

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de

Doctora en Ciencias Biológicas

Síntesis de nanopartículas de plata. Desarrollo de soportes antimicrobianos.

Sonia Inés Mancini

Director de Tesis: Ing. Gerardo D. López

Co-directora de Tesis: Dra. Silvia R. Hernández

Lugar de realización: Laboratorio de Sensores y Biosensores, FBCB, UNL

Nanotek S.A.

Inquimae, UBA

-2021-

Agradecimientos

A mi familia. A mis padres por darme la oportunidad de estudiar y crecer. A Fede, por la paciencia y por cuidar a Joaquina mientras yo escribía, y a Joaquina por entender que su mamá tenía que estar en la computadora por un tiempo para terminar un trabajo importante.

Agradezco enormemente a mis directores, Gerardo y Silvia, que nunca dejaron de apoyarme y alentarme para que pudiera terminar, leyendo a contra tiempo y poniendo todo de sí para que pueda presentar el trabajo de tesis.

A toda la familia Nanotek S.A. por brindarme la posibilidad de realizar esta tesis. A Gustavo, porque confió en mí. A Horacio, que cuando iba a Buenos Aires siempre estaba para lo que necesitara. Por hacer el contacto con el Inquimae, y Ernesto Calvo, que sin duda con ellos aprendí muchísimo y conocí gente muy valiosa. A Susana, Gisela, y Florencia, por el conocimiento brindado, por las charlas y los mates.

Agradezco a la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica, y al Conicet, por brindarme la beca para poder realizar el posgrado.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por permitirme realizar el doctorado.

A Verónica que me hizo ver todo el trabajo y esfuerzo realizado durante tanto tiempo.

Y como no me quiero olvidar de nadie y seguramente de alguien me voy a olvidar, agradezco a todas esas personas que se cruzaron en mi camino todos estos años y de alguna manera me ayudaron con el trabajo, que me preguntaban cómo iba con la tesis y me decían “dale que te falta poco”.

Agradezco a Dios.

¡Gracias!

Trabajos publicados

In Situ Silver Nanoparticles Production in a Polyelectrolite Net Recovering Polyester Autores: Mancini, López, Calvo, Filiiel Revista: Procedia Materials Science, Volume 1, 2012, Pages 608–613, 11th International Congress on Metallurgy & Materials SAM/CONAMET 2011
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211812812000831>

INDICE

INDICE	4
Abreviaturas y Símbolos	8
Resumen.....	9
Abstract	10
1 Introducción	11
1.1 Nanociencia y nanotecnología.....	11
1.2 Nuevos materiales	13
1.3 Nanopartículas metálicas.....	15
1.4 Resonancias de Plasmón para partículas esféricas	17
1.5 Métodos de caracterización de nanopartículas	19
1.5.1 Microscopía electrónica	19
1.5.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM)	20
1.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET o TEM).....	20
1.5.4 Espectroscopía dispersiva de rayos X (S o EDX).....	22
1.6 Mecanismos de acción de las nanopartículas de plata contra microorganismos.....	24
1.7 Toxicidad y ecotoxicidad de nanopartículas	26
1.8 Aplicaciones de las nanopartículas de plata	28
2 Objetivos generales	31
3 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata. Aplicación directa sobre textiles.	32
3.1 Introducción.....	32
3.1.1 Nanopartículas de plata	32
3.1.2 Síntesis química y física de nanopartículas de plata.	32

3.1.3	Síntesis química de nanopartículas de plata.....	33
3.2	Objetivos	35
3.3	Materiales y métodos.....	35
3.3.1	Síntesis de nanopartículas de plata.....	35
3.3.2	Caracterización de las nanopartículas	35
3.3.3	Impregnación de los textiles	35
3.3.4	Cuantificación del contenido de plata por absorción atómica	36
3.3.5	Ensayos microbiológicos	36
3.3.6	Ensayos de lavado	37
3.4	Resultados y discusión	37
3.4.1	Caracterización y estudio de estabilidad de las nanopartículas de plata coloidales.....	37
3.4.2	Impregnación preliminar de fibras textiles por aerosol e inmersión, con nanopartículas de plata coloidales.....	40
3.4.3	Evaluación de la cantidad de plata depositada.....	41
3.4.4	Ensayo de actividad antimicrobiana y lavado.....	42
3.5	Conclusión.....	44
4	Producción de nanopartículas de plata in situ dentro de una red polimérica formada capa por capa sobre un soporte textil.....	46
4.1	Introducción.....	46
4.1.1	Polímeros, polielectrolitos y complejos de polielectrolitos	48
4.1.2	Reductores.....	50
4.1.3	Método de autoensamblado capa por capa	51
4.2	Objetivos	52
4.3	Materiales y métodos.....	52

4.3.1	Procedimiento de deposición capa por capa y formación in situ de nanopartículas de plata	52
4.3.2	Cuantificación por absorción atómica.....	53
4.3.3	Caracterización por microscopía electrónica	53
4.3.4	Ensayos microbiológicos	53
4.3.5	Difusión en agar.....	53
4.3.6	Ensayo por contacto – Norma JIS Z2801	54
4.3.7	Ensayos de lavado.....	55
4.3.8	Análisis estadístico.....	55
4.4	Resultados y discusión	56
4.4.1	Ensayos preliminares	56
4.4.2	Elección de soportes textiles.....	56
4.4.3	Evaluación del tipo y número de capas de polielectrolitos y depósitos de plata.	58
4.4.4	Evaluación de reductores.	60
4.4.5	Evaluación del tiempo de inmersión en las soluciones de polielectrolitos.	61
4.4.6	Pruebas microbiológicas	62
4.4.7	Caracterización por Microscopía Electronica de Barrido (SEM) y Espectroscopía dispersiva de rayos x (EDS).	64
4.4.8	Preparado de textiles y evaluación de actividad antimicrobiana	65
4.4.9	Evaluación de la actividad antimicrobiana por un método por contacto (JIS Z2801).....	67
4.4.10	Ensayo de lavado. Evaluación de la pérdida de plata en el agua.	68
4.5	Conclusiones	69
5	Desarrollo de una pintura antimicrobiana formulada con nanopartículas de plata.....	70
5.1	Introducción.....	70

5.2	Objetivos	72
5.3	Materiales y métodos.....	73
5.3.1	Síntesis de nanopartículas de plata.....	73
5.3.2	Formulación de las pinturas	73
5.3.3	Ensayos antifúngicos de las pinturas. ASTM D 3273-76	73
5.3.3.1	Muestras procesadas	76
5.3.3.2	Interpretación de resultados	77
5.3.4	Ensayos antibacterianos de las pinturas. JIS Z2801:2000	77
5.3.4.1	Muestras procesadas	78
5.3.4.2	Interpretación de resultados	78
5.3.4.3	Procedimiento	79
5.4	Resultados y Discusión	79
5.5	Conclusiones	82
6	Conclusiones generales	84
7	Bibliografía	85

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

NpAg: nanopartículas de plata

NpAu: nanopartículas de oro

LBL: layer by layer - capa por capa

PAH: Clorhidrato de polialilamina

PAA: Ácido poliacrílico

PDDA (Policloruro de dialil-dimetil amonio)

UFC: unidades formadoras de colonias

TEM o MET: Transmission Electron Microscopy - microscopio electrónico de transmisión

SEM o MEB: Scanning Electron Microscope - microscopio electrónico de barrido

AFM: atomic force microscope - microscopio de fuerza atómica

EDS: Energy Dispersive X-Ray – Energía dispersiva de rayos x

La nanotecnología permite la creación de nuevos materiales, dispositivos y sistemas, útiles y funcionales, mediante el control de la materia en la escala del nanómetro, y el aprovechamiento de nuevos fenómenos y propiedades físicas, químicas y biológicas a esa escala dimensional.

En este trabajo de tesis se planteó como objetivo sintetizar nanopartículas de plata y la incorporación de éstas a distintos materiales, para conferirles a los mismos un poder antimicrobiano. Las sales de plata y las nanopartículas de plata se utilizan en variadas aplicaciones para el control de infecciones, en forma de apósitos y compresas, que contienen superficies “antimicrobianas” con plata y nanopartículas de plata.

En primer lugar, se realizó la síntesis de nanopartículas de plata coloidales (NpAg), logrando una suspensión muy estable de las mismas, cuyo tamaño promedio de nanopartículas rondó los 50 nm. En su caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM), se observó su estructura cristalina característica de la plata, y el análisis por difracción de rayos X (EDS) confirmó su composición.

En cuanto a los textiles, se utilizaron aquellos que podrían tener aplicaciones médicas (algodón, en vendas) o técnicas (poliéster, ropa de trabajo). Para cada tipo de fibra se evaluaron diferentes parámetros, ya que difieren mucho entre sí en su composición química, y no reaccionan de la misma manera durante el proceso de impregnado. Se ensayaron dos métodos de impregnación de las fibras. El primero depositando directamente mediante un aerosol la suspensión ya preparada de NpAg coloidales estabilizadas con almidón. El segundo, formando las nanopartículas *in situ* dentro de una red polimérica previamente depositada en la superficie del textil, utilizando borohidruro como reductor. En este caso el tamaño promedio de las nanopartículas formadas fue entre 30 y 80 nm. Los dos métodos presentaron buenos resultados, con sus ventajas y desventajas cada uno.

En el depósito directo por aerosol de una suspensión de concentración 500 ppm de Ag, la cantidad de plata cuantificada fue de 65 ± 8 mg Ag en 100 g de tela en algodón y 50 ± 10 mg Ag en 100 g tela, para poliéster. Mientras que mediante la formación de nanopartículas *in situ*, se obtuvieron 64 ± 2 mg Ag en 100 g tela para algodón y 25 ± 5 mg Ag en 100 g tela en poliéster. En cuanto al comportamiento en los ensayos microbiológicos frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, todas las muestras inhibieron el crecimiento microbiano en mayor o menor medida. En los ensayos de difusión por disco, las telas fabricadas por depósito directo de nanopartículas presentaron mayores halos de inhibición, consecuencia de tener mayor disponibilidad de NpAg en la superficie, mientras que las producidas por la técnica de formación *in situ* de NpAg dentro de la red polimérica, presentaron halos más chicos, propio de generar una difusión menor de la plata al medio, por estar incluida dentro de la red.

La segunda matriz evaluada fue una pintura de base acuosa utilizada para paredes. La preparación de las muestras en este caso consistió simplemente en mezclar la pintura con la suspensión de NpAg sintetizadas *ex situ*, en distintas concentraciones (50, 250 y 500 ppm). El comportamiento antimicrobiano de las pinturas se evaluó utilizando normas internacionales (ASTM y JIS). El mejor resultado de la actividad antifúngica lo mostró la pintura formulada con una concentración final de 500 ppm de nanopartículas, inhibiendo significativamente el crecimiento de hongos ambientales. En cuanto a la actividad antibacteriana, los resultados mostraron actividad entre aceptable y pobre, según el criterio de evaluación de la Paint Research Association (PRA) de Inglaterra.

Queda mucho por desarrollar en el campo de nuevos materiales como los presentados en este trabajo, mejorando las formulaciones y procesos para lograr una mayor actividad antimicrobiana, y mejores propiedades de los productos.

Si bien este trabajo representa pruebas iniciales y preliminares en el desarrollo de textiles y pinturas con propiedad antimicrobiana, este fue el punto de partida para lograr el desarrollo de productos basados en estas matrices, hoy disponibles en el mercado.

ABSTRACT

Nanotechnology allows the creation of new useful and functional materials, devices and systems, the control of matter through the nanometer scale, and the use of new phenomena and physical, chemical and biological properties at that dimensional scale.

In this thesis, the objective was to synthesize silver nanoparticles and its incorporation to different materials, to give them an antimicrobial power. Silver salts and silver nanoparticles are used in a variety of infection control applications, under the form of dressings and compresses, which contain “antimicrobial” surfaces with silver and silver nanoparticles.

In the first place, the synthesis of colloidal silver nanoparticles (NpAg) was carried out, achieving a very stable suspension thereof, which average nanoparticle size was around 50 nm. In its characterization by transmission electron microscopy (TEM), the characteristic crystalline structure of silver was observed, and X-ray diffraction analysis (EDS) confirmed its composition.

Regarding textiles, those that could have medical applications (cotton, bandages) or technical (polyester, work clothes) were used. Different parameters were evaluated for each type of fiber, since they differ greatly in their chemical composition, and do not react in the same way during the impregnation process. Two methods of impregnation of the fibers were tested. The first by directly depositing by means of an aerosol the already prepared suspension of colloidal NpAg stabilized with starch. The second, by forming the nanoparticles in situ within a polymeric network previously deposited on the surface of the textile, using borohydride as a reducing agent. In this case, the average size of the nanoparticles formed was between 30 and 80 nm. The two methods presented good results, though each with their advantages and disadvantages.

In direct spray deposition of a suspension with a concentration of 500 ppm of Ag, the quantity of silver quantified was 65 ± 8 mg Ag in 100 g of cloth on cotton and 50 ± 10 mg Ag in 100 g cloth, for polyester. While by means of the formation of nanoparticles in situ, 64 ± 2 mg Ag in 100 g cotton fabric and 25 ± 5 mg Ag in 100 g polyester fabric were obtained. Regarding the behavior in the microbiological tests against bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, all the samples inhibited microbial growth to a greater or lesser extent. In the disk diffusion tests, the fabrics manufactured by direct deposit of nanoparticles showed greater inhibition halos, a consequence of having greater availability of NpAg on the surface, while those produced by the technique of in situ formation of NpAg within the polymeric network, presented smaller halos, due to a lower diffusion rate of silver to the medium, because it is included within the network.

The second matrix evaluated was a water-based paint used for walls. The preparation of the samples in this case consisted simply in mixing the paint with the suspension of NpAg synthesized ex situ, in different concentrations (50, 250 and 500 ppm). The antimicrobial behavior of the paints was evaluated using international standards (ASTM and JIS). The best result of antifungal activity was shown by the paint formulated with a final concentration of 500 ppm of nanoparticles, significantly inhibiting the growth of environmental fungi. Regarding antibacterial activity, the results showed activity between acceptable and poor, according to the evaluation criteria of the Paint Research Association (PRA) of England.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Nanociencia y nanotecnología

La *nanociencia* es un área emergente de la ciencia que se ocupa del estudio de los materiales de muy pequeñas dimensiones, se centra en entender los fundamentos y propiedades de aquellos materiales cuyo tamaño se encuentra comprendido entre el de átomos (o moléculas) y de la materia condensada en estado sólido, líquido o gaseoso en la macroescala. Es decir, es aquella rama de la ciencia que busca el descubrimiento y la interpretación de los fenómenos en la nano-escala, la acumulación de nuevos conocimientos, la conceptualización de nuevas categorías, sus relaciones y sus leyes.

La *nanotecnología*, basada en la nanociencia, puede ser entendida como un nuevo tipo de ingeniería aplicable en la escala nano. Se trata del desarrollo de técnicas experimentales que permitan la observación, la medida, la manipulación y la fabricación de estructuras, objetos, dispositivos y sistemas nanométricos. Esta idea fue expresada públicamente por primera vez, ya en 1959, por el genial Premio Nobel de Física, Richard Feynman en su célebre conferencia “There is plenty of room at the botom”, coloquialmente «Hay mucho espacio en el fondo» [1]. En esta conferencia planteaba el futuro del diseño y la ingeniería a nivel molecular. Dijo:

“Cuando nos sumergimos en el mundo microscópico, por ejemplo, un circuito de 7 átomos, tenemos muchas cosas nuevas que pueden suceder completamente distintas y que representan oportunidades de diseño completamente nuevas. Los átomos en una pequeña escala presentan un comportamiento que no tienen nada que ver con escalas mayores, ya que satisfacen leyes de la mecánica cuántica. Entonces, cuando trabajamos a escalas moleculares estamos trabajando con leyes completamente distintas y podemos esperar hacer cosas completamente diferentes.”

Feynman describió procesos en los cuales los científicos podrían manipular y controlar átomos y moléculas de forma individual.

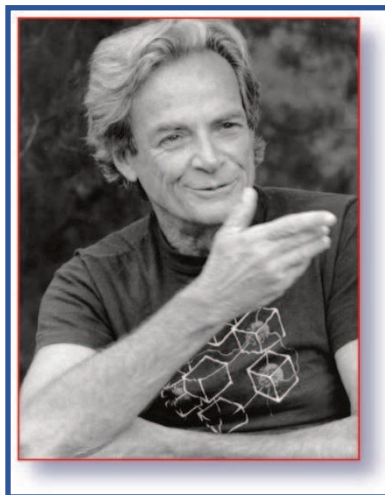


Figura 1. Premio Nobel de Física, Richard Feynman

(Imagen modificada de <https://fisica.cab.cnea.gov.ar/colisiones/staff/barra/otros/young/index.html>)

Alrededor de una década después, con sus experimentaciones el Profesor Norio Taniguchi definió el término *nanotecnología*. No fue hasta el año 1981, con el desarrollo del microscopio de efecto túnel que se pudieron “ver” átomos individuales, que la nanotecnología moderna comenzó.

Hoy día tenemos ya una capacidad científica e industrial que era insospechada al final del siglo pasado. En los últimos años han surgido gran número de patentes y publicaciones científicas asociadas al mundo nanométrico.

Si bien la nanotecnología es un área relativamente nueva, la investigación de objetos a escala nanométrica no es nueva en lo absoluto. El estudio de los sistemas biológicos y de la ingeniería de muchos materiales, tales como dispersiones metálicas coloidales, *quantums dots*, y catalizadores han formado parte del mundo nanométrico durante siglos.

Uno de los objetos más antiguos e interesantes donde se puede encontrar materiales nanométricos es un hermoso cáliz hecho por los romanos hace mil seiscientos años atrás, la Copa de Licurgo que se encuentra en el Museo Británico. La copa representa la historia del Rey Licurgo, enredado en las vides por su traición contra Dioniso, el dios del vino en la mitología griega.

Pero no es el diseño que hace que la copa sea de gran interés para los científicos. Al ver la copa en alumbrado normal, el cristal es verde jade. Pero cuando la copa se ilumina por detrás, el cristal cambia a un color rojo rubí brillante. Las nanopartículas de oro y plata dispersas en todo el material de vidrio le otorgan a la copa esas propiedades de cambio de color. Se encuentran en una relación de 7:3 y poseen un diámetro aproximado de 70 nm [2] [3].



Figura 2. Cáliz de Licurgo, color verde si la fuente de luz proviene desde afuera de la copa (luz reflejada), y, rojo si la fuente de luz viene desde adentro (luz transmitida). (Imagen modificada de Lee et al 2005 [2])

Asimismo, el uso de oro coloidal tiene una larga historia, aunque recién a mediados del siglo XIX se publicó por primera vez un estudio exhaustivo sobre su preparación y sus propiedades. El color inusual del oro coloidal llamó la atención de muchos investigadores. En 1857 Michael Faraday logró un novedoso método de síntesis de oro coloidal. Sintetizó una solución de color rojo oscuro por reducción de una solución acuosa de ácido cloroáurico usando fósforo en CS_2 , y observó que la estabilidad de la solución coloidal contra la agregación se conseguía utilizando un agente estabilizante. También pudo ver que los cambios de color reversibles logrados por compresión mecánica (azul-violeta al verde) de los films delgados preparados con oro coloidal. [4]

Cabe señalar que Faraday no tenía un marco teórico cuántico, pero basó su postulado en la comprensión intuitiva de los metales altamente reflectivos y los procesos de dispersión. [5]

En los últimos años fue investigado otro material antiguo como el acero de Damasco. Este es una especie de aleación que tenía al mismo tiempo las cualidades de dureza y flexibilidad, una combinación que lo convertían en un material especial para la construcción de buenas espadas. Las espadas originales de acero de Damasco se elaboraron en las vecindades de Damasco, Siria, en el periodo que va desde el año 900 hasta 1750. Se cuenta que las primeras espadas fueron encontradas por los europeos durante las Cruzadas, en este momento se ganaron su reputación de poder cortar un pedazo de seda en el aire, y de poder cortar una roca sin llegar a perder su filo. Muchos científicos han tratado de descubrir a qué se deben estas propiedades especiales y han encontrado que el acero de esta espada contiene nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTs) y nanovarillas.[6][7]

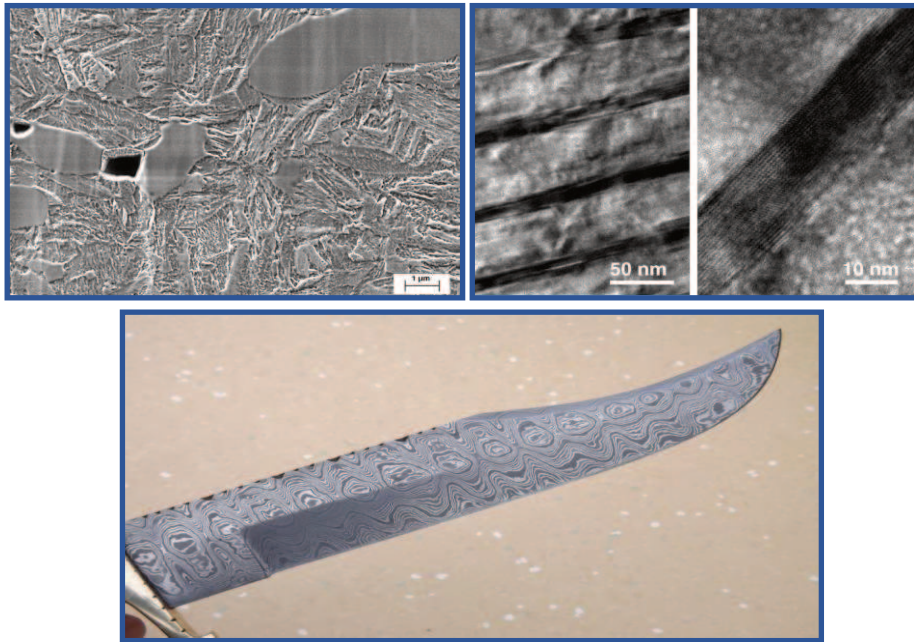


Figura 3. Cuchillo de acero de Damasco. Arriba imágenes de microscopía electrónica del material a escala micro, y a la derecha nanotubos encontrados a una menor escala. (Imagen modificada de Reibold y col 2006 [6])

Ejemplos como éstos se encuentran cada vez más, gracias al gran avance en la obtención de imágenes, la ingeniería y la manipulación de sistemas en escala nanométrica. Se ha logrado combinar la capacidad de ver y manipular la materia en esta dimensión con la capacidad de comprensión de las interacciones a escalas atómicas resultando en un mundo totalmente nuevo a explorar.

