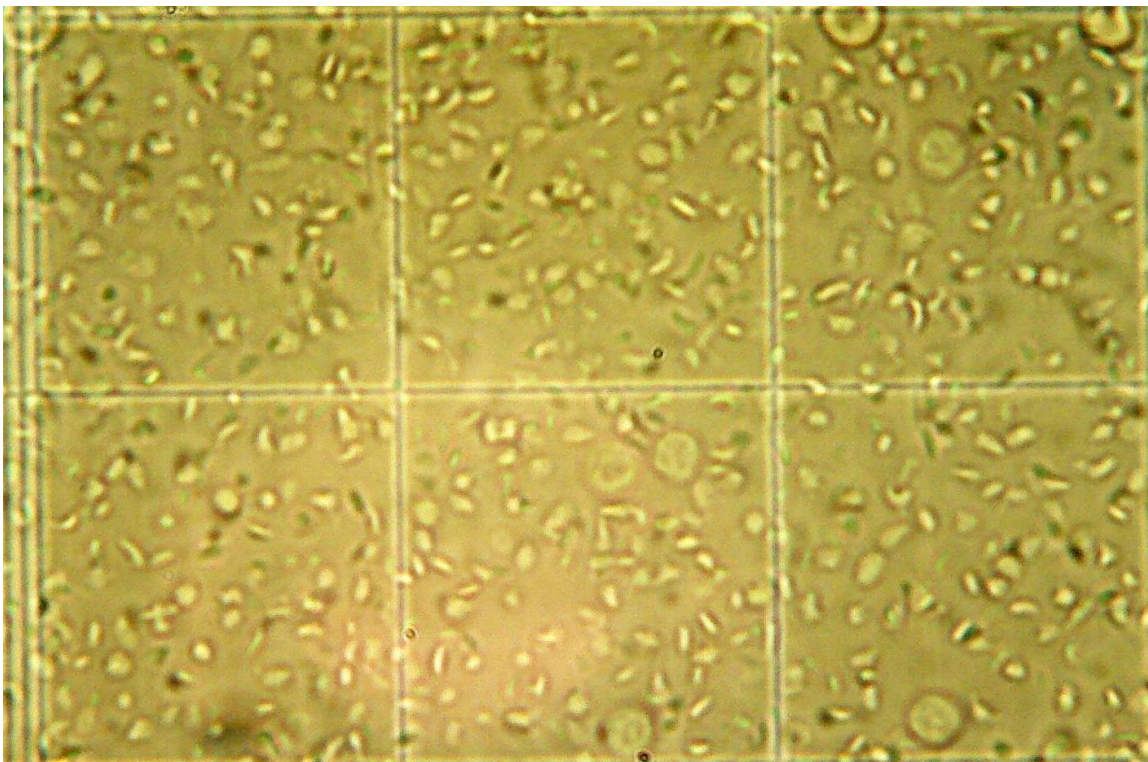
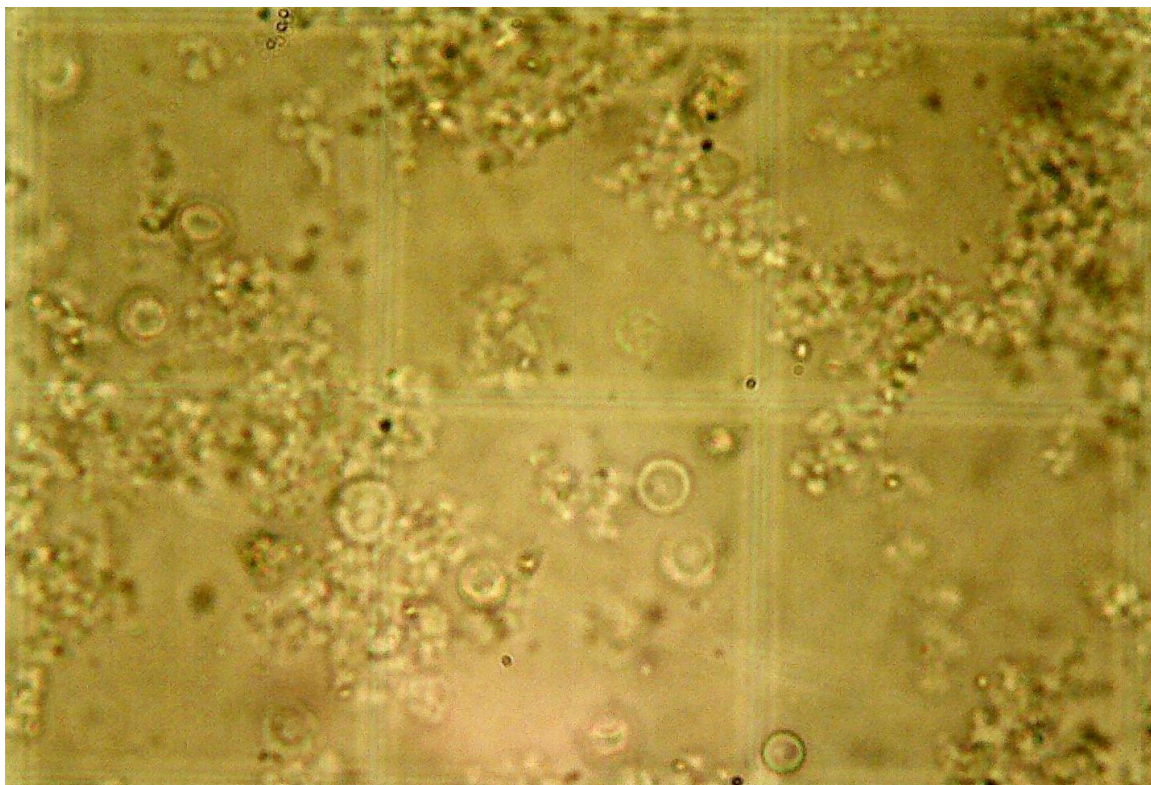