1.2 Nuevos materiales

Los objetos que pertenecen al nano mundo tienen dimensiones que van desde el nanómetro hasta centenares de nanómetros. El mundo atómico (el del *angstrom*; una décima de nanómetro) lo bordea por debajo y el micro mundo (el de la *micra*; mil nanómetros) lo limita por encima. El *nanómetro*, nm, tiene una dimensión de 10^{-9} m. Dicho de otra manera, equivale a una millonésima de milímetro; la relación que hay entre un kilómetro y un milímetro es la misma que existe entre un milímetro y un nanómetro (figura 4). Una molécula de agua tiene el tamaño de 1 nm, más o menos. [8]

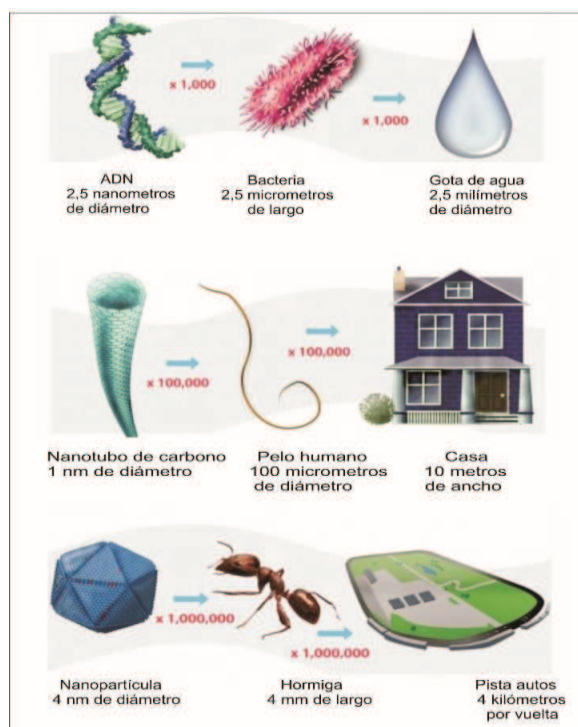


Figura 4. Relación de tamaños

(Imagen modificada de <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/nano-size>)

Los nanomateriales son una nueva clase de materiales que están caracterizados por poseer al menos una dimensión en el intervalo de los nanómetros.

De acuerdo con el número de dimensiones que se encuentren en la escala nanométrica, los nanomateriales se pueden clasificar en cuatro tipos:

1) Dimensión cero: en este caso las tres dimensiones se ubican en el régimen nanométrico, por ejemplo, las nanopartículas.

2) Una dimensión: son aquellos que, teniendo una longitud variable, conservan una sola dimensión en el régimen de los nanómetros, como en el caso de los nanotubos y nanoalambres.

3) Dos dimensiones: con áreas de tamaño definido, mantienen su espesor en el orden de 1 a 100 nm, por ejemplo, las películas delgadas.

4) De tres dimensiones, aquellos materiales macro o microscópicos que contienen en su estructura unidades nanométricas [9]

Análogamente existen tres categorías generales de materiales inorgánicos nanométricos:

1) aquellos con electrones deslocalizados, como lo son los metales o conductores;

2) materiales con electrones localizados o aislantes;

3) los que cuentan con nuevas estructuras y/o propiedades debido a su nanoestructura, generalmente definidas atómicamente o por nuevas formas de materia, como los fullerenos o nanotubos de carbono.

Así es como los nanomateriales pueden tratarse de materiales metálicos, semiconductores, polímeros, arcillas, etc. o una combinación de éstos.

1.3 Nanopartículas metálicas

Las nanopartículas metálicas (Nps) se pueden definir como agregados aislados de átomos rodeados de alguna capa protectora que evita la aglomeración, y su tamaño está entre 1 y 100 nm.

Su pequeño tamaño trae aparejado que estén compuestos por un número muy pequeño de átomos (o moléculas) con estados electrónicos distintos a los macro materiales, y, al mismo tiempo, posean una gran proporción de átomos (o moléculas) superficiales, lo que les confiere una elevada actividad superficialⁱ. Estas partículas adquieren propiedades catalíticas, ópticas, electrónicas, magnéticas y bactericidas especiales que han despertado un gran interés por su gran utilidad tecnológica, siendo de especial atención los materiales que contienen nanopartículas de metales nobles como el oro, plata, platino y paladio, principalmente.

Las nanopartículas son muy difíciles de obtener mediante un proceso de ruptura física a partir del sólido (técnicas de *top-down*), por lo cual se suelen preparar mediante un procedimiento de *bottom-up*, que implica la reducción química de los respectivos cationes metálicos en solución. [9]

Dentro de los métodos para la preparación de nanopartículas o nanogrupos de metales de transición se encuentran: reducción química de una sal metálica, descomposición térmica, fotoquímica o sonoquímica, reducción del ligando y desplazamiento del ligando en compuestos organometálicos; deposición del metal en fase de vapor, y síntesis electroquímica.

Uno de los métodos más comunes para la preparación de las nanopartículas, es la reducción química de sales de metales de transición en presencia de agentes estabilizadores. El mecanismo de formación de nanopartículas se basa primordialmente, en la reducción de la sal metálica al átomo cero valente y seguidamente, estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a la formación de clusters cuyo crecimiento continuará a medida que se sigan agregando los átomos, formándose así, partículas de mayor tamaño y formas poliédricas más complejas. No obstante, es necesario estabilizar las partículas mediante la envoltura de moléculas o “agentes” estabilizadores (polímeros generalmente) que se adsorben en su superficie, inhibiendo de esta manera el proceso de aglomeración o sinterización. (figura 5).

La principal ventaja del método de reducción química es su reproducibilidad y la posibilidad de obtener coloides mono dispersos con una distribución estrecha en el tamaño de las partículas, razón por la cual, son frecuentemente preparadas nanopartículas metálicas siguiendo esta metodología, empleando como agentes reductores especies químicas tales como: ácidos orgánicos, alcoholes, polioles, aldehídos y azúcares.

Las nanopartículas metálicas se pueden considerar como un estado intermedio entre un simple átomo y un material compacto. Los materiales mesoscópicos (materiales macroscópicos miniaturizados) difieren en algunos aspectos de los materiales macroscópicos, siendo una característica importante de los mismos el hecho de que sus niveles electrónicos son discretos, lo que da lugar a efectos cuánticos.

Entre estos efectos está el de los plasmones, nombre que reciben las oscilaciones colectivas de los electrones libres existentes en metales, las cuales llevan asociadas energías discretas de manera tal que las transiciones electrónicas entre las mismas dan lugar a la extinción (absorción + difusión) de una parte de la luz incidente, dando lugar a un efecto de coloración en estos sistemas.

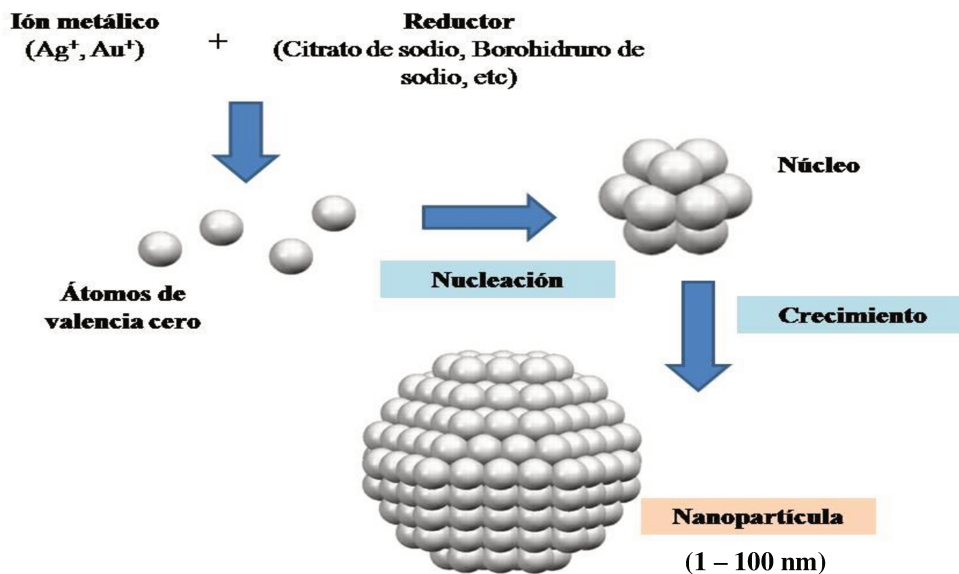


Figura 5. Preparación de nanopartículas metálicas por el método *bottom-up*.

Cuando las partículas metálicas son de pequeño tamaño, en relación con la longitud de onda, la absorción predomina sobre la difusión, pero para partículas grandes la difusión determina en gran medida el color de la suspensión. La energía de los plasmones depende de la naturaleza del metal, así como de la morfología y tamaño de las partículas implicadas.

Quizás la observación más interesante es que las partículas de metal a menudo presentan fuertes bandas de absorción en el espectro visible que corresponden a la resonancia del plasmón superficial (SPR), y por lo tanto presentan colores intensos similares a ciertos colorantes orgánicos.

La diferencia radica en que, mientras que los espectros de absorción de las moléculas (y partículas semiconductoras) pueden entenderse en términos de la mecánica cuántica, las bandas de SPR de las Nps metálicas suelen ser justificadas en términos de la teoría clásica de electrones libres y los modelos de límites electrostáticos simples para polarizabilidad de partículas. [10, 11]

Las nanopartículas de oro coloidal son las responsables de un color rojo brillante en los vitrales, mientras que las partículas de plata son de un color amarillo característico. Hay un creciente interés en caracterizar las propiedades ópticas de nanopartículas metálicas producidas por métodos que no producen agregación de partículas y tamaños definidos, como la litografía.

Además, las técnicas químicas clásicas se han optimizado para producir nanopartículas de diversas formas no esféricas, principalmente varillas. Los tamaños y formas de estas partículas son mejor caracterizados usando técnicas de microscopía electrónica, pero las propiedades ópticas implican factores difíciles de entender, incluyendo la presencia de un soporte, solvente y partículas agregadas o lo suficientemente cerca unas de otras que su interacción electromagnética produce un cambio en el espectro.

Las principales propiedades ópticas de interés son la extinción, absorción y *scattering*, sin embargo, hay otras propiedades espectroscópicas interesantes como la espectroscopía Raman (SERS), y mediciones de *scattering* no lineal como *hyperRayleigh*, *hyperRaman* y SHG. Todas estas técnicas son

sensibles a los campos electromagnéticos sobre o cerca de la superficie de las partículas, mientras que la extinción, al menos para pequeñas partículas, es sensible al volumen total de la partícula. [11, 12]

1.4 Resonancias de Plasmón para partículas esféricas

Cuando una partícula metálica esférica de pequeño tamaño es irradiada con luz, el campo eléctrico oscilante provoca la conducción de electrones a una oscilación en forma coherente, esquematizado en la figura 6.

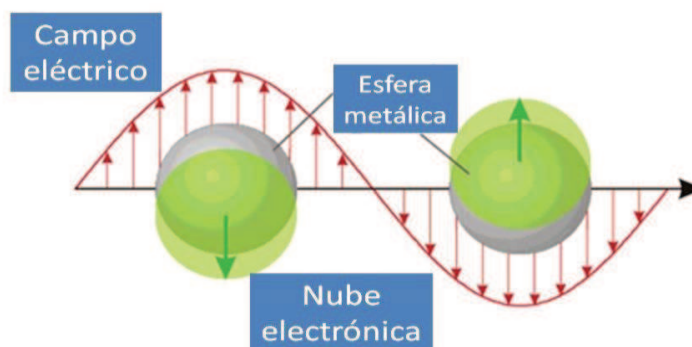


Figura 6. Interacción de las nanopartículas con la luz

Cuando la nube electrónica se desplaza relativamente del núcleo, surge una fuerza de restauración desde las fuerzas de atracción de Coulomb entre los electrones y el núcleo, que resulta en una oscilación de la nube electrónica relativa a la estructura del núcleo.

La frecuencia de oscilación depende de 4 factores: la densidad electrónica, la masa electrónica efectiva y la forma y tamaño de la distribución de carga. La oscilación colectiva de los electrones es llamada resonancia del dipolo del plasmón, también conocida como resonancia plasmónica del dipolo de la partícula, para distinguirla de la excitación plasmónica que puede ocurrir en superficies metálicas de mayores tamaños.

Para un metal como la plata, la frecuencia del plasmón también está influenciada por otros electrones como los que están en los orbitales d, y esto dificulta el cálculo de plasmón usando la estructura electrónica. Sin embargo, se puede relacionar la frecuencia del plasmón con la constante dieléctrica del metal, propiedad que puede ser medida en función de la longitud de onda de un metal de mayor tamaño.

Para poder relacionar la frecuencia plasmónica del dipolo de una nanopartícula metálica con la constante dieléctrica, se considera la interacción de la luz con una partícula esférica mucho más chica que la longitud de onda de la luz. En esas circunstancias, el campo eléctrico de la luz puede ser considerado constante, y la interacción está gobernada por los fenómenos electrostáticos más que los electrodinámicos. Esto a menudo se denomina aproximación cuasi-estática, ya que usamos la constante dieléctrica dependiente de la longitud de onda de la partícula metálica, y el medio circundante en lo que de otro modo sería una teoría electrostática. [12] De esta manera metales como la plata o el oro, pueden ser caracterizados midiéndolos por espectrofotometría, dando como resultado un pico característico de

resonancia plasmónica. En el caso de la plata, ese pico aparece a una longitud de onda de 420 nm, como se observa en la figura 7.

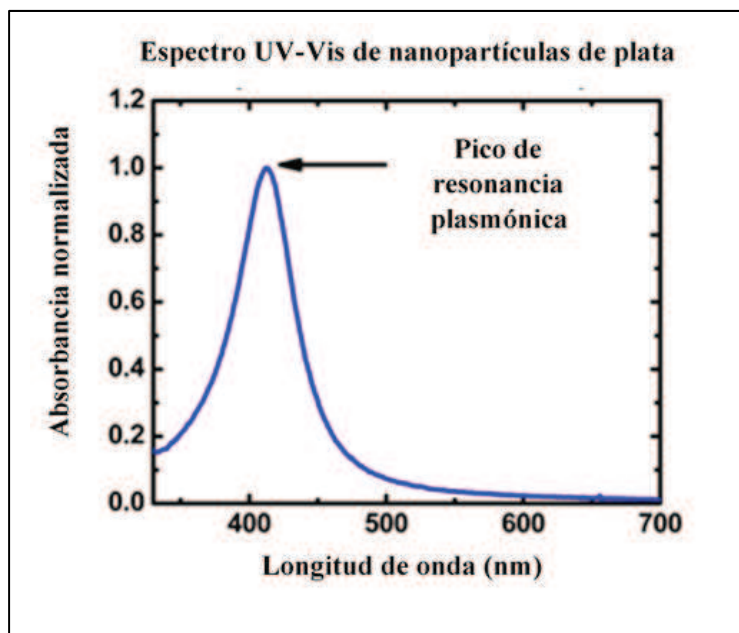


Figura 7. Espectro UV-Vis de nanopartículas de plata, pico característico a 420 nm

Las propiedades eléctricas de las nanopartículas metálicas también son similares a las de los correspondientes metales macroscópicos. La carga superficial y el proceso de transporte de electrones en las nanopartículas metálicas individuales y en los arreglos de nanopartículas en dos dimensiones pueden ser entendidas con expresiones de transferencia de carga clásicas relativamente simples.

Asimismo, la química de la superficie de las nanopartículas metálicas es similar a la de la superficie del metal macroscópico, siendo muy sencilla su modificación química (por ejemplo, por el auto-ensamblado en monocapas), permitiendo que puedan ser solubilizadas en una gran variedad de medios o adquieran afinidades específicas para ciertas especies o analitos en solución.

Las propiedades físicas y químicas únicas de los materiales nanoestructurados ofrecen excelentes perspectivas dentro del área de desarrollo de interfaces a nivel de reconocimiento biológico con transducción de señales electrónicas y para el diseño de una nueva generación de dispositivos de bioelectrónica. Especialmente, las nanopartículas de oro (NpAu) presentan excelente biocompatibilidad y poseen propiedades estructurales, electrónicas, magnéticas, ópticas y catalíticas únicas que las convierten en un material muy atractivo para desarrollar biosensores, quimiosensores y electrocatalizadores. [12]

1.5 Métodos de caracterización de nanopartículas.

Las características únicas que poseen las nanopartículas determinan el potencial y la aplicación de estas. La caracterización se lleva a cabo usando diferentes técnicas, principalmente de la ciencia de materiales. Entre las técnicas más comunes está la microscopía de electrones (TEM, SEM), fuerza atómica de microscopía (AFM), dispersión de luz dinámica (DLS), espectroscopia de fotoelectrones de rayos x (XPS), espectroscopia visible ultravioleta, entre otras. La caracterización básica de los nanomateriales comprende la medición de su tamaño y forma, como también un estudio de composición.

1.5.1 Microscopía electrónica

Para poder superar el límite de resolución de un microscopio óptico es necesario diseñar instrumentos que utilicen otras radiaciones diferentes a la luz visible para formar la imagen. En la década de 1920 diversos descubrimientos comprobaron que un haz de electrones acelerados en el vacío, además de recorrer trayectorias rectas, se comportaba también como una onda similar a la luz visible caracterizada por una longitud de onda 100.000 veces más pequeña. Más aún, se encontró que el comportamiento de los electrones frente a campos eléctricos y magnéticos era similar al de la luz visible en espejos y lentes. Precisamente, un haz de electrones acelerados por un alto potencial eléctrico (25.000 Voltios) constituye la fuente de radiación de un microscopio electrónico de barrido (SEM por *Scanning Electron Microscope*). La interacción del haz de electrones con la muestra tiene como consecuencia el desprendimiento de distintos tipos de partículas (esquematisadas en la figura 8), que son aprovechadas en las distintas técnicas de caracterización de materiales.

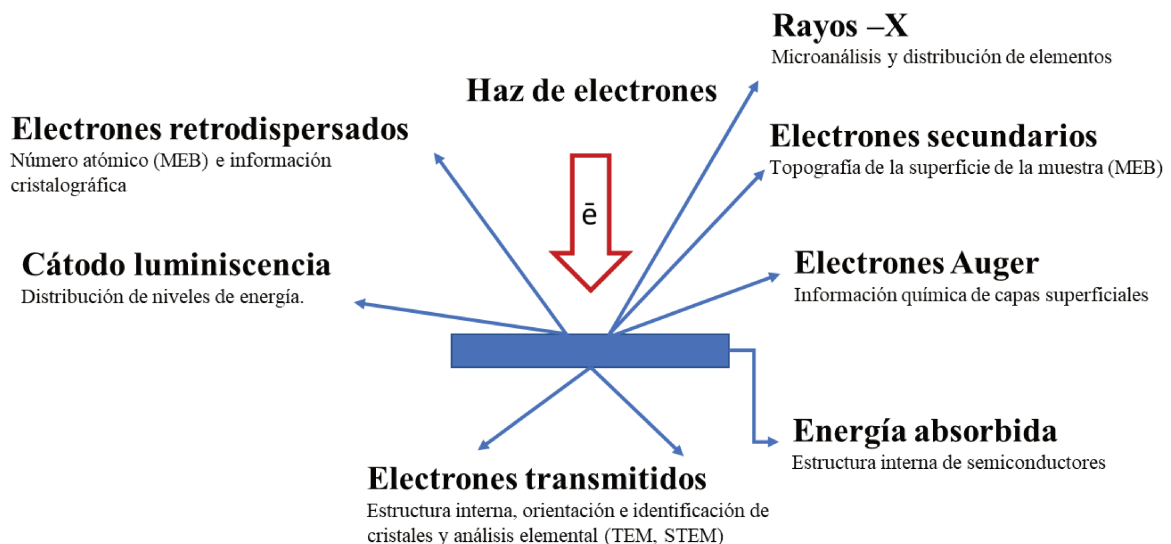


Figura 8. La interacción del haz de electrones con la muestra produce una serie de señales de diferente energía y naturaleza.

1.5.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB o SEM)

Es un microscopio que utiliza un cañón electrónico para disparar un haz de electrones, estos son acelerados por una diferencia de potencial de 0.2KV a 30 KV. El cañón de electrones se localiza en la parte superior de una columna que tiene forma cilíndrica. El MEB utiliza un haz de electrones, cuya emisión se produce por calentamiento de un filamento de tungsteno. Los electrones son acelerados por una diferencia de potencial aplicada entre el cátodo y el ánodo y concentrados por el cilindro de Wehnelt. Este haz de electrones se utiliza para visualizar un objeto. Estos electrones exploran la superficie de la muestra la que usualmente se recubre con una película metálica delgada de carbón o una película delgada de un metal como el oro, para darle propiedades conductoras a la muestra y así poder visualizarla. La muestra debe ser conductora ya que, de no ser así, se carga durante la irradiación por una acumulación de carga que desvía el haz electrónico y, como consecuencia de ello aparecen distorsiones en la imagen. Esta es la razón de recubrir la muestra con una película conductora, de espesor comprendido entre 10 y 25 nm. Posteriormente la superficie de la muestra es barrida (escaneada) con los electrones acelerados que viajan a través el cilindro de Wehnelt. El haz de electrones es enfocado (dependiendo de que tanto se quiere amplificar la superficie de la muestra) por las lentes condensadora y objetiva, cuya función es reducir la corriente del filamento, de manera que incida en la muestra un haz de electrones lo más delgado posible (para así tener una mejor resolución). Las bobinas deflectoras se barre este fino haz de electrones para excitar a los electrones de la superficie de la muestra, punto por punto y línea por línea y los electrones desprendidos llamados secundarios se recolectan en un sensor (transductor), detector tipo centelleador fotomultiplicador con resolución de 4 nm (para un JEOL JSM-840). La señal eléctrica de este sensor se despliega sobre una pantalla de computadora. Esto forma una imagen de la morfología de la muestra. Una contribución importante del MEB es su gran profundidad de campo, la cual resulta en una imagen que da la impresión de ser en tres dimensiones. La imagen se produce sobre toda el área donde los electrones enfocados barren la superficie de la muestra, a diferencia del MET donde la imagen corresponde sólo a los electrones transmitidos. Este microscopio funciona con un sistema de vacío para permitir el viaje del haz de electrones. Su resolución típica está actualmente entre 1 y 20 nm dependiendo del microscopio.[13, 14]

1.5.3 Microscopía electrónica de transmisión (MET o TEM)

Al igual que el MEB, este microscopio también utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto. La diferencia es que tiene una mayor resolución que el MEB. Su resolución típica está actualmente en 0,23 nm entre puntos y 0,14 nm entre líneas. Lo que caracteriza a este microscopio es el uso de una muestra ultradelgada de tejido o material para que una densidad alta de electrones pase a través de ella (otros serán reflejados, desviados o absorbidos). La muestra por observar produce una imagen que se forma en dos dimensiones sobre una pantalla sensible (fosforescente) colocada del otro lado de la muestra. El brillo en un área particular de la imagen es proporcional al número de electrones difractados que son transmitidos a través del material. El patrón de difracción resultante es observado en forma digital. Las muestras son observadas en dos dimensiones. Este microscopio al igual que el MEB también funciona con un sistema de vacío para permitir el viaje del haz de electrones de que es acelerado por una diferencia de potencial de 100 kV a 1 MV.

El microscopio electrónico de transmisión utiliza un fino haz de electrones acelerados a gran velocidad como fuente de iluminación. Dichos electrones atraviesan una muestra delgada, produciéndose

la dispersión de estos en diferentes trayectorias características de la ultraestructura del material observado. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz, electrones secundarios y Auger, rayos X, etc. El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra. En un MET se observa la difracción de electrones en sólidos donde los electrones pasan a través de una película ultradelgada del material que se va a analizar. En el MET se generan los electrones que se transmiten a través de la muestra y son difractados sin dispersión y dispersados elástica e inelásticamente.

En el MET el patrón de difracción de los electrones transmitidos se utiliza para crear imágenes de transmisión convencionales, de campo oscuro y alta resolución, revelando la estructura interna de las muestras, tamaño y distribución de partículas, su red cristalina, interfases y defectos puntuales de la red atómica, etc. Es fundamental que las muestras que vayan a ser observadas en MET sean lo más delgadas posible, por debajo de 100 nm de grosor. Además, las muestras deben tener aproximadamente 3mm de diámetro o ir soportadas sobre una rejilla de dichas dimensiones. Para el corte de determinadas muestras se utiliza un ultra micrótopo. La imagen de alta resolución formada es aumentada y proyectada sobre una pantalla fluorescente para su visualización en tiempo real, pudiendo registrarse digitalmente o en negativos para su estudio posterior. [15]

Los equipos de microscopía electrónica de MEB y MET son muy similares en su constitución. En ambos casos poseen un cuerpo cilíndrico donde se encuentran la fuente de electrones y la parte óptica, como se puede observar en la figura 9 (A y B) y en la figura 11, donde se muestra la constitución interna de los microscopios.

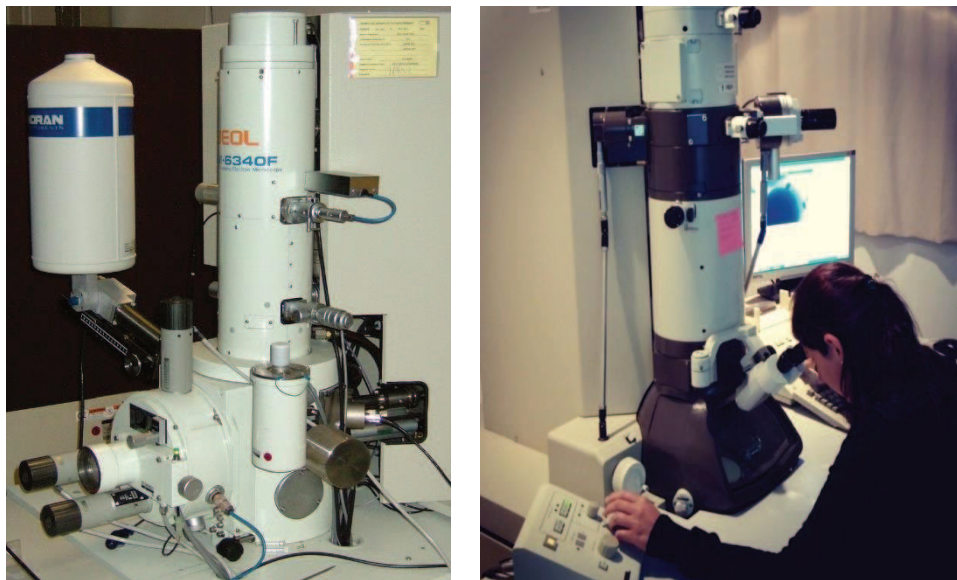


Figura 9. A) Microscopio electrónico de barrido (MEB), B) Microscopio electrónico de transmisión (MET).

En la figura 9 se muestran fotografías de microscopios electrónicos y en la figura 10 se representa un esquema comparativo de las distintas técnicas de microscopía óptica y electrónicas.

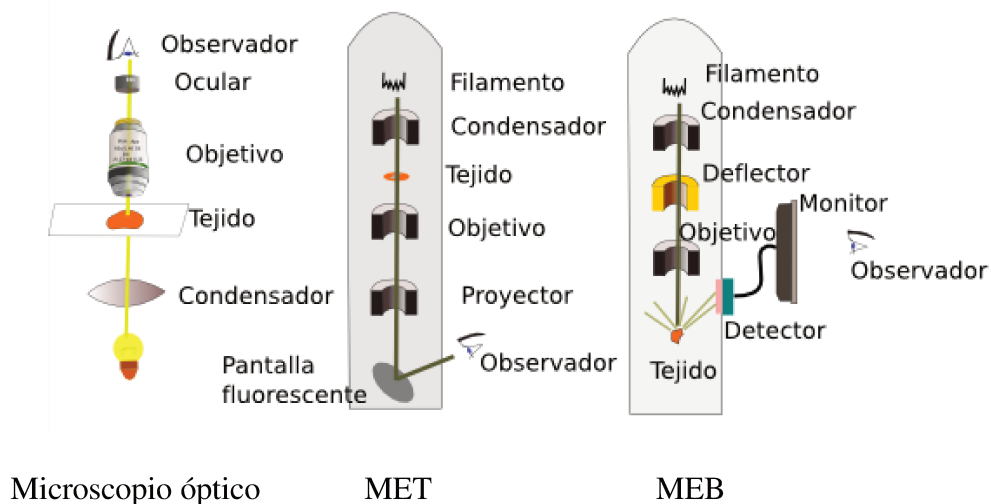


Figura 10. Comparación entre microscopías óptica y electrónica
(Figura modificada de <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/6-electronico.php>)

1.5.4 Espectroscopía dispersiva de rayos X (S o EDX)

La espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS, también abreviada EDX o XEDS) es una técnica analítica que permite la caracterización química y análisis elemental de materiales. Una muestra excitada por una fuente de energía (como el haz de electrones de un microscopio electrónico) disipa parte de la energía absorbida expulsando un electrón de núcleo. Un electrón de capa exterior de mayor energía continúa ocupando su posición, liberando la diferencia de energía como un rayo X que tiene un espectro característico basado en su átomo de origen. Esto permite el análisis de composición de un volumen de muestra específico excitado por la fuente de energía. La posición de los picos en el espectro identifica el elemento, mientras que la intensidad de la señal corresponde a la concentración del elemento. Como se ha indicado anteriormente, un haz de electrones proporciona suficiente energía para expulsar los electrones de núcleo y causar la emisión de rayos X.

La información de composición, hasta un nivel atómico, se puede obtener con la adición de un detector EDS a un microscopio electrónico. Es un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer), que se encuentra integrado en el microscopio MEB. Es un detector tipo UHV (Ultra High Vacuum) Dewar Si(Li) de Bruker para microanálisis. A medida que se explora la sonda de electrones en la muestra, se emiten y miden rayos X característicos. Cada espectro EDS registrado se asigna a una posición específica en la muestra. La calidad de los resultados depende de la intensidad de la señal y de la limpieza del espectro.

El detector se encuentra localizado aproximadamente a 5 mm de distancia de esta ventana, como se observa en la siguiente figura:

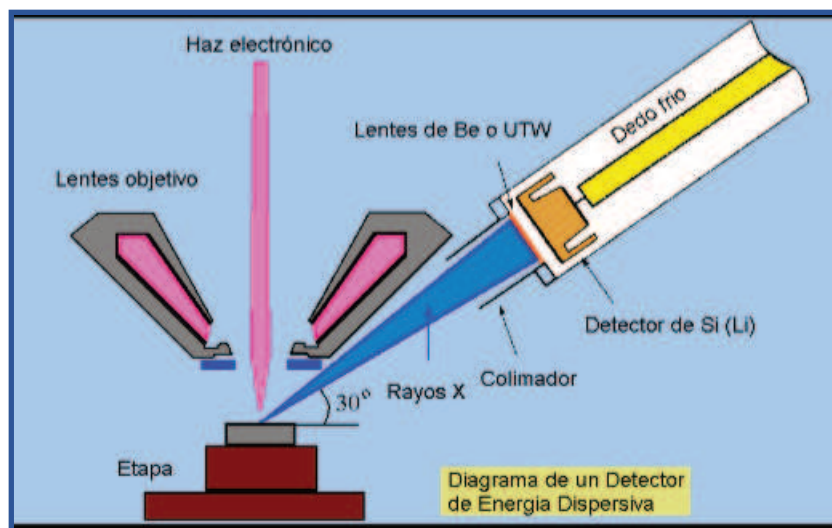


Figura 11. Detector de rayos X característicos para el EDS acoplado a MEB. (Imagen modificada de <https://docplayer.es/91634580-Instituto-politecnico-nacional.html>)

Los electrones incidentes excitan los átomos de la muestra y los electrones de las capas más internas saltan de una capa con menor energía a una capa con mayor energía y al desexcitarse provocan la emisión de rayos X cuya longitud de onda (λ) es característica de los elementos presentes en la muestra y cuya intensidad para una determinada longitud de onda es proporcional a la concentración relativa del elemento en esa (λ), esquematizado en la figura 12.

En muestras planas y bien pulidas se hace un análisis cuantitativo en pequeñas áreas (1mm^2) para comparar la intensidad de los rayos X a cualquier (λ) con la producida en una muestra estándar (patrón) de composición conocida. La precisión de un análisis cuantitativo normalmente es mayor que $\pm 2\%$ y los límites de detección están alrededor de las 100 ppm.

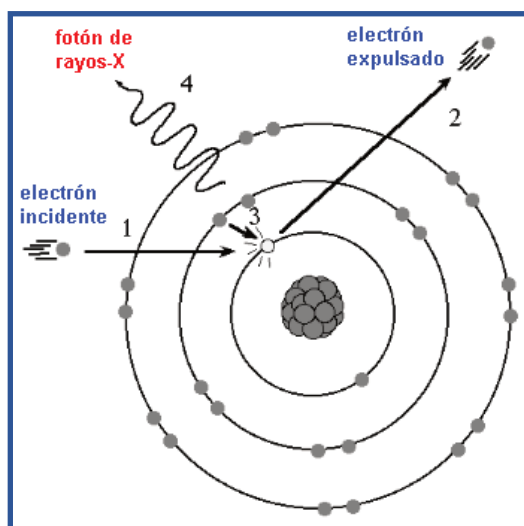


Figura 12. Excitación del átomo y emisión de rayos X característicos

1.6 Mecanismos de acción de las nanopartículas de plata contra microorganismos

La plata es uno de los agentes antimicrobianos más universales. Ya hace más de un siglo que la plata es empleada en medicina, por ejemplo, en la terapia de quemaduras severas para evitar infecciones y colonizaciones por hongos en tejidos dañados, lo cual por un lado indica su eficacia, pero también, por llevar tanto tiempo usándose en medicina, su inocuidad respecto de tejidos multicelulares como dermis y músculos. La combinación de un amplio espectro antibacteriano con la baja toxicidad para los seres humanos resulta esencial para la prevención y el tratamiento de infecciones en heridas expuestas y mucosas.

La nanotecnología, al permitir la significativa expansión de la superficie activa de las partículas individuales potencia el efecto de este material, alcanzando eficiencia bactericida comparable con los iones plata que se han empleado tradicionalmente.

Las nanopartículas de plata presentan buenas características químicas superficiales, gran estabilidad (es uno de los metales nobles), tamaño apropiado para interactuar con bacterias y estabilidad morfológica y dimensional en suspensiones acuosas. Además de su acción sobre bacterias y hongos, también se ha demostrado el efecto antiviral de la plata. En particular se debe destacar que los microorganismos no pueden desarrollar resistencia contra la plata como lo hacen con respecto a los antibióticos convencionales. Debido a que los cationes de la plata atacan simultáneamente diversos flancos, los microorganismos deberían desarrollar una serie de mutaciones simultáneas y concurrentes para sobrevivir. Por esta razón se ha empleado la plata como componente antibacteriano en diversos compuestos y elementos como resinas para uso dental, zeolitas sintéticas y recubrimientos para dispositivos médicos. El efecto antimicrobiano de la plata probablemente sea la suma de distintos mecanismos de acción. Un gran número de estudios sugieren que los iones de la plata reaccionan con los grupos SH de las proteínas y juegan un rol esencial en la inactivación bacteriana. [17, 18]

Se plantean varias teorías. Las nanopartículas de plata tienen la habilidad de anclarse a la pared celular bacteriana y subsecuentemente, entrar, provocando cambios estructurales en la membrana celular como la permeabilidad de la membrana de la célula y la muerte celular. En la superficie celular se producen acumulaciones de nanopartículas. La formación de radicales libres por las nanopartículas de plata se puede considerar como otro mecanismo posible por el cual las células mueren. Estos radicales libres tienen la habilidad de dañar la membrana celular y provocarle poros, los cuales pueden permitir la muerte celular. También fue propuesta la liberación de iones de plata desde las nanopartículas. Estos iones pueden interactuar con los grupos tioles de muchas enzimas vitales e inactivarlas. Las células bacterianas en contacto con la plata toman esos iones los cuales inhiben varias funciones celulares y las dañan. Luego hay una generación de especies de oxígeno reactivas, las cuales son producidas posiblemente a través de la inhibición de una enzima respiratoria por parte de los iones de la plata que ataca la célula. La plata es un ácido débil, y tiene una tendencia natural a reaccionar con bases débiles, como sulfuro (S^{2-}) y fósforo (P^{3-}) presentes en la célula que se comportan como bases débiles.

Otro hecho es que el ADN posee grupos fosfatos entre sus componentes mayoritarios; las nanopartículas pueden actuar con estos grupos y destruir el ADN provocando la muerte celular definitiva.

Se ha encontrado también que las nanopartículas pueden modular la señal de traducción en las bacterias. La fosforilación de los sustratos de las proteínas en las bacterias influye sobre la señal de traducción. La desfosforilación se produce sólo en los residuos de la tirosina de las bacterias Gram

negativas. Fue demostrado que las nanopartículas desfosforilan los sustratos de péptidos en los residuos de tirosina, lo cual inhibe la señal de traducción y detiene el crecimiento.

Investigadores de distintos lugares han analizado los mecanismos biológicos mediante los cuales la plata resulta efectiva aún con bacterias patógenicas resistentes a antibióticos convencionales. Por ejemplo, con nanopartículas de plata del orden de 10 nm se ha conseguido una actividad antibacteriana excelente con dosis de 1 ppm sobre *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y con dosis de 10 ppm sobre *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium tuberculosis*. En estos casos se observaron tres tipos de mecanismos biocidas:

1. Plasmólisis: se observó separación del citoplasma de la pared celular en bacterias Gram negativas.
2. Inhibición del crecimiento de la pared celular: observada en *Staphylococcus aureus*.
3. Interferencia con funciones metabólicas: observado en *Mycobacterium tuberculosis*, debido al ingreso de nanopartículas al citoplasma. [17]

El efecto bactericida de nanopartículas de plata metálica sobre *Escherichia coli* también ha sido verificado por otros investigadores. Algunas hipótesis indican que la oxidación catalítica de la nanoplata con oxígeno nascente reacciona con las membranas celulares produciendo la muerte de las bacterias. Este mecanismo se complementa con la quelación causada por la plata oxidada (Ag^+), que impide la replicación del ADN. Otros autores han relacionado el efecto de la plata sobre los microorganismos con la formación de compuestos de plata con las biomoléculas que contienen azufre, oxígeno y nitrógeno, tales como los tioles, los carboxilatos, las amidas, los imidazoles, los indoles y los hidroxilos. [18]

Sin embargo, lo que resulta más gráfico acerca del efecto de las nanopartículas de plata sobre diferentes microorganismos sigue siendo un buen estudio de los cambios morfológicos inducidos sobre las células, como por ejemplo los estudios realizados por Cho y colaboradores, con SEM sobre *Staphylococcus aureus* (células esféricas) y *Escherichia coli* (células con forma de bastón) que se muestran en la figura 13, donde se observan claras deformaciones de las células luego de la exposición a nanopartículas de plata. [17] También se ha estudiado la diferencia de acción entre los iones plata (técnica tradicional de uso, mediante sales solubles) y las nanopartículas metálicas de plata.

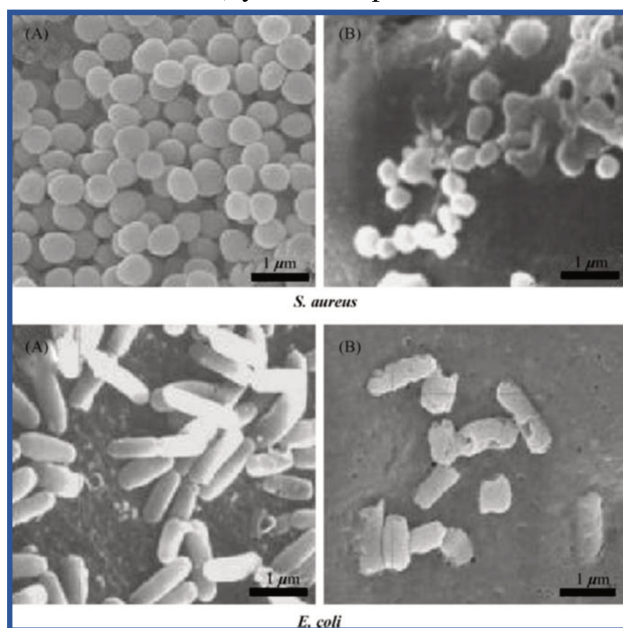


Figura 13. Paredes celulares de *Staphylococcus aureus* cubierta con sustancias derivadas de la ruptura de la membrana (B, superior) y paredes de *Escherichia coli* severamente destruidas (B, inferior). (Figura modificada de Cho y col. 2005 [17]).

1.7 Toxicidad y ecotoxicidad de nanopartículas

Si bien en la naturaleza existen nanopartículas formadas naturalmente a las que el hombre ha estado expuesto desde siempre, con el auge de la fabricación de productos que contienen materiales nanoparticulados, es necesario hacer estudios de toxicidad e impacto ambiental relacionados con la exposición a una mayor concentración de estos y a los residuos provenientes de su fabricación.

La toxicidad de las nanopartículas depende de su origen; muchas parecerían ser no tóxicas y otras tienen efectos positivos sobre la salud humana. Los efectos tóxicos agudos causados por la exposición a las nanopartículas y nanomateriales, en general incluyen la generación de especies reactivas del oxígeno, la desnaturalización de proteínas, alteración mitocondrial y perturbación de las funciones fagocíticas. La captación por el sistema reticuloendotelial, núcleo, tejido neuronal y la generación de nuevos antígenos que producen posibles agrandamientos y disfuncionalidad de los órganos, son los efectos crónicos más comunes de los efectos tóxicos de las nanopartículas. [19]

De acuerdo con datos toxicológicos, la toxicidad de las nanopartículas depende de varios factores:

- Dosis y el tiempo de exposición
- Agregación y concentración
- Tamaño de partícula
- Forma de la partícula
- Área superficial
- Estructura cristalina
- Funcionalización de la superficie
- Exposición previa

Las propiedades de las nanopartículas que representan potenciales riesgos y desafíos se pueden enumerar como las siguientes:

- **Aglomeración o agregación:** los enlaces débiles en una aglomeración o las partículas fusionadas representan un riesgo debido a la baja resistencia a la corrosión, una mayor solubilidad, y favorece un cambio de fase de los nanomateriales.
- **Carga o reactividad:** las nanopartículas pueden estar cargadas tanto por funcionalización como por reacciones espontáneas degradativas. Estas cargas o las especies químicas formadas pueden generar un aumento de la bioactividad.
- **Impurezas:** al ser tan reactivas, las nanopartículas interactúan con las impurezas generando especies químicas que pueden ser peligrosas. Para evitar esto, se acude a la encapsulación de las nanopartículas, protegiéndolas y estabilizándolas.
- **Disociación de contaminantes:** la contaminación por impurezas residuales de la síntesis de las nanopartículas es un factor de riesgo importante. Por ejemplo, durante la síntesis de nanopartículas de hierro (dependiendo cuál sea su precursor), quedan impurezas de sulfuros, generando una contaminación.
- **Tamaño:** la reactividad y la aglomeración de las nanopartículas dependen mayormente de su tamaño. Es bien sabido que el proceso de aglomeración ocurre a velocidades lentas cuando el tamaño de la partícula es chico. Nuevamente, esto se puede evitar encapsulando las nanopartículas.

- Reciclaje y eliminación: todavía no existen políticas seguras de eliminación de nanopartículas. Los resultados a la exposición de las nanopartículas no están disponibles aún y su potencial riesgo está todavía bajo cuestionamiento. Se requiere un desarrollo de normas para el reciclaje y eliminación de los nanomateriales. [19]

Dado que las formas más comunes de la plata son en su forma elemental metálica (estado de oxidación 0, Ag⁰) y su catión monovalente (Ag⁺), la mayor cantidad de datos y estudios están dados para estas dos especies. Algunos estudios ambientales y en humanos demostraron que los compuestos que liberan los cationes plata Ag⁺ son más tóxicos que otros. Esto se podría deber a la diferencia en la velocidad de liberación de los cationes, según la matriz donde se encuentren. De esta forma los efectos tóxicos de las sustancias con plata serían proporcionales a esta velocidad de liberación y de la disponibilidad de los cationes Ag⁺.

La ingestión es la ruta primaria de entrada de compuestos de plata. Se estima que con la dieta se incorporan entre 70 y 90 µg / día. La inhalación de compuestos de plata ocurre principalmente en ambientes laborales, por ejemplo, en la manufactura de compuestos de plata, joyería, etc. Por piel también ocurre contacto en ambientes laborales y con la utilización de cremas tópicas para quemaduras. Los efectos en la salud están asociados a exposiciones crónicas y se tratan de la argiria (decoloración de la piel) y argiriosis. Los síntomas crónicos de ingesta prolongada de bajas dosis de sales de plata son una degeneración grasa en el hígado y riñones y cambios en las células de la sangre. Los compuestos solubles de la plata son capaces de acumularse en cerebro y músculo luego de una larga exposición.

Ya que la plata no parece ser tóxica para el sistema inmune, nervioso y cardiovascular o sistema reproductivo, y además no es considerado cancerígeno; excepto por la argiria y argiriosis, la plata podría ser considerada relativamente no tóxica. [17]

La EPA determinó que la plata y varias de sus sales (cloruro, sulfato, nitrato y acetato) deberían ser revisadas como un grupo. Las zeolitas de plata forman parte de otro grupo y no está incluido con la plata y sus sales.

Basado en la información disponible en la literatura de estudios que involucran humanos y animales, aparentemente los humanos y los animales de experimentación no reaccionan de la misma manera a dosis elevadas de iones plata.

Las concentraciones de plata en el agua son mínimas, estando comprendidas entre 1 y 10 µg/L, excepto en aguas residuales procedentes de laboratorios fotográficos (del orden de 30 g/L) pero actualmente en la era digital, esto se redujo considerablemente. Las sales de Ag, debido a su acción bacteriostática, se pueden usar en potabilización de aguas, como relleno de filtros domésticos. En este sentido, en algunas ocasiones, el agua tratada de esta forma puede presentar hasta 50 µg/L de Ag. [20]

Los avances en materiales nanoestructurados han facilitado varias aplicaciones de nanopartículas, con respecto a la plata en aplicaciones tópicas principalmente. La penetración cutánea de las nanopartículas es un factor crucial para diseñar agentes antibacterianos tópicos adecuados con baja toxicidad sistémica. Los informes disponibles se centran en la penetración cutánea de estas en función del tamaño, principalmente a través de vías foliculares.

Tak y sus colaboradores [21], han realizado estudios de la interacción de nanopartículas de plata de tres formas diferentes (esféricas, triangulares y varillas), con la piel, midiendo variaciones de la permeabilidad de esta, coeficientes de difusión, tasas de penetración y profundidad de penetración, en estudios realizados tanto *in vitro* como *in vivo*. Diferentes formas de nanopartículas de plata pueden exhibir diversas actividades antimicrobianas y capacidades de penetración cutánea. La consideración de la dependencia de la forma de las nanopartículas en las formulaciones antimicrobianas podría ayudar a

desarrollar un agente tópico ideal con la mayor eficacia y baja toxicidad sistémica. Ellos demostraron una mayor capacidad de penetración de las partículas en forma de varilla, y una mayor acumulación en la capa dérmica, sugiriendo la posibilidad de toxicidad sistémica y efectos secundarios cosméticos no deseados, como la argiria por la acumulación de iones de plata en el cuerpo. Las capacidades de penetración lenta de las partículas triangulares, en comparación con las varillas o esféricas, podría deberse a la presencia del plano basal superior. A su vez se demostró el mayor grado de actividad bactericida de las nanopartículas triangulares de plata contra Gram negativos, como *Escherichia coli*. Teniendo en cuenta la capacidad de penetración lenta, las nanopartículas triangulares podrían ser un candidato ideal para aplicaciones tópicas. Debido a su lenta capacidad de penetración, pueden reducir toxicidad sistémica y aumentar la eficacia antibacteriana a niveles de dosis más bajos. [21]

El uso intensivo de las nanopartículas de plata, así como de otros compuestos de la plata, pueden llegar a provocar alteraciones irreversibles en el ambiente. La mayor parte de la plata que accede al medio ambiente se incorpora a los ecosistemas terrestres, donde se inmoviliza por precipitación en sales insolubles y por complejación o adsorción sobre materia orgánica, arcillas y óxidos de hierro y manganeso, afectando de forma destacada a los terrenos agrícolas. También se ve afectado el medio acuático, en donde un aumento en la salinidad para aguas salobres y marinas provoca la formación de complejos de cloro-plata (AgCl , AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} , AgCl_4^{3-}), lo que permite que algo de plata permanezca en forma disuelta en las aguas [23].