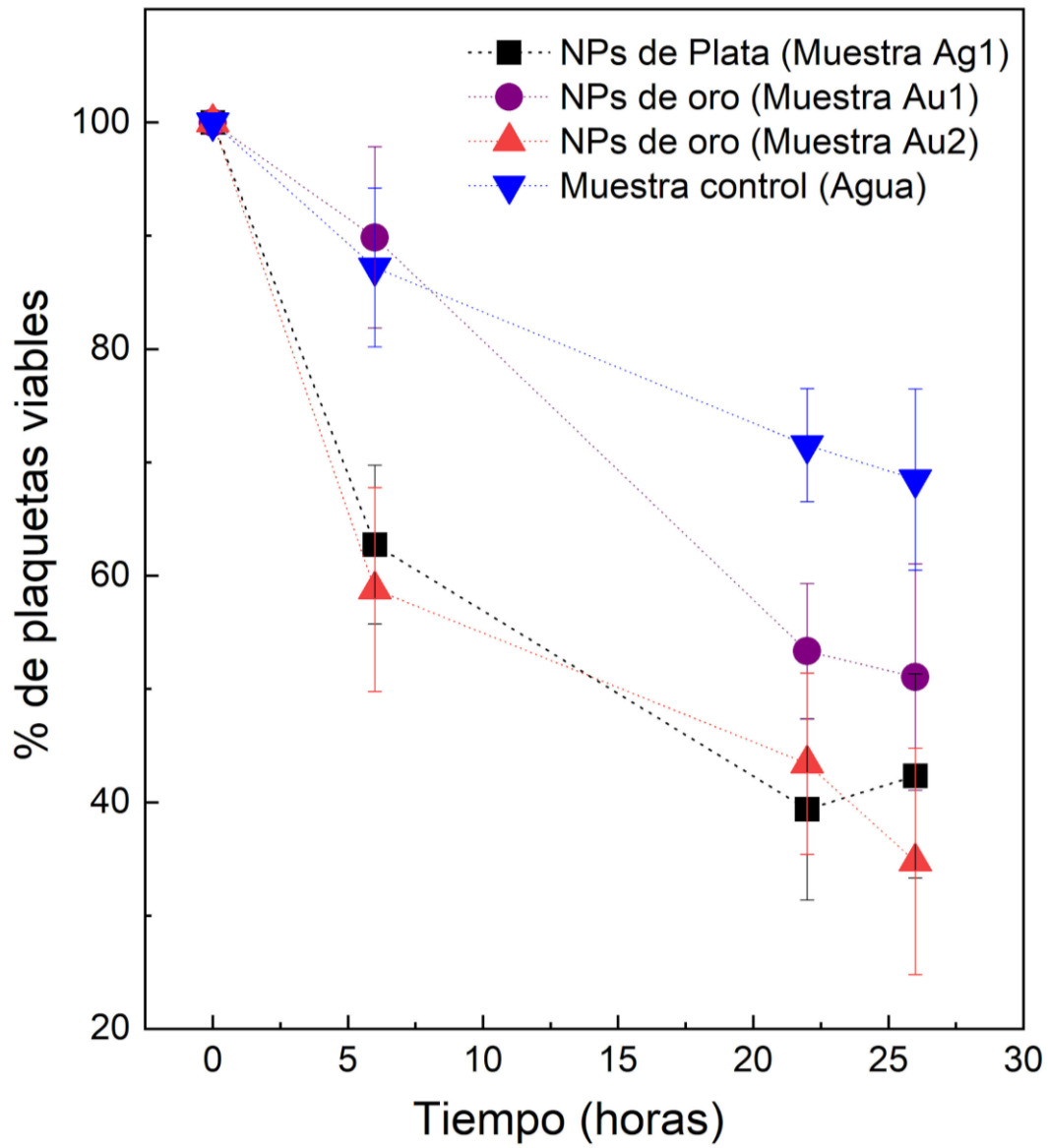