1.8 Aplicaciones de las nanopartículas de plata

La plata ha sido utilizada desde la antigüedad, principalmente para la desinfección del agua. A partir del siglo XVII se describe como producto medicinal con múltiples propósitos y a fines del siglo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en el recién nacido. En la década de 1920 la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprueba soluciones de plata iónica como agentes antibacterianos. Existen indicadores de que las nanopartículas de plata se encuentran presentes desde siempre en la naturaleza y que la producción deliberada de estas se practica desde hace más de 100 años, siendo uno de los nanomateriales más comúnmente utilizados. El primer reporte de obtención de nanopartículas de plata data de 1889, cuando M. C. Lea informa sobre la síntesis de plata coloidal estabilizada con citrato, procedimiento mediante el cual el tamaño promedio de las partículas obtenidas es de 7 a 9 nm. A partir de 1897 se comercializa un producto bajo el nombre de “Collargol”, conteniendo nanoplata en partículas con un tamaño promedio de 10 nm, y utilizándose para aplicaciones terapéuticas en medicina. También se describe ya en 1902, la estabilización de nanoplata utilizando proteínas. En 1953 Moudry patenta un producto con nanopartículas de plata de 2 a 20 nm estabilizadas en gelatina. Las distintas preparaciones son utilizadas desde hace tiempo por sus propiedades bactericidas en el tratamiento de heridas crónicas. En los siglos XVII y XVIII se utilizaba el nitrato de plata en el tratamiento de las úlceras. [25]

Comercialmente existen textiles con plata, principalmente en forma de vendas, para el tratamiento de heridas y quemaduras. En los últimos tiempos también se observó la aplicación de las nanopartículas de plata en la fabricación de textiles técnicos para la producción de barbijos o batas para ser utilizados dentro del ámbito médico o doméstico, como por ejemplo los barbijos Ion Positivo de producción nacional. Dentro de los productos comerciales, podemos encontrar los apósitos de la marca Acticoat. Son apósitos de barrera antimicrobiana para el tratamiento de heridas crónicas o agudas, compuesto por plata nanocristalina con cristales de 15 nanómetros (nm) de tamaño, concentración de 70 a 100 partes por millón

(ppm), efectividad antimicrobiana contra más de 360 patógenos y liberación sostenida de plata hasta por 3 días o 7 días. Estos apósitos están constituidos por capas interiores absorbentes de rayón poliéster y capas externas de polietileno de alta densidad cubiertas con plata.

Si observamos datos de estimaciones basados en información proveniente de industrias a nivel mundial, como se representa en la figura 14, podemos ver que el campo de la aplicación de las nanopartículas de plata en textiles y pinturas representa hasta un 40 %, del total de los productos, seguidos por los correspondientes a electrónica y óptica. [26]

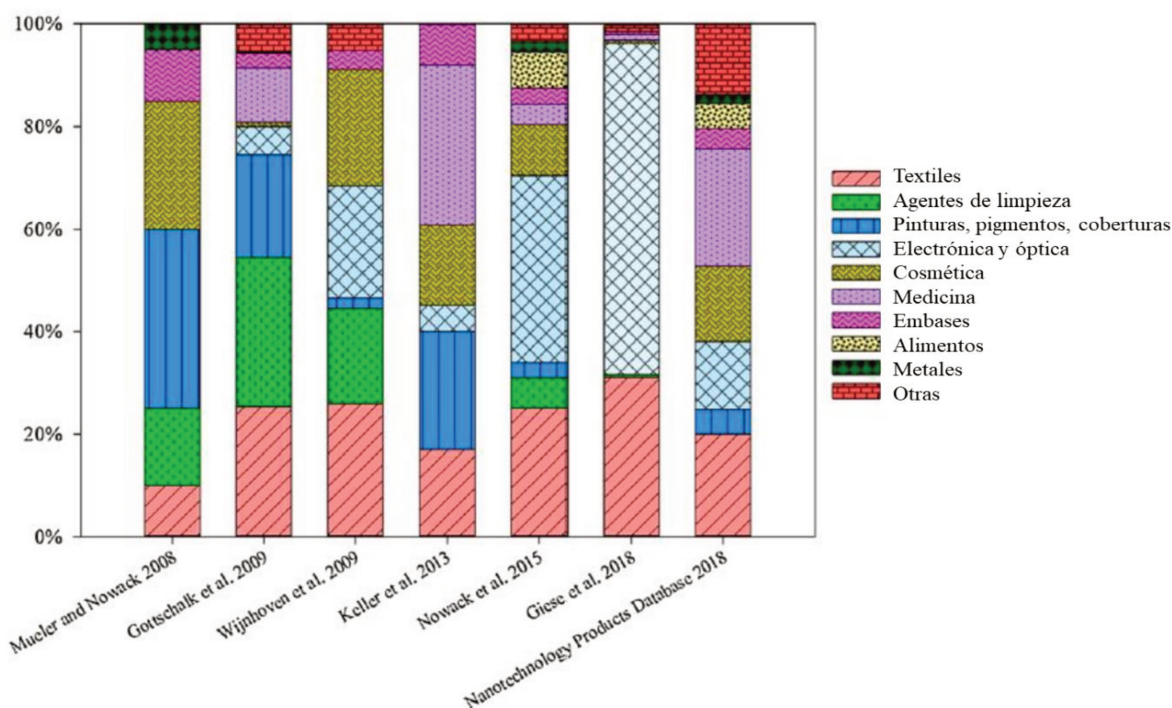


Figura 14. Estimaciones basadas en la industria para productos de consumo habilitados para Ag°NP compiladas a partir de la literatura (Figura modificada de Temizel-Sekeryan y Hicks 2020 [26]).

Está proyectado que la industria global de la nanotecnología continúe creciendo significativamente los próximos años. Las nanopartículas de plata tienen un valor de marketing mayor a las demás nanopartículas y su presencia en diversos productos se puede observar ampliamente. Esta popularidad se puede atribuir a los exhaustivos trabajos documentados de su actividad como antimicrobiano.

Los conceptos, definiciones y terminología en la nanociencia y nanotecnología están cambiando permanentemente en respuesta a las investigaciones y el crecimiento en el área de los últimos años. Diversos factores (económicos, sociales, y ambientales) están promoviendo y contribuyendo a establecer una buena terminología que ayude en la construcción de legislación y regulación de la utilización de estos nuevos materiales.

A pesar de la dificultad de implementar una regulación y legislación apropiada, un gran número de aplicaciones científicas y tecnológicas, así como productos comerciales, están ya incorporando nanopartículas en su diseño.

Particularmente las nanopartículas de plata son uno de los nanomateriales más industrializado, debido a su gran versatilidad de sus propiedades (catalíticas, ópticas, eléctricas, bactericida, entre otras) y, por lo tanto, con la mayor presencia en productos comerciales que los incluyen.

2 OBJETIVOS GENERALES

- Generar nanopartículas de plata mediante síntesis química, caracterizarlas y comprobar su actividad antimicrobiana.
- Preparar soportes textiles antimicrobianos con la incorporación de nanopartículas de plata tanto sintetizadas químicamente, como generadas *in situ*; caracterizarlas y comprobar su actividad antimicrobiana.
- Preparar soportes poliméricos antimicrobianos, como pinturas de base acuosa, incorporando nanopartículas de plata sintetizadas químicamente; caracterizarlas y comprobar su actividad antimicrobiana.

3 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA. APLICACIÓN DIRECTA SOBRE TEXTILES.

3.1 Introducción

3.1.1 Nanopartículas de plata

La plata es uno de los elementos básicos que constituyen nuestro planeta. Es metálico, brillante, más duro que el oro y muy dúctil y maleable. Su símbolo químico es Ag, siendo un elemento de transición y con número atómico 47. La plata pura tiene la más alta conductividad térmica y eléctrica, de todos los metales, y la más baja resistencia al contacto.

En el medio ambiente se libera al aire y el agua a través de procesos naturales de desgaste, como la erosión rocosa o por actividades en donde interviene el hombre, como minería, o fabricación de cemento. La lluvia puede lavar el suelo liberando plata a los cauces de agua.

La plata puede presentarse en sus cuatro estados de oxidación: Ag^0 , Ag^+ , Ag^{2+} , Ag^{3+} . Los más abundantes y predominantes son los dos primeros, mientras que los otros dos son estados muy inestables en un ambiente acuático. En el ambiente la plata se encuentra como el ión monovalente Ag^+ junto con el sulfuro, bicarbonato o sulfato, y en estructuras más complejas con cloruros y sulfatos adsorbidas sobre partículas en una fase líquida. La plata metálica de por sí, es insoluble en agua, pero su sal metálica como el nitrato de plata (AgNO_3), es soluble. En bajas concentraciones en agua existe como AgSH o como un polímero simple HS-Ag-S-Ag-SH . En cambio, en altas concentraciones en agua se encuentra en estado coloidal de sulfuro de plata o complejos de polisulfuro. [27]

Las propiedades médicas de la plata se conocen desde hace más de 2000 años. Ha sido utilizada en muchas aplicaciones antimicrobianas desde el siglo XIX, y en aplicaciones, químicas, físicas y biológicas. La plata metálica fue utilizada en prótesis, como fungicida y la plata soluble en forma de sales ha sido usada para tratar enfermedades mentales, epilepsia y enfermedades infecciosas. La utilización más conocida de la plata en medicina es en combinación con la sulfadiazina, la cual se utiliza en el tratamiento de quemaduras como agente antimicrobiano.

3.1.2 Síntesis química y física de nanopartículas de plata.

Existen dos tipos de métodos para la producción de nanopartículas:

- a) *Top-down*: involucra la disgregación mecánica de materiales grandes y la estabilización de las partículas de metal resultantes mediante la adición de agentes protectores coloidales.
- b) *Bottom-up*: incluye la reducción de metales, métodos electroquímicos y ultrasónicos.

Los métodos más difundidos son los del tipo *Bottom-up*. Uno de los métodos químicos más utilizados es la reducción de sales de metales mediante reductores, como por ejemplo el borohidruro de sodio (NaBH_4) en agua. Mediante este método se obtienen nanopartículas de un rango de entre 3 y 40 nm.

Dentro de los métodos electroquímicos se encuentra la reducción de nitrato de plata (AgNO_3) en solución acuosa en presencia de un estabilizante como el polietilenglicol (PEG). Con este método se pueden obtener nanopartículas de 10 nm de tamaño.

Por otro lado, mediante ultrasonido se producen ondas que inducen la cavitación. La síntesis de nanopartículas de plata mediante ultrasonido involucra una reducción de nitrato de plata en una solución acuosa en una atmósfera de argón-hidrógeno; obteniéndose nanopartículas de aproximadamente 20 nm. El mecanismo de reducción por ultrasonido ocurre por la generación de radicales de hidrógeno durante el proceso de sonicación.

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas también utilizando moldes de espumas acuosas. El método consiste en complejar electrostáticamente iones de plata con un aerosol de un surfactante aniónico en una espuma líquida altamente estable, que luego es reducida por borohidruro de sodio. Así se obtienen nanopartículas entre 5 y 40 nm.

Otro método de síntesis utilizado involucra una radiación de microondas de frecuencia variable como el método de calentamiento conveccional. Se encontró que a altas concentraciones de nitrato de plata la reacción requiere de un tiempo mayor para producirse a una mayor temperatura y generando un mayor tamaño de partículas, mientras que aumentando la concentración de poli (N-vinilpirrolidona) el tamaño de partículas es menor, entre 15 y 25 nm. [32]

Existen también métodos biológicos de síntesis de nanopartículas de plata. En muchos casos la síntesis química produce muchas sustancias tóxicas que terminan siendo absorbidas en la superficie de las nanopartículas las cuales no pueden ser utilizadas en aplicaciones médicas. Hay tres fuentes principales de producción biológica de nanopartículas: bacterias, hongos, y extractos de plantas. Esta metodología se basa en reacciones de óxido-reducción. Son generalmente las enzimas microbiológicas o los compuestos fitoquímicos de las plantas con propiedades antioxidantes o reductoras las que se producen las deseadas nanopartículas. [28]

3.1.3 Síntesis química de nanopartículas de plata

Generalmente la preparación de nanopartículas se lleva a cabo por un método de reducción química. Dentro de los reductores que se utilizan se encuentran borohidruros, citratos, ascorbato y hidrógeno elemental.

La reducción de iones metálicos (Me^+) como la plata (Ag^+) u oro (Au^+) en solución acuosa genera soluciones coloidales con diámetros de partículas de varios nanómetros [33].

Inicialmente la reducción de complejos con iones metálicos (Ag^+) permite la formación de átomos metálicos (Ag^0), los cuales luego se aglomeran en grupos oligoméricos. Estos grupos eventualmente permiten la formación de partículas metálicas coloidales.

Por ejemplo, mientras se forman partículas de plata coloidal, cuando las mismas son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz visible, las soluciones tienen un color amarillo con una banda intensa en el rango de 380-450 nm y otras bandas menos intensas o más pequeñas a mayor longitud de onda en el espectro de absorción. Esta banda se atribuye a la excitación colectiva de la nube de electrones

en las partículas, con un cambio periódico en la densidad de electrones en la superficie (absorción de plasmón superficial) [34].

La principal ventaja del método de reducción química es su reproducibilidad y la posibilidad de obtener coloides monodispersos con una distribución estrecha en el tamaño de la partícula, razón por la cual, son frecuentemente preparadas nanopartículas metálicas siguiendo esta metodología, empleando como agentes reductores especies químicas tales como ácidos orgánicos, alcoholes, polioles, aldehídos y azúcares.

El almidón ($C_6H_{10}O_5$)_n, que es un tipo común de carbohidrato, es un polímero de glucosa y se encuentra en los granos de cereales (trigo, arroz, maíz, avena, cebada) así como en tubérculos como las papas. La amilopectina, insoluble en agua caliente y la amilosa soluble en agua, son los componentes principales del almidón. En nuestras condiciones experimentales, la amilosa está presente en la solución acuosa de almidón soluble y posee una estructura helicoidal como muestra la siguiente figura:

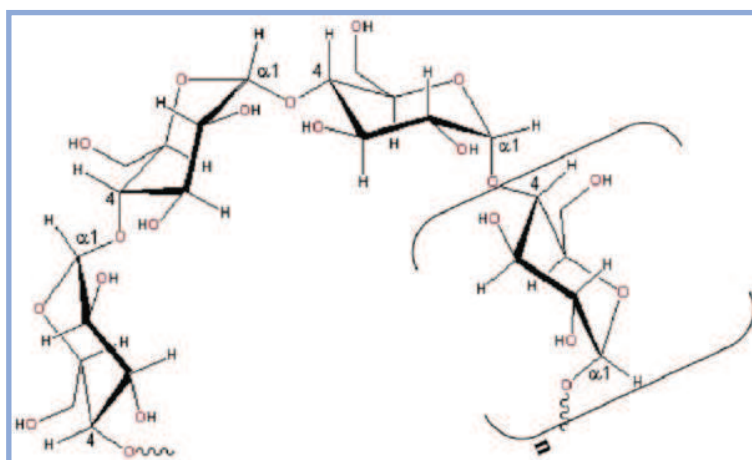


Figura 15. Estructura helicoidal de amilosa, utilizada para funcionalizar y estabilizar las nanopartículas en suspensión. (Figura modificada de Yakout y col. 2015 [35])

El agua caliente cambia la amilosa lentamente en moléculas más pequeñas. Esta reacción, un ejemplo de hidrólisis, es catalizada por ácidos que dan moléculas aún más simples, como la glucosa, $C_6H_{12}O_6$. La glucosa se ha establecido como un muy buen agente reductor del nitrato de plata al metal sólido (Ag^0). [35]

El concepto de preparación de nanopartículas “verdes” utilizando β -D-glucosa como agente reductor fue informado por primera vez por Raveendran y colaboradores [36] donde el almidón desempeñó el papel de estabilizador. En el presente trabajo, se preparan nanopartículas de plata utilizando almidón soluble que actúa tanto como agente reductor y como estabilizador. El almidón soluble, el componente amilosa del almidón, es un polímero lineal formado por los enlaces α - (1, 4) entre las unidades de D-glucosa y adopta una conformación helicoidal a la izquierda en solución acuosa. A pesar de su ligera ramificación, la amilosa se comporta esencialmente como un polímero lineal, formando películas y complejos con ligandos. En esta reacción, el aldehído terminal del almidón soluble se usa para reducir el nitrato de plata mientras que el almidón mismo estabiliza las nanopartículas de plata. [35, 37]

3.2 Objetivos

Sintetizar nanopartículas de plata coloidales, caracterizarlas y aplicarlas directamente por inmersión o aerosol sobre textiles, con el fin de evaluar su actividad antimicrobiana y su persistencia después de lavados.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata coloidales se realizó según el protocolo presentado por Vigneshwaran [37]. En un proceso de síntesis de un solo paso, primero se solubilizó 1,0 g almidón soluble (Cicarelli grado reactivo) en 100 mL de agua destilada, calentándolo sobre manta calefactora a 40°C hasta su completa disolución. Luego, se agregó lentamente 1 ml de una solución acuosa 100 mM de nitrato de plata (AgNO_3 Anedra, grado reactivo), en agitación constante. Posteriormente, la mezcla se mantuvo en una autoclave a 15 psi de presión, 121 °C durante 5 min. La solución resultante presentó un color amarillo claro, lo que indicó la formación de nanopartículas de plata. Las nanopartículas así preparadas fueron estables en solución acuosa durante un período de más de tres meses a temperatura ambiente (25 °C). La suspensión formada tiene una concentración de 4700 ppm de plata.

3.3.2 Caracterización de las nanopartículas

El tamaño y el potencial Z fue medido por espectroscopía de dispersión de luz (DLS), con un equipo Zeta-Sizer Malvern modelo Nano-ZS. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en un equipo JEOL JEM 1010. Ambos equipos fueron utilizados durante la beca de estadía en el Grupo de Química Coloidal de la Universidad de Vigo, España.

Las medidas por espectroscopía UV-Vis se realizaron en un espectrofotómetro Metrolab 1600 plus de la empresa Nanotek.

El análisis de composición por espectroscopía de rayos X, EDS se realizó en un SEM 505 PHILIPS, perteneciente a la Fundación Argentina de Nanotecnología.

3.3.3 Impregnación de los textiles

Se hicieron ensayos depositando directamente la suspensión coloidal de nanopartículas de plata, en distintas concentraciones, sobre textiles de diferente naturaleza, sin ninguna modificación previa, de dos maneras diferentes: por aerosol y por inmersión durante 15 minutos en la suspensión en agitación. Todas las muestras se secaron en estufa a 28 °C por 24 horas luego de la aplicación de la suspensión de

nanopartículas de plata y su lavado. Posteriormente fueron esterilizadas en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

3.3.4 Cuantificación del contenido de plata por absorción atómica

La determinación del contenido de plata en las telas se realizó siguiendo el método EPA 3050B (13) mediante una digestión ácida de las muestras donde se mide plata catiónica total. Se pesaron alrededor de 40 mg de cada una de las telas en un erlenmeyer de 250 mL, tratando de que las muestras sean representativas, se tomaron aleatoriamente trozos de telas de distintos lugares. Se agregaron 10 mL de HNO₃ (Merck grado analítico) 1:1 mezclando cuidadosamente y tapando el recipiente con un vidrio de reloj. Las muestras se calentaron a 95 ± 5 °C durante 15 minutos sin ebullición, bajo campana. Una vez que estuvieron a temperatura ambiente se agregaron 5 mL de HNO₃ concentrado y se calentó a la misma temperatura durante 30 minutos y hasta que terminaron de generar humos marrones propios de la oxidación de la muestra por el ácido. Éste paso fue repetido una vez más y se dejó evaporar la muestra hasta un volumen de 5 mL. Luego se agregó 2 mL de agua y 3 mL de H₂O₂ (Cicarelli p.a.) 30% permitiendo la peroxidación calentando a 95 ± 5 °C, evitando pérdidas de muestra por proyección. Se repitió este paso hasta observar que no se producía más efervescencia agregando de a 1 mL de H₂O₂ 30% sin pasar un volumen total agregado de 10 mL. Por último, se agregaron 2 mL de HCl (Cicarelli reactivo analítico) concentrado y se permitió evaporar la muestra hasta un volumen de 5 mL. Se traspasó a un matraz de 100 mL enrasando con agua ultrapura.

Todas las muestras se procesaron por triplicado y se cuantificaron un equipo de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo Analyst 800, con horno de grafito, previa medida de la curva de calibrado realizada con patrones provistos por Perkin Elmer.

3.3.5 Ensayos microbiológicos

A fin de evaluar la inhibición del crecimiento microbiano por las telas modificadas con nanopartículas de plata, se utilizó el método de difusión en agar. Este método es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antimicrobiano. Comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a sustancias específicas. En este caso se utilizan como discos, trozos de tela cuyo agente antimicrobiano es la plata proveniente de las nanopartículas insertas en las mismas.

Se prepararon inóculos en una solución de cloruro de sodio al 0,9 % (Anedra reactivo analítico), del agente bacteriano a ensayar (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) con una concentración 1,5 x 10⁸ UFC/ml obtenido por comparación con un estándar de turbidez 0,5 Mc Farland.

Sobre la superficie de una placa con medio de cultivo agar Mueller-Hinton (Britania), diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad, se sembró con un hisopo estéril el inóculo elegido sobre toda la superficie del medio de cultivo. A continuación, se colocaron los discos de tela con nanopartículas de plata siempre tomando como blanco una tela sin nanopartículas. Se incubaron las placas durante 24

horas en estufa de cultivo a 35 - 37 °C, permitiendo el crecimiento bacteriano y la difusión de la plata en el medio y luego se midieron los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, comparando con el blanco.

3.3.6 Ensayos de lavado

Para comprobar la retención de las nanopartículas de plata, lo que tiene un interés muy específico relacionado con la minimización de impactos ambientales, se realizaron ensayos de resistencia al lavado. Para esto se llevó a cabo un ensayo de laboratorio simulando un lavado en un lavarropas doméstico. Se colocó la muestra en un vaso de precipitado con agua corriente con una concentración de jabón en polvo de uso doméstico de 1 g/100 ml, dosis recomendada por el fabricante. Los lavados duraron un tiempo de 60 minutos en agitación constante. Se realizaron tantos lavados como fuera necesario según el tiempo a evaluar. Posteriormente se realizaron análisis del contenido de plata en la tela lavada y en el agua de lavado, por absorción atómica.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 Caracterización y estudio de estabilidad de las nanopartículas de plata coloidales

Las nanopartículas de plata coloidales que fueron sintetizadas utilizando almidón soluble como agente reductor y estabilizador; presentó una coloración amarilla, propia de las nanopartículas de plata con una concentración de 4700 ppm de plata.

Más allá que el color es un indicativo del tamaño de las nanopartículas, se requiere hacer algunos estudios para su caracterización.