Figura 22: plaquetas completamente aglomeradas por el efecto de nanopartículas "Ag2". Realización propia



Además de registrar el número de plaquetas (no aglomeradas) en función del tiempo, se calculó el porcentaje de plaquetas que sobrevivieron en función del tiempo para ‘Au1’, ‘Au2’ y ‘Ag1’. No se grafican los valores de la muestra ‘Ag2’, ya que se observó una aglomeración casi total de las plaquetas desde el primer tiempo de medición por lo cual no era necesario seguir midiendo su efecto. Los porcentajes se muestran en la figura 23.

Figura 23: porcentaje de plaquetas en función del tiempo. Realización propia

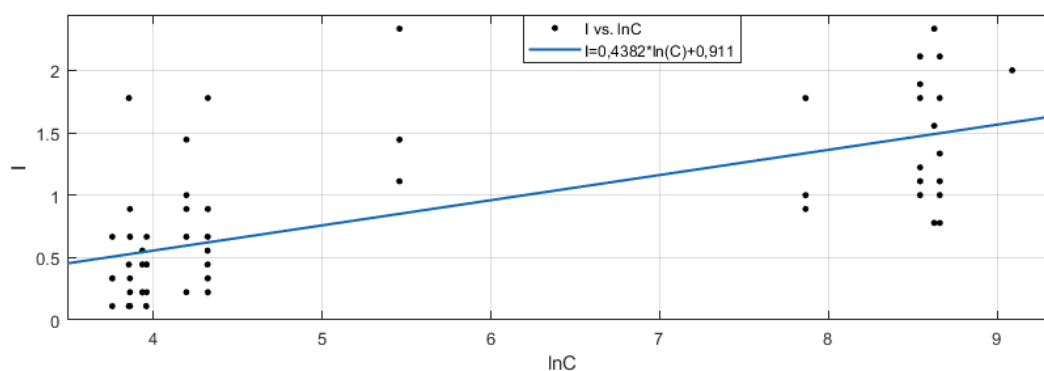


9 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Efecto Bactericida nanopartículas de plata

El hecho de que las nanopartículas de plata producidas con etilenglicol mostraron un efecto bactericida inmediato tuvieron efectos significativos luego de pasar por el proceso de evaporación, parece indicar que el efecto bactericida está íntimamente ligado con la concentración de nanopartículas ya que este parámetro era muy superior en los coloides obtenidos con etilenglicol. Lo anterior se evidenció con los 3 microorganismos diferentes. Adicionalmente se probó el efecto bactericida del nitrato de plata en solución a la misma concentración, la cual no tuvo efecto bactericida perceptible en ninguna de las 3 bacterias. En la figura 24 se propone una regresión para el índice de inhibición en función del logaritmo de la concentración de nanopartículas (en mg/L). La grafica presentada muestra indicios de la relación entre la concentración de nanopartículas y el efecto bactericida, sin embargo, es claro que existen otras variables tanto cuantitativas como cualitativas determinantes que no se están representando, por ejemplo, el tamaño de partícula y la forma.