Para medir el tamaño de las nanopartículas se utilizó un equipo de dispersión de luz dinámica (DLS) arrojando un valor de tamaño promedio de 57 ± 4 nm.

Para comprobar la forma y tamaño también se realizaron observaciones en microscopio electrónico de transmisión (TEM) (figura 16), donde el tamaño promedio de las partículas fue de 52 ± 3 nm.

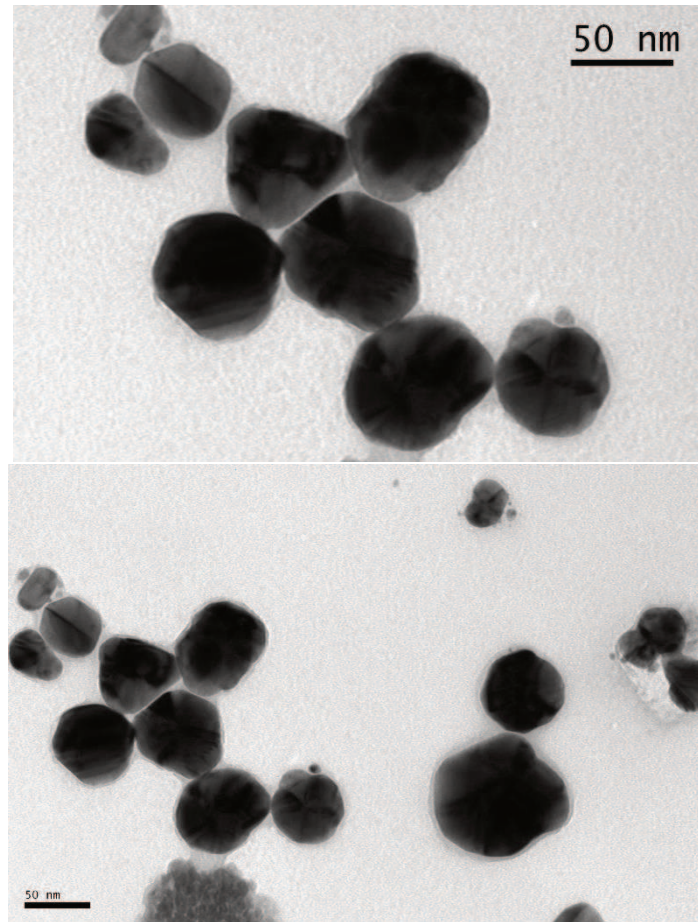


Figura 16. Nanopartículas de plata coloidales vistas en TEM

Como parte de la caracterización, se realizaron análisis de composición por espectroscopía de dispersión de rayos X (EDS) acoplado a un microscopio electrónico de barrido (SEM). Para realizar el análisis, fue necesario colocar una gota de la suspensión sobre un soporte de silicio, y luego evaporar el solvente en estufa de vacío a 220°C. En la figura 17 se muestra el resultado del análisis, y la imagen correspondiente del microscopio con el área analizada:

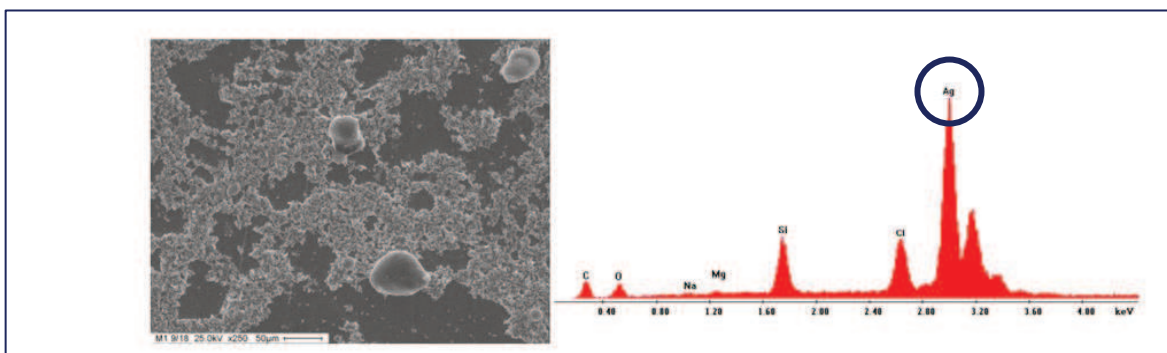


Figura 17. Análisis de composición por espectroscopía de rayos X de las nanopartículas de plata coloidales.

Element	Wt %
C K	22,69
O K	13,62
NaK	1
MgK	1,08
SiK	6,67
ClK	4,59
AgL	50,35
Total	100

En los gráficos EDS se observó la presencia de la banda de plata que constituye un 50 % del material, confirmando que las nanopartículas observadas en la imagen corresponden a la plata. También se observaron otros elementos propios de la síntesis y el soporte de la muestra en el caso del silicio.

Se realizó un espectro UV-Vis para ver el pico de plasmón correspondiente a una longitud de onda de 420 nm, característica de la plata. Se diluyó la suspensión de nanopartículas coloidales concentrada (4700 ppm) en agua destilada para obtener suspensiones de 250, 500, 750 y 1000 ppm. Se realizó el espectro a 420 nm, donde todas mostraron el pico característico (figura 18), confirmando la presencia de las nanopartículas de plata, sumado al color amarillo de la suspensión que representa a las partículas de plata de ese tamaño.

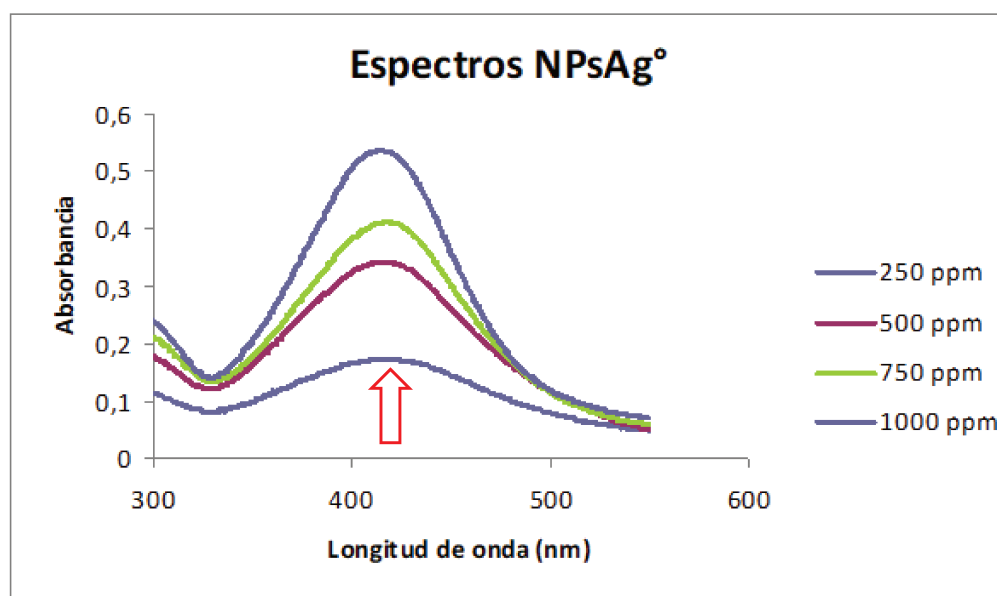


Figura 18. Espectros de las suspensiones de nanopartículas de plata coloidales a la longitud de onda de su plasmón característico, 420 nm.

Raza y sus colaboradores, sintetizaron NpAg por diversos métodos químicos de reducción en solución, registrando las propiedades de las nanopartículas formadas. La tabla 1 resume las propiedades de nanopartículas sintetizadas por 5 métodos químicos diferentes, y se comparan con las sintetizadas en este trabajo (número 6). Se observa que, utilizando el almidón como reductor, se obtienen nanopartículas de características similares, y en algunos casos mejores, que las sintetizadas con borohidruro de sodio, o citrato de sodio. [20] Esto representa una ventaja económica y ecológica.

Tabla 1. Propiedades de nanopartículas de plata sintetizadas por distintos métodos químicos.

Muestra	Precursor	Agente reductor	Agente estabilizante	Color	Forma	Tamaño (nm)
1	AgNO ₃ (1mM, 50 mL)	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (1%, 5 mL) Adición gota a gota	TSC	Amarillo verdoso	Esféricas	30-80
2	AgNO ₃ (5 mM, 1 mL)	NaBH ₄ (50 mM, 0,5 mL) Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (1%, 5 mL)	PVP (0,5mL, 1 mM), TSC	Verde oscuro	Triangular	150
3	AgNO ₃ (1mM, 2 mL) Gota a gota	NaBH ₄ (2 mM, 50 mL)	-	Amarillo claro	Esféricas	25-70
4	AgNO ₃ (5 mM, 1 mL)	NaBH ₄ (50 mM, 0.5 mL) Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (30mM, 0.5 mL)	PVP (0,5mL, 1 mM), TSC	Amarillo brillante	Esféricas	15-50
5	AgNO ₃ (5 mM, 1 mL)	NaBH ₄ (50 mM, 0,5 mL) Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ (1%, 5 mL)	PVP (0,5mL, 1 mM), TSC	Azul oscuro	Esféricas	30-200
6	AgNO₃ (100 mM, 1 mL)	Almidón (1 %)	Almidón (1 %)	Amarillo brillante	Esféricas	10 -60

3.4.2 Impregnación preliminar de fibras textiles por aerosol e inmersión, con nanopartículas de plata coloidales

Se hicieron ensayos depositando directamente la suspensión coloidal de nanopartículas de plata sobre los sustratos textiles sin ninguna modificación.

El depósito de las nanopartículas se puede realizar de dos maneras, sumergiendo el textil en la suspensión o por aerosol. En la industria textil, se implementan los dos sistemas para distintas etapas del proceso, pero una gran mayoría utiliza spray para impregnar el material con distintos compuestos. Además, esta última técnica tiene la ventaja de utilizar menos suspensión de nanopartículas y resulta un proceso más efectivo, logrando un depósito homogéneo en toda la superficie del textil.

En forma preliminar se realizó una prueba para comparar los métodos de inmersión y aerosol, evaluando la cantidad de plata depositada en cada procedimiento. El ensayo se llevó a cabo impregnando las telas (algodón y poliéster) con la suspensión de 500 ppm de nanopartículas de plata sobre una tela a base de algodón y otra a base de poliéster, las dos utilizadas principalmente como gasas y vendas. Se eligió la suspensión de 500 ppm como punto medio de partida para luego en los siguientes ensayos ir evaluando las demás concentraciones.

Se impregnaron por dos metodologías distintas:

- a- Por aerosol rociando las dos caras de la tela, una sola vez
- b- Por inmersión durante 15 minutos en la misma suspensión, en agitación.

En la tabla 2, se resumen los resultados luego de analizar un triplicado de cada muestra por absorción atómica, con el fin de cuantificar la cantidad de plata depositada:

Tabla 2. Contenido de plata en algodón y poliéster preparados por spray e inmersión en una suspensión 500 ppm de nanopartículas, obtenidos por absorción atómica.

Tipo de tela	Técnica de deposición	mg Ag / 100 g tela
Algodón	Aerosol	65 ± 8
Algodón	Inmersión	63 ± 7
Poliéster	Aerosol	50 ± 10
Poliéster	Inmersión	66 ± 9

Tanto por inmersión como por aerosol se obtienen valores comparables. La ventaja de la técnica por aerosol es que el tiempo de contacto es mucho menor. Por este motivo decidimos realizar las experiencias de impregnación directa por aerosol.

3.4.3 Evaluación de la cantidad de plata depositada

Se impregnaron telas de algodón, utilizando la técnica de aerosol, con las suspensiones preparadas anteriormente por dilución de nanopartículas de plata coloidal (250, 500, 750 y 1000 ppm) probando distintos números de capas (1, 2 y 4). En la figura 19 se muestran las curvas de incremento de la cantidad de plata según el número de impregnaciones. Se comprobó que, a medida que aumentaban el número de impregnaciones, efectivamente la cantidad de plata depositada también aumentaba.

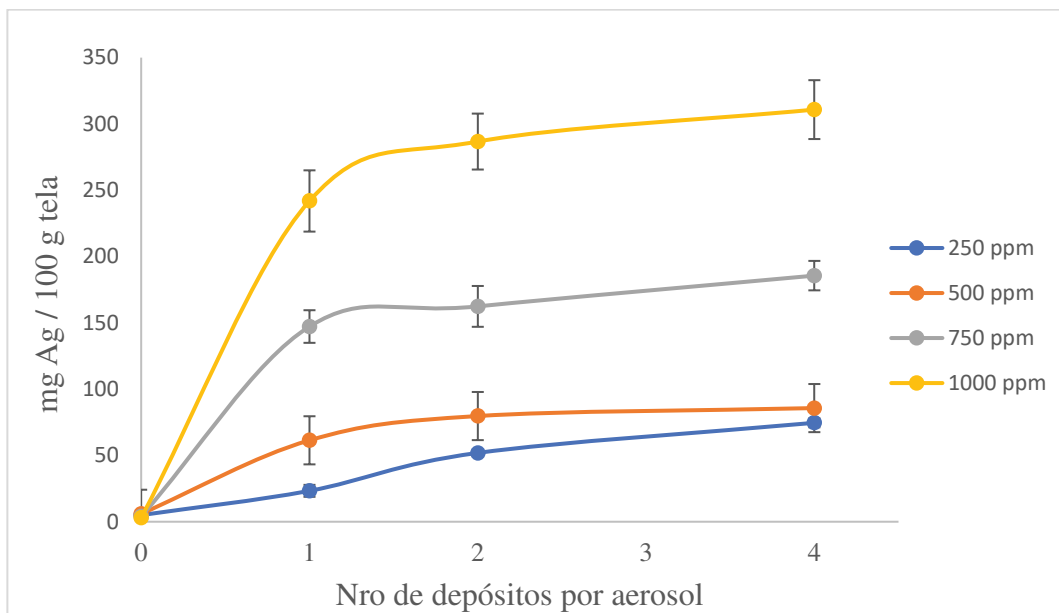


Figura 19. Cantidad depositada de plata en función del número de impregnaciones.

3.4.4 Ensayo de actividad antimicrobiana y lavado

De todas las telas preparadas para el ensayo anterior, se eligió las impregnadas con la menor concentración de las suspensiones de nanopartículas; las telas de algodón impregnadas anteriormente por aerosol depositando la suspensión de concentración 250 ppm, 1, 2 y 4 veces. Las mismas fueron evaluadas para comprobar su actividad antimicrobiana frente a bacterias, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante el ensayo de difusión en agar, y en ensayos de lavado.

Para realizar el ensayo de difusión en agar, las muestras se recortaron en un tamaño de 10 x 15 mm cada una, evaluándose por triplicado para cada uno de los microorganismos mencionados. Las fotos de la figura 20 muestran el ensayo de difusión en agar de las muestras de algodón impregnadas con suspensión de nanopartículas de plata de 250 ppm. B) blanco (sin nanopartículas); 1) 1 depósito; 2) 2 depósitos; 3) 4 depósitos. Todas las muestras presentaron halos de inhibición entre 14 y 16 mm, mientras que los blancos no.

Luego de evaluada la actividad antimicrobiana inicial se realizaron ensayos de lavado, con las muestras de tela que habían sido impregnadas 2 veces con la suspensión de 250 ppm. Se realizaron 5 lavados de 1 hora a cada una de las telas, tomando muestras de tela y del agua de lavado en cada uno de ellos. Se pudo observar, figura 21 que la pérdida de plata al cabo de 5 ciclos de lavado es de un 32 % con respecto al valor inicial.

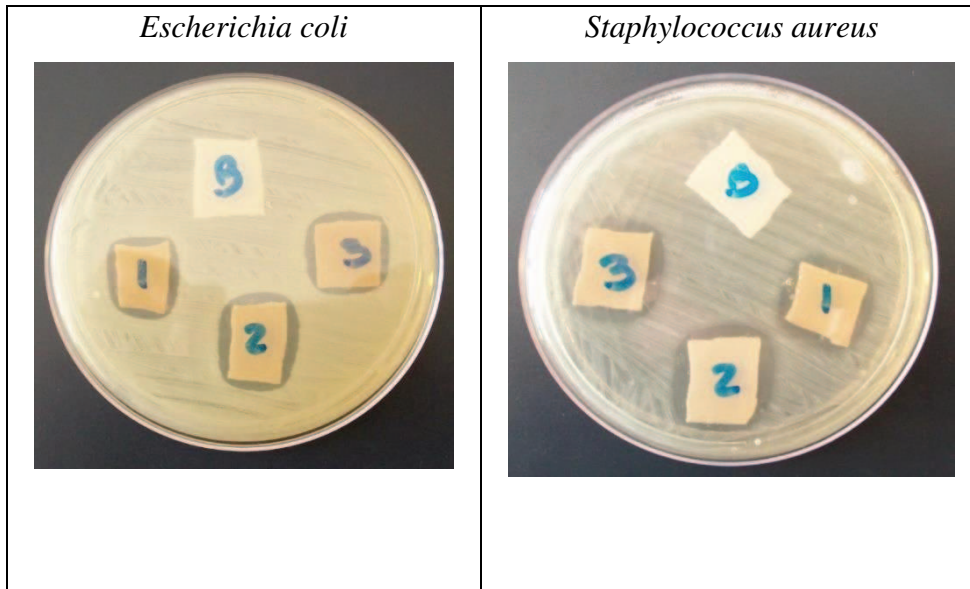


Figura 20. Ensayo de difusión en agar de las muestras de algodón impregnadas con suspensión de nanopartículas de plata de 250 ppm.

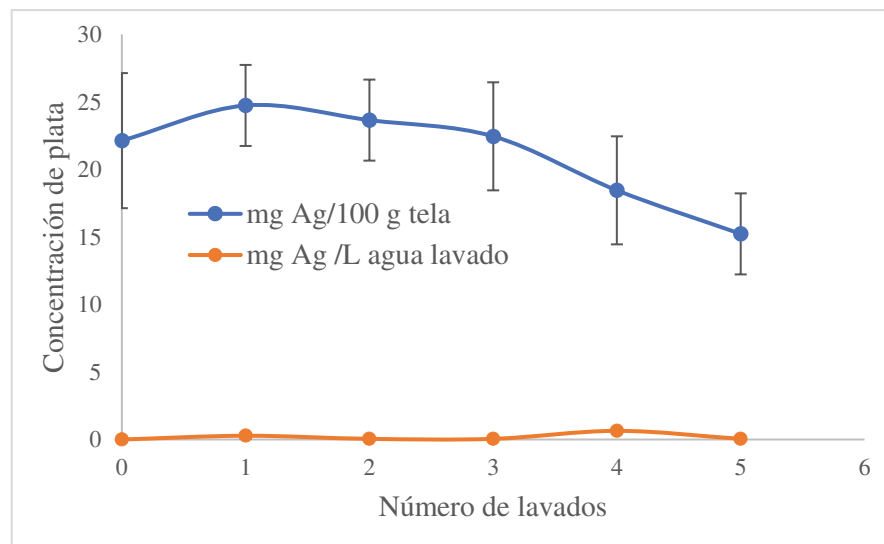


Figura 21. Pérdida de plata vs número de lavados

Con las mismas muestras lavadas se evaluó la actividad antimicrobiana de igual manera que antes de los lavados, por el método de difusión en agar. Los resultados, que se resumen en la tabla 3, muestran que los halos de inhibición disminuyen a medida que aumentan los lavados, pero que la actividad antimicrobiana se mantiene.

Tabla 3. Halos de inhibición (mm) en muestras textiles sometidas a 5 ciclos de lavado.

Número de lavados	<i>Escherichia coli</i> (mm)	<i>Staphylococcus aureus</i> (mm)
0	16 ± 1	16 ± 1
1	16 ± 1	16 ± 1
2	14 ± 1	14 ± 2
3	14 ± 2	14 ± 1
4	14 ± 1	14 ± 1
5	12 ± 1	13 ± 1

Estos halos indican una muy buena persistencia post lavado de la capacidad antimicrobiana si se los compara con los halos de 16 mm promedio obtenidos en muestras sin lavar (0 lavados) expuestas a similares condiciones. Se observó que la actividad se reduce en muy baja proporción luego de 5 lavados, por lo cual se mantiene el objetivo de los textiles de inhibir el crecimiento bacteriano. Esto puede ser debido a que el sustrato textil donde se depositaron las nanopartículas es de algodón, y posee cargas en su superficie, que permiten que las nanopartículas rodeadas de almidón (o amilosa) queden adheridas con una unión relativamente fuerte como para soportar los lavados. Sin tener que funcionalizar el sustrato (tela) y funcionalizando las nanopartículas con el mismo reductor, aplicadas por aerosol, se puede lograr un producto de fabricación sencilla, y rápida, que minimiza las pérdidas del nanomaterial por lavados, gracias a su adherencia.

La mayoría de las investigaciones se tratan de textiles que incluyen nanopartículas donde se le realiza un paso previo de funcionalización, que involucra el agregado de algún producto que favorezca la adherencia de las nanopartículas. [55]

3.5 Conclusión

Cumpliendo con los objetivos propuestos para esta parte del trabajo, se realizó la síntesis química de nanopartículas coloidales, de tamaño adecuado, y con muy buena estabilidad en suspensión, al igual que buena actividad antimicrobiana.

Se verificó que la técnica usada para la impregnación de textiles con las nanopartículas le confiere a este material una capacidad antimicrobiana frente a bacterias modelo de Gram positivas y Gram negativas, persistente luego del lavado, lo que se evidencia por el significativo diámetro de los halos de inhibición que se observan sobre los bordes de todas muestras tratadas. Este efecto no se evidencia para las muestras de telas sin tratamiento (blancos), lo que indica que el mismo es efectivamente adquirido mediante el agregado de las nanopartículas de plata. Como el producto a elaborar es no perecedero (es decir que se busca disponer de capacidad bactericida luego de una cierta cantidad de lavados) se deben hacer ensayos adicionales aplicando el protocolo de lavado varias veces previo a los bioensayos. Algo interesante y muy importante desde el punto de vista ecológico, es que luego de los lavados, la cantidad de plata que se pierde en el agua no es muy grande, pese a la no funcionalización del textil para favorecer la adherencia. De todas formas, se deben realizar ensayos de confirmación y control, en caso de una utilización masiva de estos materiales.

Se menciona que la adición de nanopartículas de plata modifica la tonalidad de las telas, por lo cual las muestras originalmente blancas presentan un tono marrón típico de la oxidación de la plata por acción del aire. Esta tonalidad no desaparece luego del lavado, lo que permite inferir que hay una buena retención de plata en el tejido.

4 PRODUCCIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA IN SITU DENTRO DE UNA RED POLIMÉRICA FORMADA CAPA POR CAPA SOBRE UN SOPORTE TEXTIL.

4.1 Introducción

Los textiles de liberación sostenida de plata varían enormemente en su tecnología de fabricación, el contenido de plata, patrones de liberación de cationes y aplicaciones. Las técnicas de preparación de telas con nanopartículas de plata difieren entre sí, pero en líneas generales se podrían dividir en aquellas donde las nanopartículas se forman *in situ* (dentro de las fibras), o aquellas donde las nanopartículas se encuentran en una suspensión coloidal y son luego depositadas sobre las fibras por distintos métodos, ya sea inmersión o aerosol.

En la última década se ha visto el uso de interacciones químicas *covalentes* como una herramienta clave para la construcción de nuevas estructuras moleculares y supramoleculares con diversas aplicaciones.

En la formación de films poliméricos delgados, el mayor crecimiento se produjo en el uso de interacciones no covalentes, utilizando una técnica denominada ensamblado capa por capa, introducida por Decher en 1991 [38, 39]. Esta técnica implica la absorción, mediada por fuerzas electrostáticas, de un polielectrolito cargado, sobre una superficie (plástica, textil, metálica, etc.) que presenta una carga del signo contrario. Debido a un efecto de sobrecompensación de la carga, es posible en un paso posterior adsorber sobre éste, otro polielectrolito de carga opuesta. Realizando este procedimiento en forma secuencial, se obtienen films multicapa cuyo espesor puede controlarse a nivel molecular, ajustando diversos factores como el número de capas, pH, fuerza iónica, etc. Dentro de estas redes nanoestructuradas, se forman luego las nanopartículas.

Esta técnica basada en la adsorción alternada de especies catiónicas y aniónicas con múltiples cargas ha experimentado una explosión de crecimiento tanto en aplicaciones teóricas como experimentales. La popularidad del método es propia de la habilidad para crear films delgados poliméricos “a medida” con un rango de grupos funcionales casi ilimitados dentro de la estructura del film. Esta flexibilidad se logra con el uso de un proceso de adsorción simple y muy accesible.

El área ha progresado para incluir la incorporación de polímeros electroactivos, colorantes orgánicos, semiconductores de *quantum dots*, especies electroquímicamente activas, y una amplia variedad de proteínas y moléculas biológicas, y nanopartículas, que son las que nos interesan en este trabajo.

Las fuerzas que tienen influencia sobre las propiedades de los films construidos mediante la técnica capa por capa son representadas en la figura 22 y las aplicaciones dependen de su manipulación.

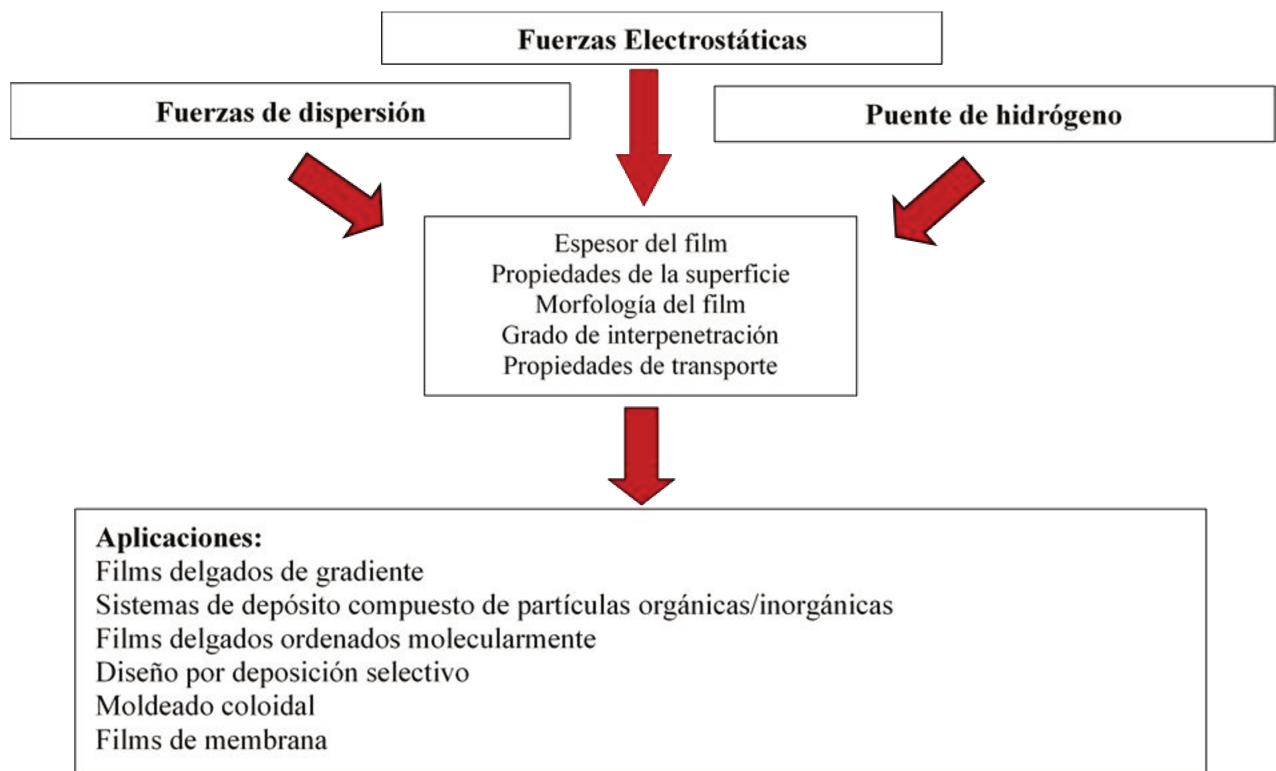


Figura 22. Fuerzas intervinientes en los films

Las interacciones electrostáticas entre el polielectrolito en solución y la superficie son la llave para lograr la estructura final del film. Sin embargo, y en un segundo lugar, las fuerzas de corto rango también juegan un rol importante en el espesor del film, las propiedades superficiales y en algunos casos pueden determinar la estabilidad de las multicapas.

Estas fuerzas secundarias pueden jugar también un rol importante en el depósito selectivo de los polímeros en la superficie, la formación de estructuras polares no simétricas, y la naturaleza de permeabilidad y transporte iónico en el film.

El pH juega un papel muy importante en las propiedades de los polielectrolitos. Se encontró que la carga superficial, la interpenetración entre capas, y el espesor de esta pueden ser cambiados drásticamente al variar el pH del polication o polianión

Los efectos de las interacciones hidrofóbicas u otras no específicas, pueden ser posibles razones de las diferencias en la adsorción de distintos tipos de sustratos cargados, o con diferente contra polielectrolitos [40].

Rubner y colaboradores del Instituto Tecnológico de Massachusetts [41] introdujeron en el año 2000 la técnica de formación de nanopartículas metálicas y semiconductoras en películas multicapa de polielectrolitos que funcionan como nanoreactores. Por otro lado, existe otro método de incorporación de nanopartículas que fue aplicado por Hinestroza y colaboradores [42] que consiste en un método de síntesis de nanopartículas de plata modificadas en suspensión, que luego depositaron en textiles sintéticos y naturales, previamente modificados.

4.1.1 Polímeros, polielectrolitos y complejos de polielectrolitos

Los polímeros son moléculas de alto peso molecular (macromoléculas) compuestas por unidades estructurales denominadas monómeros. Cuando los monómeros presentan una carga electrostática en solución, estamos en presencia de un polielectrolito (PE). Los PE son una clase de polímeros que han adquirido un continuo y creciente interés, tanto desde el punto de vista técnico como científico. Esto se debe fundamentalmente a la necesidad de sintetizar y procesar estos materiales mejorando su especificidad y actividad en sus múltiples aplicaciones.

De la manera más simple se puede definir un polielectrolito como un polímero que se disocia en especies cargadas en solución. Normalmente el término polielectrolito es empleado para sistemas de polímeros consistentes en macroiones, es decir, macromoléculas que portan grupos iónicos unidos covalentemente a su estructura, los cuales a su vez deben ser compensados por contraiones de cargas contrarias para garantizar la electroneutralidad del sistema.

Una gran variedad de moléculas de interés biológico, como las proteínas y el ADN, son polielectrolitos. Existen además polielectrolitos sintéticos, ampliamente usados en aplicaciones comerciales como aditivos en productos cosméticos (agentes espesantes y modificadores reológicos), adhesivos, estabilizantes para suspensiones coloidales, tratamiento de aguas, floculantes y otros.

Los polielectrolitos se clasifican en débiles o fuertes de acuerdo con su comportamiento ácido-base. En el primer grupo, el estado de carga de la molécula no depende del pH de la solución. En el segundo, los grupos cargados se hallan en equilibrio ácido-base y por lo tanto su grado de ionización será dependiente del pH. En este caso, el pK_a o el pK_b aparentes indican el pH en el cual la mitad de los grupos se hallan disociados, pero los polielectrolitos débiles presentan una curva de titulación mucho más ensanchada que aquella para los ácidos o bases débiles. Esto se debe a que el estado de carga de un monómero afecta el equilibrio ácido-base de sus vecinos, modificando sus constantes de protonación [43].

Los factores que determinan el comportamiento de los polielectrolitos son:

- a) Naturaleza de la carga
- b) Grado de disociación
- c) Localización de los sitios cargados
- d) Densidad de carga
- e) Regularidad en la distribución de los sitios cargados
- f) La naturaleza de los contraiones

Dependiendo del tipo de carga los PE pueden ser:

- **Catiónicos (+):** los cuales portan cargas positivas, como por ejemplo el poli (cloruro de alil dimetil amonio)
- **Aniónicos (-):** los cuales portan cargas negativas, como por ejemplo el poli (estiren sulfonato de sodio)

Ahora bien, si consideramos el grado de disociación que presentan en solución los grupos ionizables, los PE se pueden clasificar en:

- **Fuertes:** disociables en todo el intervalo de pH para sistemas acuosos, como por ejemplo el poli (estiren sulfonato de sodio) y el poli (cloruro de alil dimetil amonio)

- **Débiles:** disociables en un intervalo restringido de pH, como por ejemplo el poli (ácido acrílico) que se disocia poco en medio ácido y la poli(etilénimina) que permanece prácticamente sin disociar en medio alcalino.

Los polímeros y polielectrolitos se caracterizan por ser moléculas flexibles y capaces de adoptar un gran número de conformaciones. En ausencia de interacciones, los polímeros en solución adoptan una conformación conocida como ovillo aleatorio (*random coil*). [44]. Por otro lado, un polielectrolito fuertemente cargado en ausencia de contraiones buscará disminuir las repulsiones entre cargas y por lo tanto presentará en solución una conformación estirada, conocida como varilla (*rod*). En consecuencia, un aumento en la fuerza iónica o una disminución en la fracción de grupos cargados debida a cambios de pH en la solución, favorecerá las conformaciones ovilladas.

La conformación, de un polielectrolito real en una solución diluida estará determinada por el balance entre diversas interacciones tales como las fuerzas electrostáticas, la estadística conformacional, las fuerzas de van der Waals, las uniones hidrógeno, la condensación de contraiones [45], los impedimentos estéricos y (para polielectrolitos débiles y/o redox) los equilibrios químicos. En el caso de polielectrolitos adsorbidos en una superficie también serán importantes las interacciones superficie-polielectrolito y polielectrolito-polielectrolito.

Al mezclar dos soluciones de polielectrolitos de carga opuesta puede ocurrir la formación de un precipitado, conocido como complejo de polielectrolitos [46]. Este proceso ocurre debido a la formación de uniones iónicas entre los grupos cargados de cada polielectrolito, lo que disminuye drásticamente la carga neta del complejo, produce la liberación de contraiones y moléculas de solvente y da origen a la separación de fases. La formación de complejos de polielectrolitos es conocida desde la década de 1930, pero no fue hasta la década de 1990 cuando los químicos aprendieron a dominar este proceso para construir películas poliméricas muy delgadas.

Algunos de los polielectrolitos utilizados más frecuentemente en la metodología capa por capa son PAH (Clorhidrato de polialilamina) PAA (Ácido poliacrílico) y PDDA (Policloruro de dialil-dimetil amonio), los cuales fueron utilizados en este trabajo, cuya estructura se muestra en la figura 23.

El PAH es un polielectrolito catiónico preparado mediante la polimerización de la alilamina, y es utilizado en muchas aplicaciones biomédicas. El ácido poliacrílico PAA es el nombre genérico para el polímero sintético de alto peso molecular del ácido acrílico, es un polímero aniónico, es decir, muchas de las cadenas laterales pierden sus protones y adquirirán una carga negativa, lo que le confiere capacidad de absorber y retener agua, así como de hincharse hasta muchas veces su volumen original, por lo que actúa como un hidrogel. Se usa sobre todo como un buen agente adhesivo.

El PDDA es un polielectrolito catiónico usado en tratamiento de efluentes como coagulante, en la industria del papel, y purificación de agua.

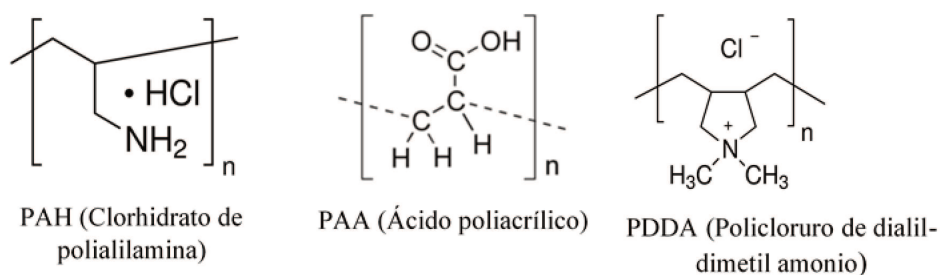


Figura 23. Estructura de polielectrolitos

4.1.2 Reductores

Un agente reductor es aquel que cede electrones a un agente oxidante. Existe una reacción química conocida como reacción de óxido-reducción, en la que se da una transferencia de electrones. Asimismo, la mayoría de los elementos metálicos y no metálicos se obtienen de sus minerales por procesos de oxidación o de reducción. Una reacción de reducción-oxidación consiste en dos semirreacciones: una semirreacción implica la pérdida de electrones de un compuesto, en este caso el compuesto se oxida; mientras que en la otra semirreacción el compuesto se reduce, es decir gana los electrones. Uno actúa como oxidante y el otro como reductor. Los reductores pueden ser inorgánicos y orgánicos, dentro de los inorgánicos se pueden mencionar los metales e hidruros, y dentro de los compuestos orgánicos a ciertos hidratos de carbono, entre otras sustancias.

Las nanopartículas de plata se pueden sintetizar en solución acuosa por la reducción de iones de plata utilizando distintos reductores químicos orgánicos o inorgánicos, como por ejemplo glucosa, ácido ascórbico, hidracina, borohidruro de sodio entre otros (figura 24).

El borohidruro de sodio, también llamado tetrahidruroborato de sodio, es un compuesto químico formado por un átomo de sodio, un átomo de boro y 4 átomos de hidrógeno, la forma más común en el que puede encontrarse en la naturaleza es NaBH_4 , fue descubierto en los años 1940 por un equipo liderado por Schlessinger.

Es de carácter selectivo usado en la síntesis de fármacos y otros compuestos orgánicos. Es un sólido blanco, que se suele encontrar en forma granulada (polvo). Es soluble en alcoholes y agua, aunque reacciona con ellos con relativa lentitud (acentuada si se añade una base fuerte) formando hidrógeno (riesgo de explosión). El borohidruro de sodio es también usado en pilas de combustible experimentales como un medio de almacenar hidrógeno; y en la reducción aldehídos y cetonas a alcoholes. El BH_4^- es un excelente ligando para iones metálicos, en especial con metales muy electropositivos, por ejemplo, $\text{Zr}(\text{BH}_4)_4$.

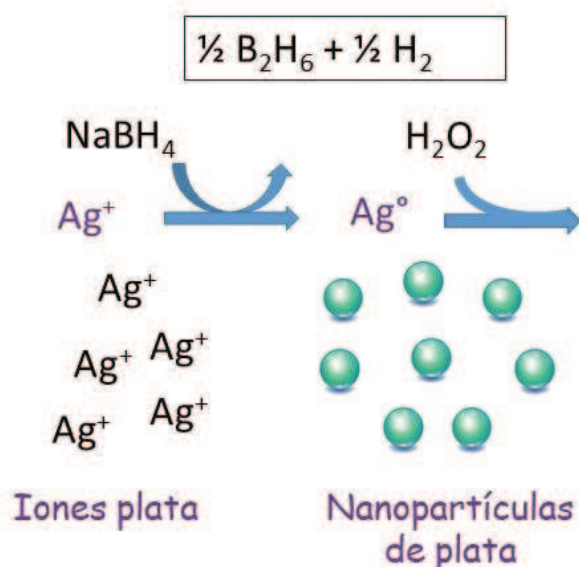


Figura 24. Formación de nanopartículas de plata con borohidruro de sodio.

4.1.3 Método de autoensamblado capa por capa

El método capa por capa para la preparación de películas delgadas se basa en la adsorción alternada de macromoléculas. Este concepto fue demostrado por primera vez en 1991 por Decher y Hong, empleando dos polielectrolitos de carga opuesta [47, 48].

Se comienza con un sustrato cargado (su carga depende de la carga que posea el soporte, que será de carga contraria), de forma, tamaño y material arbitrarios. Mientras ciertos sustratos presentan una carga superficial en forma natural (por ejemplo, el vidrio y los óxidos metálicos en general), otros requieren un tratamiento químico. Por ejemplo, pueden emplearse tioles cargados para modificar metales nobles, y silanos para silicio. El sustrato cargado se introduce posteriormente en una solución de un polielectrolito de carga opuesta (polímero A) durante algunos 10-15 minutos. En ese lapso el polímero se adsorbe en la superficie, invirtiéndose la carga electrostática superficial. El sustrato (que en esta instancia se encuentra cargado positivamente) se lava y se sumerge en una solución de un polielectrolito de carga opuesta al anterior (polímero B) observándose nuevamente la adsorción e inversión de la carga superficial. El proceso se repite en forma secuencial, hasta obtener una película del espesor deseado, como se esquematiza en la figura 25.

El método de ensamblado capa por capa ha cobrado una mayor importancia en la actualidad como herramienta para la modificación de superficies. Los materiales que se pueden utilizar actualmente en el ensamblado incluyen enzimas, virus, nanopartículas, macro iones inorgánicos y prácticamente cualquier macromolécula. La presencia de cargas electrostáticas en los bloques de construcción también ha dejado de ser un requerimiento, ya que se han preparado auto ensamblados basados en la formación de uniones hidrógeno, interacciones donante-aceptor, uniones covalentes, química de coordinación, etc. [49]

Gran parte del éxito del método capa por capa radica en la capacidad de controlar las propiedades de las películas obtenidas mediante la elección de las variables del proceso. Estas variables se combinan con las condiciones de tratamiento post- ensamblado, permitiendo adaptar las propiedades de las películas a aplicaciones concretas.

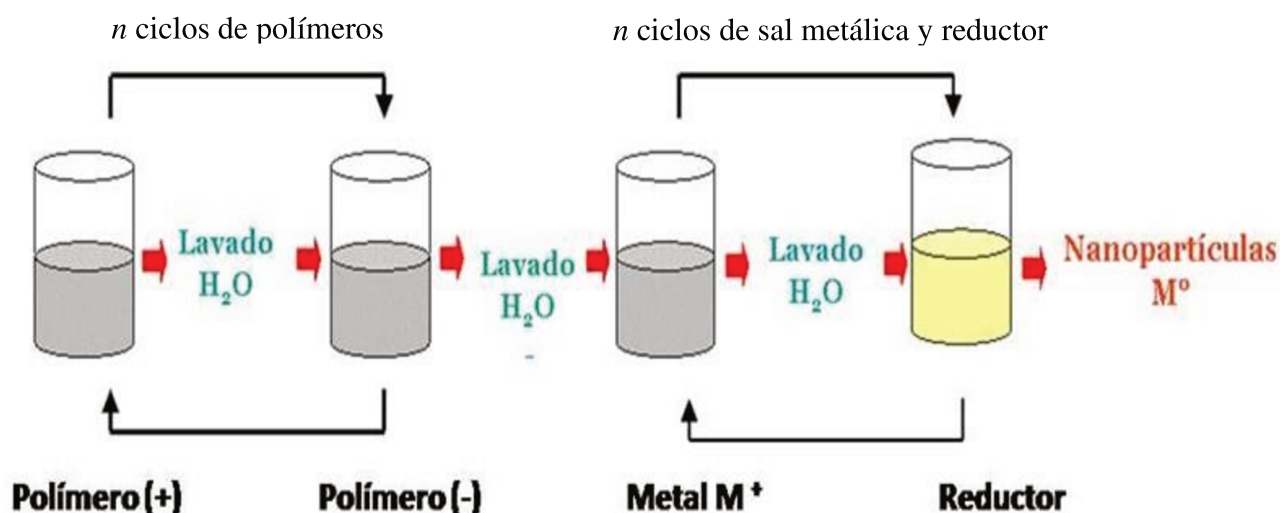


Figura 25. Proceso de depósito de polímeros capa por capa.

4.2 Objetivos

Evaluar la efectividad de la formación de nanopartículas de plata dentro de redes poliméricas formadas sobre la superficie de un textil, caracterizarlas, y comprobar su actividad antimicrobiana.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Procedimiento de deposición capa por capa y formación in situ de nanopartículas de plata

Las fibras textiles elegidas para el ensayo, previamente limpias en alcohol etílico y agua, fueron sumergidas de forma secuencial en las soluciones de polielectrolitos de carga positiva y negativa, durante 15 minutos en cada solución. El tiempo de inmersión se basa en la bibliografía. [47] La secuencia se repitió las veces elegidas formando una multicapa de polielectrolitos sobre las fibras. Los polielectrolitos utilizados fueron: PAH (Clorhidrato de polialilamina, Sigma) 10 mM, PAA (Ácido poliacrílico, Sigma) 20 mM, PAA (+MW, Sigma) de alto peso molecular 20 mM; y PDDA (Policloruro de dialil-dimetil amonio, Sigma) 10 mM. Todos los reactivos son calidad analítica, y fueron disueltos en agua ultrapura.

Luego se sumergieron en una solución de AgNO_3 20 mmol.L^{-1} , durante un tiempo determinado para que los cationes de la plata Ag^+ penetren en la red polimérica, realizando luego la reducción con NaBH_4 0,1 M, de manera que la plata Ag^+ contenida en la red pasó a Ag^0 formando las nanopartículas.

Los tiempos de inmersión fueron evaluados entre 5 y 30 minutos en cada polímero; el tiempo de lavado se estableció en 15 minutos con 3 intercambios de agua ultrapura; inmersión en AgNO_3 de 24 horas y la reducción con NaBH_4 (borohidruro de sodio) de 2 horas (figura 26).

Se utilizó un sistema de marcos de teflón, constituido por 4 marcos que soportan telas de 5 x 5 cm, sumergidos en sendas cubas conteniendo las distintas soluciones utilizadas. Previamente se realizó el ensayo por inmersión en vasos de vidrio con agitación magnética, pero se observó que se pierde uniformidad en el depósito en las telas.