Figura 24: índice de inhibición VS logaritmo de la concentración. Realización propia



9.2 Biocompatibilidad de las nanopartículas

La muestra 'Ag2' mostró un gran efecto de aglomeración sobre las plaquetas, además modificó el color de la muestra en pocas horas, por lo que esta no es biocompatible. La posible explicación de este efecto es su alta concentración (5766 mg/L) en comparación con las demás que no sobrepasaban los 52 mg/L. En todas las demás muestras se observa una disminución en el número de plaquetas totales a medida que pasa el tiempo, sin embargo, también se tiene este efecto con agua destilada por lo que es evidente que el porcentaje de conservación no tiene que ser cercano al 100%. En este caso es notable el efecto de Au1 que en 6 horas muestra un porcentaje de supervivencia de 96%, es decir 5 puntos mayor al del agua destilada que es del 91%. El análisis de biocompatibilidad solo se realizó hasta las 26 horas, tiempo en el cual la muestra control aún conservaba en un 70% sin aglomerar frente al 37% de la muestra 'Au1', ya que después de este tiempo, incluso las muestras con agua empezaban a aglomerarse en su totalidad.

10 CONCLUSIONES

- Las nanopartículas de plata mostraron un efecto bactericida con las 3 bacterias que se probaron, dicho efecto dependió de la concentración de nanopartículas al cual estuvieron expuestas. Sin embargo, se puede ver que existen otros factores que afectan el poder bactericida y deben ser estudiados con más detalle, tal como la distribución de tamaño de partícula y la forma de estas. Además, se probaron discos con antibióticos comerciales en las bacterias y la cepa de *E. coli* mostró resistencia a la mayoría de estos, por lo que un tratamiento con nanopartículas de plata constituye una alternativa viable al tratamiento de infecciones bacterianas, en particular a aquellas que se muestran cada día más resistente a los antibióticos.
- Las nanopartículas de oro demostraron tener un mayor grado de biocompatibilidad que las nanopartículas de plata, esto era de esperar ya que el oro es un elemento mucho más estable que la plata.
- Las nanopartículas de Oro Au2 tienen un tamaño inferior a las nanopartículas Au1. Siendo el reductor utilizado la única diferencia entre las síntesis, este debe ser el responsable de la diferencia de tamaños. El citrato de potasio ($K_3C_6H_5O_7$) utilizado en Au2 tiene exactamente la misma composición que el ácido cítrico $C_6H_8O_7$, excepto por los 3 átomos de potasio que reemplazan 3 de los átomos de hidrogeno. Teniendo en cuenta que la electronegatividad (capacidad de un átomo para atraer un electrón) del hidrogeno es de 2,1 mientras que la del potasio es de 0,8 se liberan más fácilmente electrones del citrato de potasio reduciendo una mayor cantidad de átomos de oro del ácido cloroáurico aumentando el número de puntos de nucleación.
- Aunque la muestra Au1 tiene mayor concentración de nanopartículas tuvo mejor biocompatibilidad que la muestra Au2, esto se podría deber a que el tamaño de las nanopartículas de Au1 es mayor que en Au2 y por lo tanto reduce su área superficial.

- Las soluciones de nanopartículas de plata producidas con etilenglicol (Ag2) quedaron con una concentración dos órdenes de magnitud por encima de las que fueron producidas con ácido ascórbico (Ag1), esto hizo que mostraran un mayor efecto bactericida, pero a la par disminuyó su biocompatibilidad.

11 RECOMENDACIONES

La biocompatibilidad de una nanopartícula se relaciona con varios factores, entre ellos su tamaño, forma, concentración y recubrimiento, es necesario seguir investigando acerca de los efectos conjuntos de estas 4 características. Además, existe en la literatura varios tipos de pruebas *in vitro* e *in vivo* dependiendo de la interacción específica de la nanopartícula con el organismo (sangre, piel, hueso, etc.).

Las nanopartículas de plata, como se demostró en este trabajo tienen poder bactericida, el cual se ve influido por otros parámetros que no se detallan en este estudio, por ejemplo, el tamaño de partícula y la forma. Adicionalmente, es importante estudiar si estas también pueden actuar sobre hongos, virus y parásitos, pero a la par seguir examinando su biocompatibilidad.