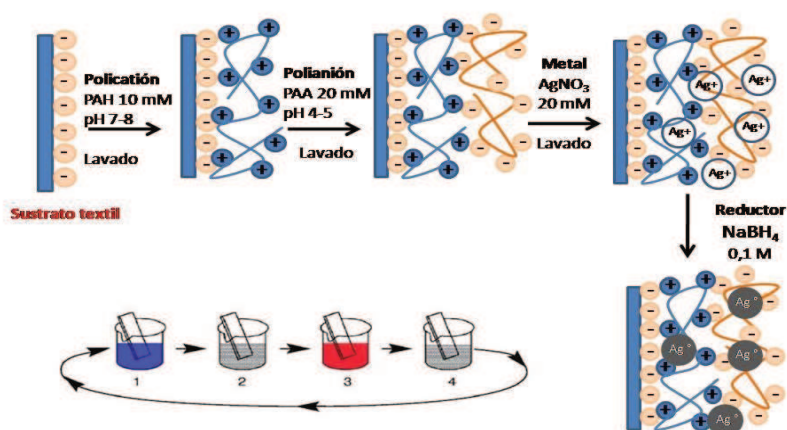


Figura 26. Técnica capa por capa

4.3.2 Cuantificación por absorción atómica

La determinación del contenido de plata en las telas se realizó siguiendo el método EPA 3050B mediante una digestión ácida de las muestras donde se mide plata catiónica total. Se pesaron alrededor de 40 mg de cada una de las telas en un erlenmeyer de 250 mL, tratando de que las muestras sean representativas, se tomaron aleatoriamente trozos de telas de distintos lugares. Se agregaron 10 mL de HNO₃ (Merck grado analítico) 1:1 mezclando cuidadosamente y tapando el recipiente con un vidrio de reloj. Las muestras se calentaron a 95 ± 5 °C durante 15 minutos sin ebullición, bajo campana. Una vez que estuvieron a temperatura ambiente se agregaron 5 mL de HNO₃ concentrado y se calentó a la misma temperatura durante 30 minutos y hasta que terminaron de generar humos marrones propios de la oxidación de la muestra por el ácido. Éste paso fue repetido una vez más y se dejó evaporar la muestra hasta un volumen de 5 mL. Luego se agregó 2 mL de agua y 3 mL de H₂O₂ (Cicarelli p.a.) 30% permitiendo la peroxidación calentando a 95 ± 5 °C, evitando pérdidas de muestra por proyección. Se repitió este paso hasta observar que no se producía más efervescencia agregando de a 1 mL de H₂O₂ 30% sin superar un volumen total agregado de 10 mL. Por último, se agregaron 2 mL de HCl (Cicarelli p.a) concentrado y se permitió evaporar la muestra hasta un volumen de 5 mL. Se traspasó a un matraz de 100 mL enrasando con agua ultrapura.

Posteriormente, para determinar el contenido de plata, la digestión ácida de cada muestra se analizó mediante un espectrómetro de Absorción Atómica marca Perkin Elmer modelo Analyst 800, con horno de grafito, previa medida de la curva de calibrado realizada con patrones provistos por Perkin Elmer.

4.3.3 Caracterización por microscopía electrónica

La presencia y tamaño de las nanopartículas de plata fueron determinadas por microscopía electrónica de barrido (SEM). Todas las imágenes fueron obtenidas en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL EDS, perteneciente al Centro de Microscopías Avanzadas de la Universidad de Buenos Aires.

4.3.4 Ensayos microbiológicos

A fin de evaluar la inhibición del crecimiento microbiano por las telas modificadas con nanopartículas de plata, se emplearon distintos métodos de ensayo, tanto en medios líquidos como sólidos. Se evaluó el efecto de las nanopartículas de plata en la inhibición de bacterias compatibles con ATCC Gram positivas y Gram negativas, usualmente adoptadas en la bibliografía como referencia.

4.3.5 Difusión en agar

Este método se basa en una prueba de susceptibilidad bacteriana frente a sustancias específica, y generalmente se suele denominar antibiograma cuando la sustancia es un antibiótico. En contraste en nuestro caso, en lugar de usar discos de antibióticos se utilizan trozos de tela en forma de discos cuyo agente antimicrobiano es la plata proveniente de las nanopartículas insertas en las mismas.

Se prepararon inóculos en una solución de cloruro de sodio al 0,9 % (m/v), de la bacteria a ensayar (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) con una concentración 1,5 x 10⁸ UFC/ml obtenido por comparación con un estándar de turbidez: 0,5 Mc Farland.

Sobre la superficie de una placa con medio de cultivo agar *Mueller-Hinton* (diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad) se sembró con un hisopo estéril el inóculo elegido sobre toda la superficie del medio de cultivo. A continuación, se colocaron los discos de tela con nanopartículas de plata y siempre procesando de manera conjunta un disco de tela sin nanopartículas, representando al blanco de la prueba. Se incubaron las placas durante 18-24 horas a 37 °C, permitiendo el crecimiento bacteriano y la difusión de la plata en el medio de cultivo y luego se midieron los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, comparando con el blanco. Todas las muestras se ensayaron por triplicado.

4.3.6 Ensayo por contacto – Norma JIS Z2801

La evaluación del efecto antimicrobiano en el tiempo se realizó según la norma internacional japonesa de evaluación de superficies antimicrobianas JIS Z2801.

Se esterilizaron muestras de telas de 5 x 5 cm en autoclave, y se colocaron en cajas de Petri de vidrio estériles. Se preparó un inóculo de la cepa bacteriana a ensayar en una concentración del orden de 1×10^8 UFC/ml, contra un estándar Mc Farland 0,5 y diluciones siguientes para lograr una concentración de 1×10^5 UFC/ml. Luego sobre cada una de las muestras se depositó 0,4 ml del inóculo bacteriano preparado. A continuación, se cubrió cada muestra con un film de 4 x 4 cm, ejerciendo una ligera presión sobre la deposición bacteriana.

Las placas Petri conteniendo las muestras se incubaron a 37°C y humedad del 100% durante 24 horas, excepto tres muestras de referencia de cada uno de los tratamientos, cuyo lavado se realizó inmediatamente después de la inoculación, constituyendo el tiempo inicial. El lavado del resto de las muestras se realizó a las 24 horas de incubación.

El lavado se realizó en cada una de las muestras junto con su film correspondiente con 10 ml de solución salina al 0,9 % (m/v) estéril y agitando muy bien para favorecer la recuperación de todas las células bacterianas posibles. En los casos que correspondía se realizaron diluciones para realizar el conteo de placa en medio de cultivo Agar nutritivo y realizar el recuento de bacterias viables UFC existentes en cada una luego de una incubación de 24 horas a 37 °C en estufa de cultivo. Todas las muestras se evaluaron por triplicado.

Cálculo de la actividad antimicrobiana: el cálculo de la actividad antimicrobiana se hace en base a un triplicado de cada una de las muestras (blanco: sin antimicrobiano, muestra: con antimicrobiano) a los tiempos 0 y 24 horas de aplicación del inóculo. La fórmula que se utiliza es:

$$R = (\log (B/A) - \log (C/A)) = \log (B/C)$$

R: valor de la actividad antimicrobiana

A: promedio de UFC de bacteria a tiempo 0 de los blancos (**sin** antimicrobiano)

B: promedio de UFC de bacteria a tiempo 24 h de los blancos (**sin** antimicrobiano)

C: promedio de UFC de bacterias a tiempo 24 h de las muestras (**con** antimicrobiano).

4.3.7 Ensayos de lavado

Es importante que las nanopartículas una vez formadas en la matriz de la tela queden atrapadas en la red de polielectrolitos de forma estable, y no se liberen al ambiente.

Con el fin de evaluar la retención de las nanopartículas de plata, lo que tiene un interés muy específico relacionado con la minimización de impactos ambientales, se realizaron ensayos de resistencia al lavado.

Para esto se llevó a cabo un ensayo de laboratorio simulando un lavado en un lavarropas doméstico, colocando la muestra en un vaso de precipitado con 400 ml de agua corriente con una concentración de jabón en polvo de uso doméstico de 1 g/100 ml, dosis recomendada por el fabricante. Los lavados duraron un tiempo de 24 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Se realizaron tantos lavados como fuera necesario según el tiempo a evaluar. Posteriormente se realizaron análisis del contenido de plata en la tela lavada y en el agua de lavado, por absorción atómica.

4.3.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para comparar entre los diferentes grupos de muestras. Se utilizó la prueba de Dunnett para determinar la significancia de las diferencias entre los diferentes grupos de muestras y el grupo de control (ensayo en blanco). Los análisis estadísticos se realizaron con el software Excel. Las pruebas paramétricas fueron precedidas por pruebas de distribución normal por sitio y de homogeneidad de varianza entre sitios. Se aplicó un nivel de significancia de $P < 0.05$ en todas las pruebas estadísticas.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Ensayos preliminares

En una primera instancia fue necesario realizar ensayos preliminares con el fin de determinar los parámetros que mejor se ajustaban al producto que se quería conseguir en cuanto a efectividad y costo. Los parámetros que fueron evaluados para la aplicación de esta técnica son el tipo de polímero, tiempo de inmersión en cada uno, número de capas, tiempo de lavado, tiempo de inmersión en el nitrato de plata, tipo de reductor y tiempo de inmersión en el mismo; resumidos en la tabla 4:

Tabla 4. Parámetros a evaluar

	Tipo	Tiempo	Nro de capas
Polímero	PAH, PAA	5, 10, 15 min	2, 3
Lavados		5; 15 min	-
AgNO₃		4; 24 hs	-
Reductor	Borohidruro de sodio	4; 24 hs	-

4.4.2 Elección de soportes textiles

Se entiende por *material textil* el que está compuesto exclusivamente por fibras textiles, cualquiera que sea el proceso seguido para su obtención. Se incluyen dentro de esta categoría también, productos cuyo peso esté constituido al menos en un 80 % por fibras textiles; los recubrimientos de diversos productos constituidos de material textil en al menos el 80 % de su peso; los productos textiles incorporados a otros productos, cuando así se especifique en su composición.

Un material tiene la consideración de *fibra textil* si reúne las propiedades de flexibilidad, resistencia, elasticidad y gran longitud respecto a su diámetro (relación longitud / diámetro: de 500 a 1000 veces). Las fibras textiles se pueden clasificar en dos grandes grupos: *fibras naturales* y *fibras químicas*.

El primer grupo está constituido por todas aquellas fibras que se encuentran como tales en estado natural y que no exigen más que una ligera adecuación para ser utilizadas como materia textil. Se subdividen, según su procedencia, en las de origen *animal* (lana, alpaca), *vegetal* (algodón, lino, yute) y *mineral* (asbestos). El segundo grupo, el referente a las fibras químicas, está formado por una gran diversidad de fibras que no existen como tales en la naturaleza, sino que se fabrican por medio de un proceso industrial. Se subdividen, según la procedencia del polímero que constituye su composición química, en “artificiales” (polímero de origen natural, como la celulosa, el vidrio, el carbono) y “sintéticas” (polímero de transformación química, como el poliéster, la poliamida, los acrílicos, las poliolefinas). Según su composición química presentan características de hidrofílicas o hidrofóbicas como se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Propiedades de las fibras

Material	Grupos reactivos	Hidrofobicidad/hidrofilicidad
Algodón	- OH	Hidrofilico
Lana	- OH; - NH ₂	Hidrofilico
Poliéster	- COOH; -OH	Relativamente hidrofóbico
Poliamidas / aramidas	- NH ₂ ; -OH	Hidrofilico

Textiles técnicos: Se definen como materiales y productos textiles que disponen de las propiedades específicas requeridas para el desarrollo de una determinada función y adaptada a su entorno de aplicación, y que dan respuesta a exigencias técnico-cualitativas elevadas (ligereza, rendimiento mecánico, térmico, conductividad, resistencia al fuego, etc.) Por exclusión, desde un punto de vista más amplio, pueden considerarse como textiles técnicos todos los materiales y productos textiles que no pueden inscribirse dentro de los sectores tradicionales de indumentaria, hogar y decoración, o, dicho en otras palabras, a todos los productos textiles en los que la funcionalidad es tan o más importante que la estética. La frontera entre los textiles convencionales y de uso técnico es sutil y en ocasiones poco importante. Es la intención de lanzar al mercado un producto textil que dé respuesta a una necesidad técnica específica lo que permite considerar a una empresa como productora de textiles técnicos. El nivel tecnológico es una de las características básicas del proceso de fabricación de textiles de uso técnico, no tanto por la necesidad de un equipamiento específico, que sólo es necesario en determinados productos, sino por la necesidad de disposición de unas instalaciones que permitan la obtención de los citados niveles de calidad que se exigen; en cualquier caso, y de forma general, la tecnología del proceso no difiere de la habitual en todos los sectores de la industria textil, es por ello que muchas industrias textiles tradicionales pueden y de hecho fabrican productos textiles técnicos utilizando en parte o totalmente las mismas instalaciones industriales. La consideración de *textil técnico* va ligada tanto a la aportación de características técnicas apreciables en los productos textiles como a las necesidades de todo tipo demandadas por los usuarios. De hecho, los textiles técnicos forman parte de un campo más amplio, que se denomina “ingeniería de materiales flexibles”, que incluye gomaespumas, películas, polvos, resinas y plásticos. Además, son una parte esencial de los materiales compuestos (composites): combinación de dos o más materiales de forma o composición diferentes, por lo general una matriz que puede estar constituida de textiles y un refuerzo más fuerte que esta matriz.

Debido a que el objetivo de la incorporación de nanopartículas de plata es la protección antimicrobiana, los textiles desarrollados pueden entrar dentro de la categoría de “técnicos”, siendo su campo de aplicación, principalmente el de la medicina y el trabajo. Por tal motivo, para dar origen a un textil técnico con actividad antimicrobiana por la incorporación de nanopartículas de plata, la primera prueba fue realizada sobre 2 telas comerciales de distinta composición: **1)** Poliéster 100 %, **2)** Algodón 100%. Las nanopartículas de plata fueron formadas in situ, siempre partiendo de nitrato de plata (AgNO₃) utilizando como reductor borohidruro de sodio y como polímeros PAH y PAA. Los tiempos utilizados fueron: inmersión en polímero, 30 minutos, lavados, 15 minutos, inmersión en AgNO₃, 24 horas, reducción en NaBH₄, 4 horas.

Las muestras se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) para verificar la formación de nanopartículas en la superficie de las fibras, cuyas imágenes se muestran a continuación.

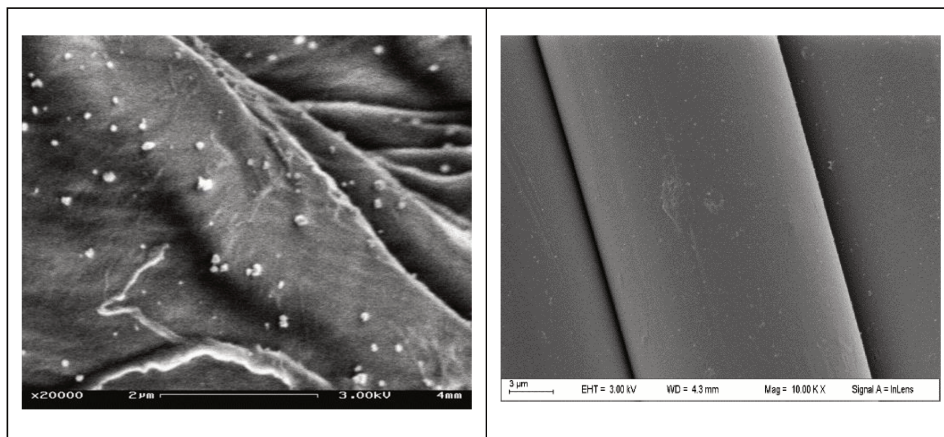


Figura 27. a) Algodón 100 % b) poliéster 100 %

4.4.3 Evaluación del tipo y número de capas de polielectrolitos y depósitos de plata.

Algunos de los polielectrolitos utilizados más frecuentemente en la metodología capa por capa son PAH (Clorhidrato de polialilamina) PAA (Ácido poliacrílico), PAA (+MW) de alto peso molecular; y PDDA (Policloruro de dialil-dimetil amonio), los cuales fueron evaluados y utilizados en este trabajo.

Se hicieron pruebas con los mismos depositando 3 capas de cada uno en forma alternada y por inmersión durante 15 minutos en cada solución, para evaluar si existía diferencia en el contenido de plata, la cual se midió por absorción atómica. Los resultados, expresados en la figura 28, muestran que el mayor contenido de plata lo presentaron las telas preparadas con el par PAH/PAA (3 capas), por lo cual se eligieron estos dos polielectrolitos para seguir con las experiencias.

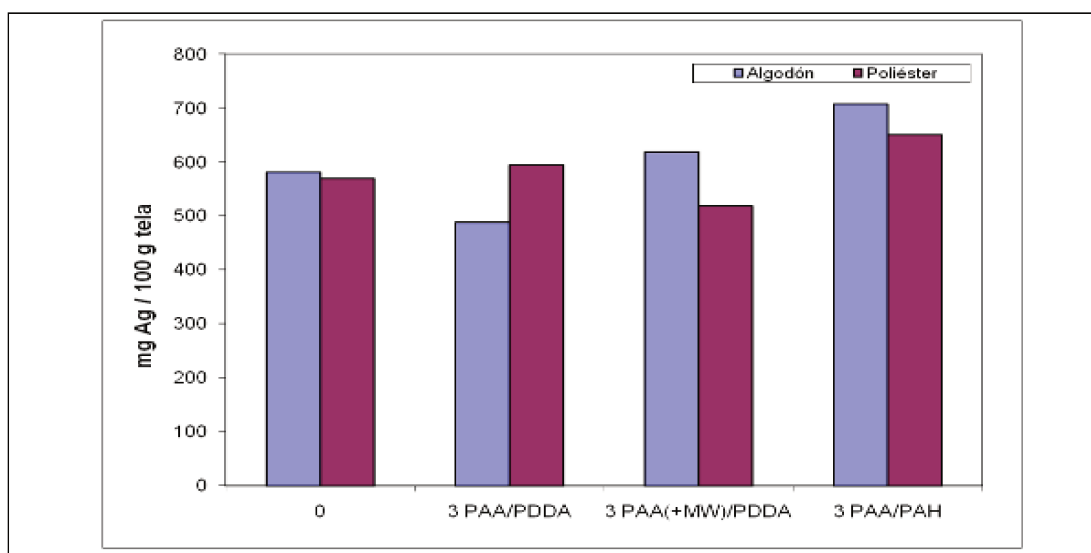


Figura 28. Evaluación de distintos polímeros en algodón (lila) y poliéster (bordó).

El número de capas de polímero es un factor importante para la formación de una red que permita el anclaje de las nanopartículas. Si son pocas capas puede pasar que no se forme la red adecuada y no tenga la carga superficial necesaria como para alojar los cationes de la plata y la formación de nanopartículas sería deficiente. Si por el contrario son muchas, a los cationes de Ag^+ se les dificultaría la

difusión dentro de la matriz, quedando retenidos en las capas más superficiales y demorando más tiempo en alojarse dentro de la red y el reductor también, sin favorecer la formación de las nanopartículas. A la vez se encarece el método de producción por utilizar mayor volumen de reactivos.

Para evaluar la incidencia del número de capas de polímeros y número de depósitos o intercambios de plata, fueron utilizadas dos telas comerciales como sustrato, una a base de fibra natural y otra a base de fibra sintética:

a- Algodón 100 %

b- Poliéster 100 %.

Los polímeros utilizados fueron PAH y PAA, reductor NaBH_4 y los tiempos utilizados fueron: inmersión en polímero, 15 minutos, lavados, 15 minutos, inmersión en AgNO_3 , 24 horas, reducción en NaBH_4 , 4 horas.

Se observó que aumentaba el contenido de plata en las telas a medida que aumentaba el número de depósitos de plata (figura 29), pero con el aumento de capas de polímeros no se observó incremento en la cantidad de plata (figura 30).

Por las tendencias se puede deducir que ambos soportes aumentan su contenido a medida que crece el número de capas, la cantidad depositada para el poliéster está próxima a la saturación, ya en la primera capa, al contrario del algodón

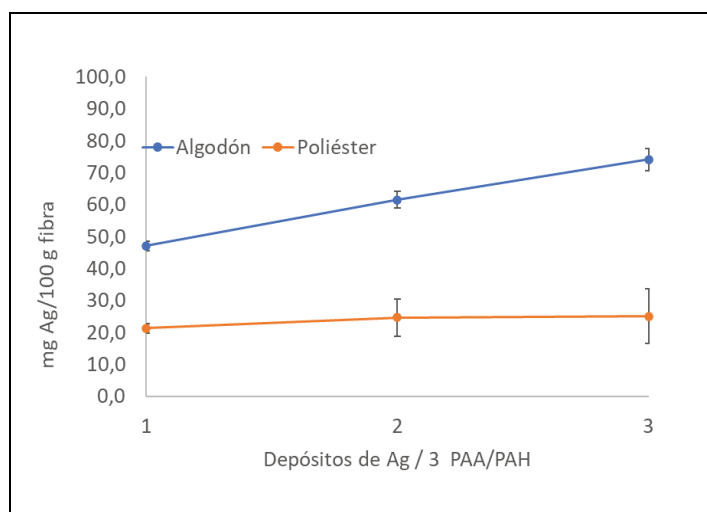


Figura 29. 1, 2 y 3 depósitos de Ag, con 3 PAH/PAA.

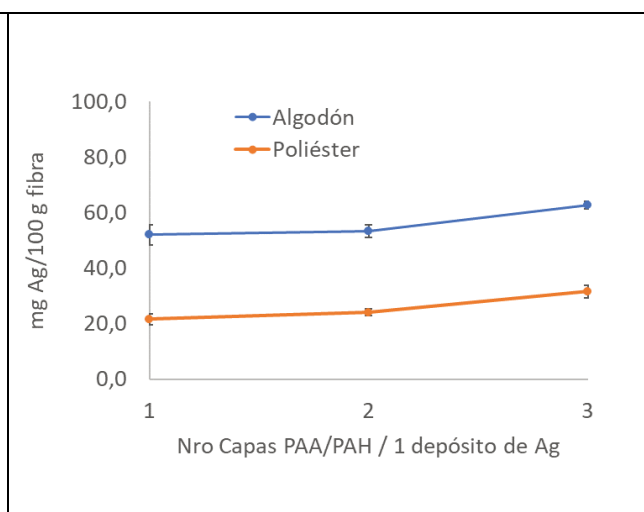


Figura 30. 1 depósito de Ag, con 1,2 y 3 PAH/PAA.

El grupo de Hammond [50] explica el comportamiento en la técnica tradicional de capa por capa por inmersión, en la que pequeños contraiones salinos acompañando las cadenas poliméricas en solución juegan un rol muy importante durante el depósito del film. La ganancia entrópica realizada como cargas de polielectrolito compensadas extrínsecamente (por ejemplo, las cargas puntuales en el film ocupadas por un contraión de la sal Ag^+), expulsan los iones pequeños a favor de la compensación intrínseca por un polielectrolito cargado alternativamente es una fuerza impulsora para la deposición de la película. Sin embargo, en presencia de concentraciones de sales lo suficientemente grandes, este es un proceso reversible, conocido como hinchamiento de la sal, el cual se describe físicamente como una competencia por sitios con carga en el film entre contraiones unidos y polielectrolitos cargados alternadamente. Este proceso se ha observado experimentalmente en algunos sistemas capa por capa a fuerzas iónicas grandes.

Los contraiones más estudiados son los cationes del período I y II. Los iones de este período como el Na^+ tienen una electronegatividad de orbital relativamente alta y ausencia de electrones de la capa exterior excitable. Estas características los agrupan como ácidos fuertes de los cuales no se podría esperar una unión favorable con una base débil como el ión carboxilato. Por otro lado, los iones moderadamente ácidos o débilmente ácidos, como Cu^{2+} , Fe^{2+} o Ag^+ , con mayor tamaño y polarizabilidad, así como electrones del orbital d fácilmente excitables, podrían tener interacciones mucho más favorables. Cuando un sustrato cargado es expuesto a soluciones de cargas alternadas de polielectrolitos sumergiéndolos, las moléculas cargadas cerca de la superficie se adsorben inmediatamente, generando un gradiente de concentración entre el seno de la solución y la región interfacial cerca de la superficie. El transporte del polielectrolito a la superficie está limitado por la difusión y ocurre relativamente lento. A medida que las moléculas individuales llegan a la superficie, tienen movilidad lateral para unirse a puntos de densidad de carga localizada, así como para penetrar la superficie de la película e interactuar con cadenas previamente adsorbidas. Si se permite que proceda al equilibrio durante la deposición, seguido de un enjuague prolongado en ausencia de sales, este proceso permitirá una complejación significativa del polianión policatiónico y liberará todos los contraiones de ácidos fuertes restantes o una gran parte de los contraiones de ácidos débiles restantes, dependiendo del sistema, lo que da como resultado una película multicapa altamente intercalada. El mismo proceso por spray podría acelerar y simplificar el proceso, obteniendo los mismos resultados. [50]

4.4.4 Evaluación de reductores.

Se realizó una evaluación de distintos reductores, dentro de los cuales se probaron: glucosa al 1%, hidracina 64 % y borohidruro de sodio 0,1 M.