12 REFERENCIAS

- [1] V. Mody, R. Siwale, A. Singh, and H. Mody, "Introduction to metallic nanoparticles," *J. Pharm. Bioallied Sci.*, vol. 2, no. 4, pp. 282–289, 2010.
- [2] R. Srinivasan, Sowmya and Kumar, P. T. Sudheesh and Nair, Sreeja V. and Nair, Shantikumar V. and Chennazhi, K. P. and Jayakumar, "Antibacterial and Bioactive - and -Chitin Hydrogel/Nanobioactive Glass Ceramic/Nano Silver Composite Scaffolds for Periodontal Regeneration," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 9, pp. 1803–1816, 2013.
- [3] M. S. Holden *et al.*, "Antibacterial Activity of Partially Oxidized Ag/Au Nanoparticles against the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis* W83," *J. Nanomater.*, vol. 2016, p. 9605906, 2016.
- [4] O. Choi and Z. Hu, "Size Dependent and Reactive Oxygen Species Related Nanosilver Toxicity to Nitrifying Bacteria," *Environ. Sci. & Technol.*, vol. 42, no. 12, pp. 4583–4588, May 2008.
- [5] E. Navarro *et al.*, "Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*," *Environ. Sci. & Technol.*, vol. 42, no. 23, pp. 8959–8964, Oct. 2008.
- [6] J. Fabrega, S. R. Fawcett, J. C. Renshaw, and J. R. Lead, "Silver Nanoparticle Impact on Bacterial Growth: Effect of pH, Concentration, and Organic Matter," *Environ. Sci. & Technol.*, vol. 43, no. 19, pp. 7285–7290, Jun. 2009.
- [7] L. Yin *et al.*, "More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium multiflorum*," *Environ. Sci. & Technol.*, vol. 45, no. 6, pp. 2360–2367, Feb. 2011.
- [8] G. Laban, L. Nies, R. Turco, J. Bickham, and M. Sepulveda, "The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos," *Ecotoxicology*, vol. 19, pp. 185–195, 2009.
- [9] Z. Xiu, Q. Zhang, H. L. Puppala, V. L. Colvin, and P. J. J. Alvarez, "Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles.," *Nano Lett.*, vol. 12, no.

- 8, pp. 4271–4275, Aug. 2012.
- [10] M. Faraday, “Experimental Relations of Gold (and other Metals) to Light.,” *Phil. Trans. R. Soc.*, vol. 147, no. 0, pp. 145–181, 1857.
- [11] P. Tancredi, “Desarrollo de un sensor colorimétrico para detectar plomo,” Universidad de la República (Uruguay), 2011.
- [12] D. A. Vanden Bout, “Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications Edited by Daniel L. Feldheim (North Carolina State University) and Colby A. Foss, Jr. (Georgetown University). Marcel Dekker, Inc.: New York and Basel. 2002. x+ 338 pp. \$150.00. ISBN: 0-8247-0604-8,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 26, pp. 7874–7875, Apr. 2002.
- [13] S. Botasini, “Nanopartículas Y Desarrollo De Un Sensor Colorimétrico,” Universidad de la Republica Uruguay, 2016.
- [14] Mateo, D.; Morales, P.; Ávalos, A.; Haza, and Ana I, “Gold nanoparticles: Applications and in vitro cytotoxicity,” *Acta Toxicol. Argent*, vol. 21, no. 2, pp. 102–109, 2013.
- [15] M. Coura, G. Arroyos, L. Correia, and R. Frem, “Como Obter Nanopartículas De Ouro Usando Suco De Limão?,” *Quim. Nova*, vol. 41, no. 5, pp. 533–539, 2018.
- [16] <https://www.statista.com/statistics/1039934/us-gold-nanoparticles-market-size-by-end-use/>.
- [17] <https://www.statista.com/statistics/1039879/us-gold-nanoparticles-market-size/>.
- [18] P. R. Selvakannan *et al.*, “Water-dispersible tryptophan-protected gold nanoparticles prepared by the spontaneous reduction of aqueous chloroaurate ions by the amino acid,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 269, no. 1, pp. 97–102, 2004.
- [19] D. V. Leff, L. Brandt, and J. R. Heath, “Synthesis and Characterization of Hydrophobic, Organically-Soluble Gold Nanocrystals Functionalized with Primary

Amines,” *Langmuir*, vol. 12, no. 20, pp. 4723–4730, Oct. 1996.

- [20] R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, and M. Sastry, “Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview,” *Langmuir*, vol. 21, no. 23, pp. 10644–10654, 2005.
- [21] H. Joshi, P. S. Shirude, V. Bansal, K. N. Ganesh, and M. Sastry, “Isothermal Titration Calorimetry Studies on the Binding of Amino Acids to Gold Nanoparticles,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 108, no. 31, pp. 11535–11540, Jul. 2004.
- [22] J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, and R. L. Letsinger, “One-Pot Colorimetric Differentiation of Polynucleotides with Single Base Imperfections Using Gold Nanoparticle Probes,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 120, no. 9, pp. 1959–1964, Feb. 1998.
- [23] J. Turkevich, P. C. Stevenson, and J. Hillier, “A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold,” *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 11, no. 0, pp. 55–75, 1951.
- [24] K. Lance Kelly, E. Coronado, L. Lin Zhao, and G. C. Schatz, “The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 107, no. 3, pp. 668–677, Dec. 2002.
- [25] D. S. Kohane and R. Langer, “Biocompatibility and drug delivery systems,” *Chem. Sci.*, vol. 1, no. 4, pp. 441–446, 2010.
- [26] S. H. J. Leiva, “Continuada,” *Continuada*, vol. 4, no. 4, pp. 191–195, 2005.
- [27] M. Monge Oroz, “Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas,” *An. la Real Soc. Española Química*, no. 1, pp. 33–41, 2009.
- [28] Z.-K. Xia *et al.*, “The antifungal effect of silver nanoparticles on *Trichosporon asahii*,” *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 49, no. 2, pp. 182–188, Apr. 2016.

- [29] C. C. Berry and A. S. G. Curtis, “Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 36, no. 13, pp. R198–R206, Jul. 2003.
- [30] X. F. Zhang, Z. G. Liu, W. Shen, and S. Gurunathan, “Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 9, 2016.
- [31] P. Cameron, B. K. Gaiser, B. Bhandari, P. M. Bartley, F. Katzer, and H. Bridle, “Silver nanoparticles decrease the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 2, pp. 431–437, 2016.
- [32] S. Marimuthu *et al.*, “Evaluation of green synthesized silver nanoparticles against parasites,” *Parasitol. Res.*, vol. 108, no. 6, pp. 1541–1549, 2011.
- [33] INTERNATIONAL and STANDARD, *ISO 10993 Biological evaluation of medical devices*, 2nd ed. 2002.
- [34] F. Martinez, E. Zuñiga, and S. A., “Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionados con la nanotecnología,” *Mundo Nano*, vol. 6, no. 10, pp. 101–108, 2013.

13 ANEXO

Abstract Artículo aceptado para la publicación en la revista “Journal of Physics: Conference Series (JPCS)” de IOP.

Synthesis of colloidal silver nanoparticles and their bactericidal effects on *E. coli*, *S. epidermidis* and oral plaque

Juan Fernando Ramirez^{1*}, Juliana Ortiz¹, Jorge Andrés Cuellar², Carlos Andrés Naranjo², Francy Nelly Jiménez^{1,3} and Oscar Moscoso Londoño¹

¹Departamento de Física y Matemáticas, Universidad Autónoma de Manizales, Colombia.

²Departamento de Ciencias Básicas Biológicas, Universidad Autónoma de Manizales, Colombia.

³Departamento de Física y Química, Universidad Nacional de Colombia – Sede Manizales, Colombia.

*corresponding author: juan.ramirezhe@autonoma.edu.co

Abstract. Silver nanoparticles have been obtained by colloidal synthesis using two different reducing agents: ascorbic acid and ethylene glycol. The colloids have been characterized by UV-Vis Spectroscopy, atomic absorption and transmission electron microscopy (TEM). The UV-visible spectra show the typical peak with a maximum ranging between 390-420 nm, due to the plasmon resonance of spherical silver nanoparticles. TEM micrographs show non-aggregated spherical silver nanoparticles with diameters between 30 and 50 nm. The antibacterial effect was tested in three different bacteria cultures: *Escherichia coli* (gram negative), *Staphylococcus epidermidis* (gram positive) and dental plaque, which were grown in Mueller-Hinton agar. For comparative purposes the bactericidal effect of silver nitrate was also evaluated. Inhibition index (*IIC*) was calculated, obtaining satisfactory results for the three kinds of microorganism when silver nanoparticles are used.