La caracterización se realizó por microscopía SEM para poder evaluar la cantidad y tamaño de las partículas formadas, cuyas imágenes se observan en la figura 31.

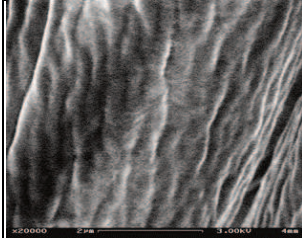
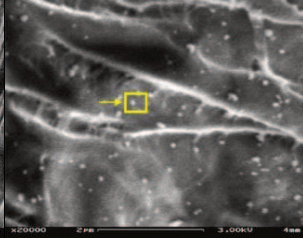
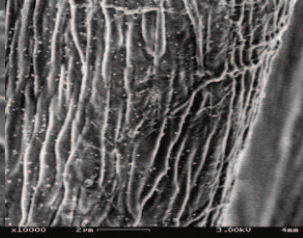
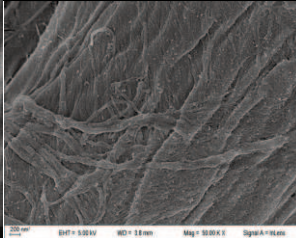
Algodón Blanco	Glucosa 1 %	Hidracina 64 %	Borohidruro de sodio 0,1 M
			
	Tamaño promedio $86 \pm 16 \text{ nm}$ (n= 10)	Tamaño promedio $90 \pm 9 \text{ nm}$ (n= 10)	Tamaño promedio $31 \pm 5 \text{ nm}$ (n= 10)

Figura 31. Fotografías SEM de evaluación de reductores.

El NaBH_4 es el reductor con mejor cinética en la formación de nanopartículas, el tamaño de partículas es uniforme, y la concentración utilizada es baja con respecto a la hidracina. La hidracina es un compuesto inflamable y su utilización y almacenamiento en el laboratorio no es aconsejable. La glucosa es muy buen reductor y económico; las partículas que se obtuvieron presentaron un buen tamaño y uniformidad, pero genera una reacción mucho más lenta (24 h contra 4 h de borohidruro de sodio) y resulta

difícil el control de la reacción. No obstante, es una buena alternativa para la producción sostenible de nanopartículas. Al ser el NaBH_4 el reductor más eficiente se decidió utilizar el mismo en la producción de las nanopartículas de plata en los textiles.

4.4.5 Evaluación del tiempo de inmersión en las soluciones de polielectrolitos.

El tiempo de inmersión en cada polímero es un factor clave en el tiempo total de proceso de generación de los textiles, ya que se realizan varias inmersiones en los dos polímeros. A su vez, el tiempo en que el textil está en contacto con el polímero interfiere en la cantidad de este depositado, y en los entrecruzamientos con el polímero anterior. Por eso se requiere encontrar un tiempo de compromiso donde se permita un depósito suficiente de polímero como para formar una cantidad de nanopartículas de plata posteriormente, con buena actividad antimicrobiana, y que no alargue el proceso de producción. Se evaluó el tiempo de inmersión de los textiles en cada polímero para 2 bicapas PAH / PAA, con la posterior formación de nanopartículas, y luego las muestras fueron caracterizadas por microscopía SEM, para determinar el tamaño y cantidad de partículas formadas. (Figura 32)

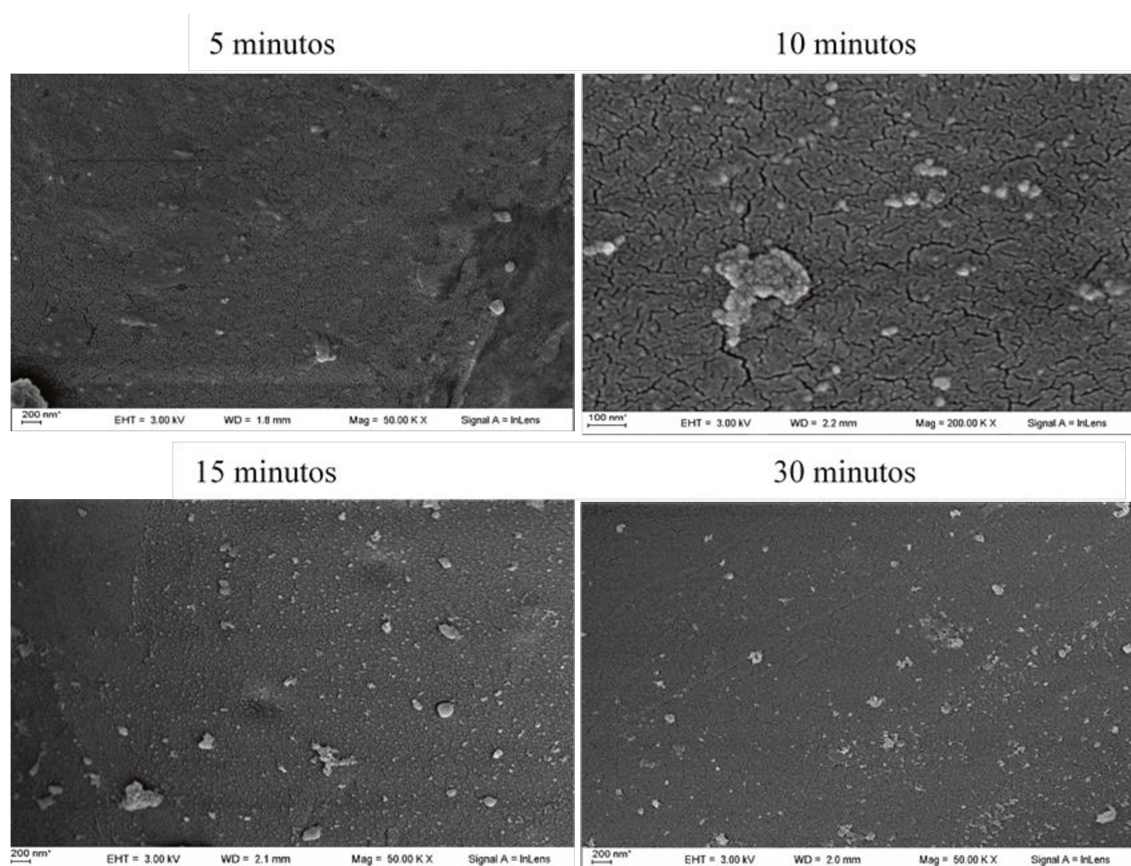


Figura 32. Formación de nanopartículas sobre poliéster a distintos tiempos de inmersión en cada polímero.

La cantidad de nanopartículas formadas para tiempos entre 5 y 30 minutos de inmersión en cada polímero fue en valores crecientes, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 6. Cantidad y diámetro promedio de nanopartículas según tiempo de inmersión.

Tiempo (min)	Partículas x cm ²	Diámetro promedio (nm) (n=10)
5	8,55 x 10 ⁷	48 ± 9
10	1,40 x 10 ⁸	40 ± 10
15	6,58 x 10 ⁸	50 ± 7
20	8,54 x 10 ⁸	49 ± 9

El tamaño de partícula se mantuvo constante entre 40 y 50 nm. Con estos resultados y como el tamaño de las nanopartículas se mantiene constante se decidió realizar las pruebas siguientes con 15 minutos de inmersión en cada polímero, respetando la bibliografía, como se realizó en las primeras pruebas.

4.4.6 Pruebas microbiológicas

Para estudiar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata incorporadas en las telas se realizaron ensayos preliminares con el objetivo de optimizar las condiciones. Las nanopartículas de plata metálica actúan por liberación lenta de iones Ag⁺, que reaccionan con las proteínas de la pared celular de los microorganismos, desnaturalizándolas y provocando así la inhibición de su crecimiento o la muerte. [17, 18] El ensayo elegido en un primer lugar fue la técnica de *difusión en agar* que fue descrita anteriormente. Esta técnica se basa en el contacto de una superficie (discos de telas de 10 mm de diámetro) que posee un agente antimicrobiano, con el agar inoculado con la bacteria que se pretende ensayar. Se decidió utilizar dos microorganismos bacterianos de referencia, *Escherichia coli* (cepa compatible con ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (cepa compatible con ATCC 25923).

Las muestras utilizadas para los ensayos preliminares fueron textiles de algodón modificados superficialmente con:

- a) Una, dos y tres bicapas de polímeros PAH/PAA y un depósito de plata. (figura 33)
- b) Una bicapa de PAH/PAA, y uno o dos depósitos de plata. (figura 34)

En cada placa de ensayo se incluyó un textil blanco, sin ningún tratamiento y un textil embebido en AgNO₃ sin reducción a plata metálica, para comparar. Las muestras se incubaron durante 24 h a 37 °C en estufa y se observaron y midieron las zonas de inhibición.

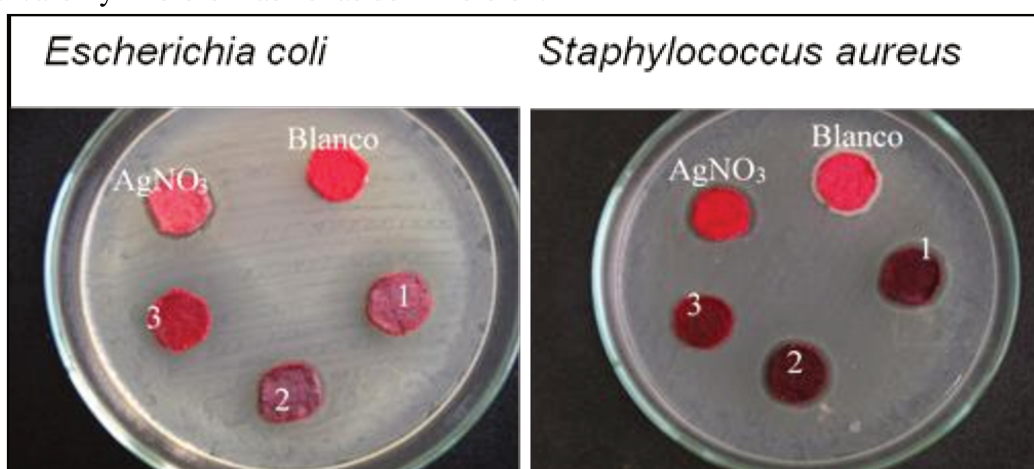


Figura 33. Algodón. 1) 1 capa PAH/PAA, 2) 2 capas PAH/PAA, 3) 3 capas PAH/PAA

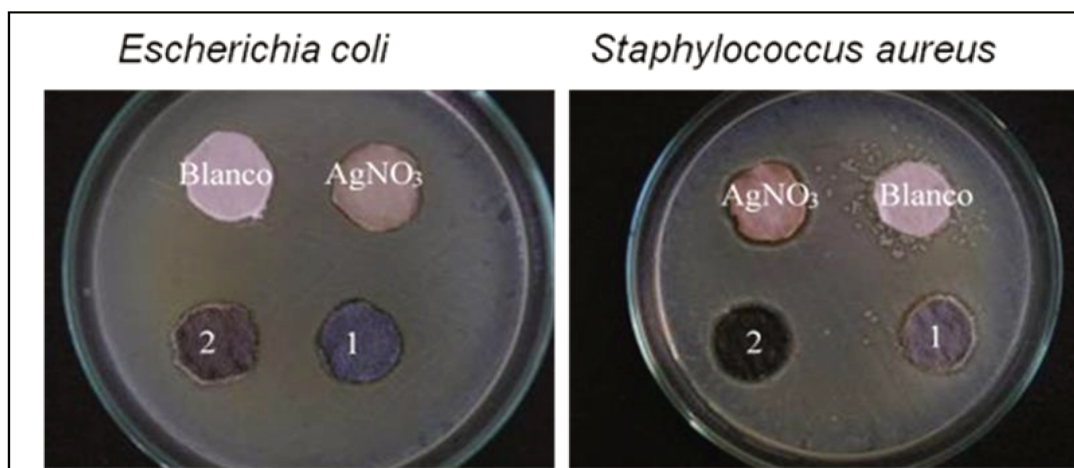


Figura 34. Algodón 1) 1 capa de Ag^0 , 2) 2 capas de Ag^0 .

Los blancos de algodón no presentaron zona de inhibición. Los discos con $AgNO_3$ y NP Ag presentaron zonas de inhibición con un diámetro total entre 15 y 19 mm para *Staphylococcus aureus*. El efecto sobre *Escherichia coli* fue menos significativo, mostrando una inhibición de crecimiento por debajo de la muestra, pero no halo de inhibición.

Se puede confirmar que la nanoplata tiene un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias y que estos resultados preliminares ameritan profundizar en el estudio aplicando otras metodologías de ensayo microbiológico para confirmar y cuantificar la actividad antimicrobiana. Las telas de algodón dan mejores resultados, debido a que al ser una fibra natural su entrecruzamiento es más abierto y permite una mayor difusión de la plata en el agar.

El poliéster también fue ensayado bajo las mismas condiciones, presentando resultados menos satisfactorios generando sólo inhibición debajo del disco de tela, para los dos microorganismos ensayados y en todos los casos, como se observa en la figura 35, para *Staphylococcus aureus* de telas preparadas con 1, 2 y 3 capas de PAH/PAA.

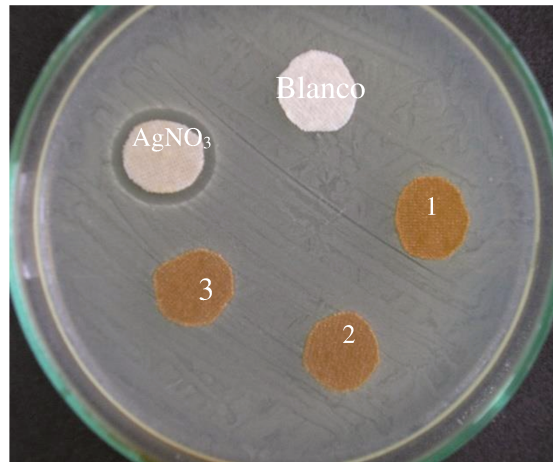


Figura 35. Poliéster. 1) 1 capa PAH/PAA, 2) 2 capas PAH/PAA, 3) 3 capas PAH/PAA

4.4.7 Caracterización por Microscopía Electronica de Barrido (SEM) y Espectroscopía dispersiva de rayos x (EDS).

Para poder estudiar el tamaño de las partículas formadas y la composición química de las mismas, sobre los textiles de algodón y poliéster, se obtuvieron diversas imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), junto con un análisis por espectroscopía de rayos x de energía dispersiva (EDS). Las muestras fueron montadas en tacos sobre una cinta de carbono, además de recubiertas con oro por la técnica de *sputtering*, para aumentar su conductividad y poder realizar la observación y el análisis. Se tomó una región de la muestra donde estaban presentes las nanopartículas y se realizó el análisis obteniendo el espectro correspondiente (figura 36) y la tabla de composición. Se confirmó así que las nanopartículas observadas eran del elemento Ag (plata).

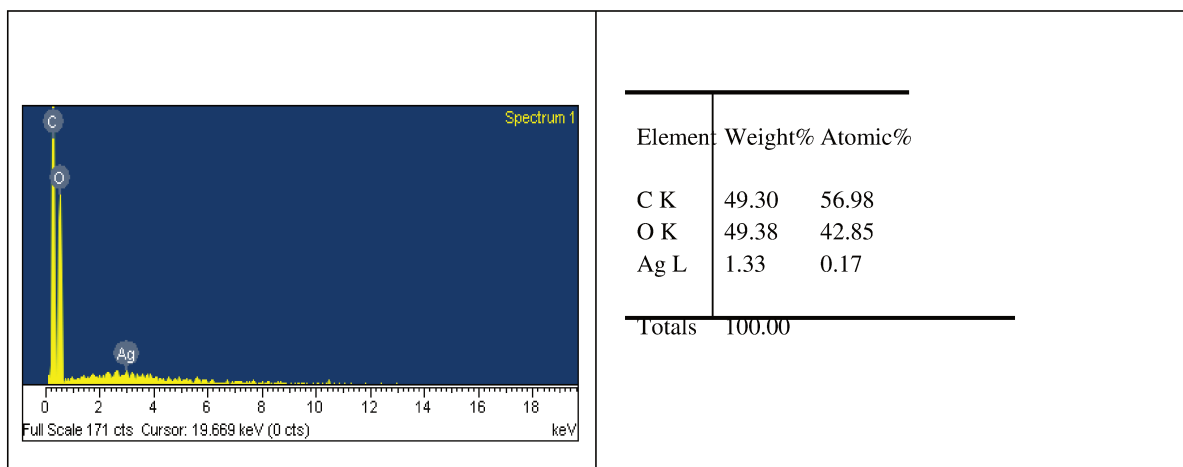


Figura 36. Espectro EDS de Poliéster con NpAg

4.4.8 Preparado de textiles y evaluación de actividad antimicrobiana

En concordancia a los resultados de los ensayos preliminares se establecieron como parámetros de trabajo de la técnica capa por capa los que se resumen en la tabla 7.

Para estandarizar el ensayo se construyó un sistema de 4 marcos de teflón de 10 x 10 cm, donde se coloca el textil para que quede estirado. El marco se sumerge en una serie de bateas donde se colocan las distintas soluciones de trabajo. Se tomaron dos textiles distintos para evaluar la metodología de depósito de plata, algodón y poliéster.

Tabla 7. Condiciones de preparación de muestras

Condiciones de trabajo	
Polímeros	PAH/PAA
Reductor	Borohidruro de sodio (NaBH ₄)
Tiempos	Polímeros: 15 min Lavados: 15 min AgNO ₃ : 24 h NaBH ₄ : 4 h
Número de bicapas de polímeros	2

Los textiles utilizados como soportes fueron donados por distintas fábricas de la ciudad de Santa Fe y Buenos Aires. Se prepararon muestras de algodón y poliéster con 2 bicapas poliméricas alternadas (PAH / PAA), por inmersión de la tela un tiempo de 15 minutos en cada polímero y lavados intermedios de 15 minutos en agua destilada. Luego se sumergieron en AgNO₃ durante 24 horas y fueron reducidas con NaBH₄ con un tiempo de inmersión de 4 horas. Cada una de las telas fue digerida para realizar la cuantificación de plata por absorción atómica. Se realizaron 6 réplicas y cada una fue cuantificada por triplicado. El contenido de plata promedio de 6 réplicas para algodón fue (64 ± 2) mg Ag/ 100 g tela (tabla 8) y para poliéster fue (25 ± 5) mg Ag/ 100 g tela (tabla 9).

Tabla 8. Ensayo de repetibilidad en algodón.

ALGODÓN		
Réplicas (N°)	Promedio (mg Ag / 100 g tela) (n = 5)	SD
1	53	5
2	58	5
3	76	9
4	74	6
5	69	7
6	55	5

Tabla 9. Ensayo de repetibilidad en poliéster.

POLIÉSTER		
Réplicas (N°)	Promedio (mg Ag / 100 g tela) (n = 5)	SD
1	28	2
2	27	13
3	23	6
4	31	6
5	17	1
6	25	1

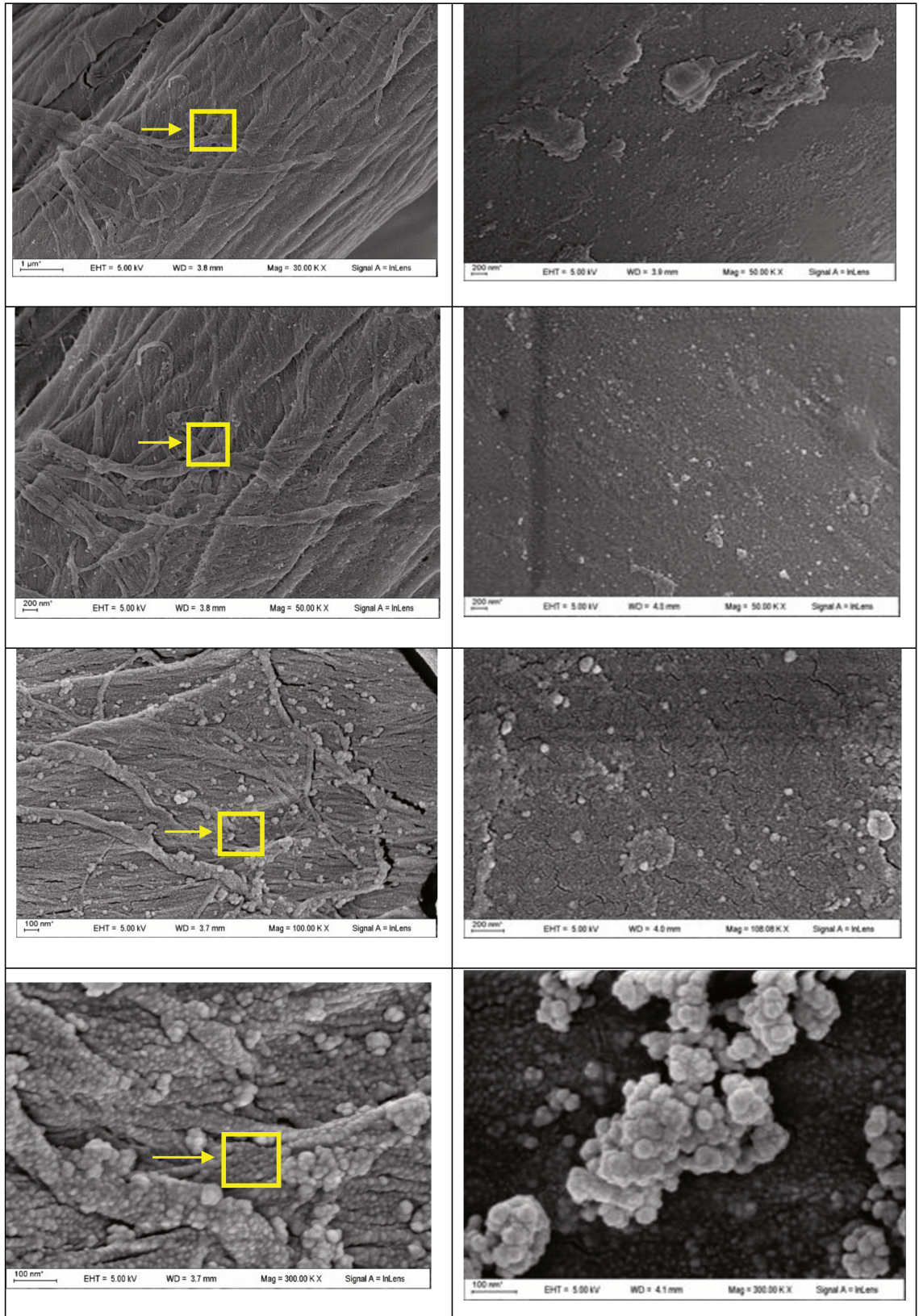


Figura 37. Imágenes SEM de fibras de algodón (izquierda) y poliéster (derecha) con nanopartículas de plata (NpAg).

El tamaño de las partículas formadas y su distribución sobre la superficie de las fibras fue caracterizado por microscopía electrónica de barrido (SEM) figura 37. El tamaño promedio de las partículas formadas está entre 30 y 80 nm.

En la figura 38 se grafican los valores de las tablas 7 y 8 con el objetivo sólo de comparar cómo se comportan dos textiles de distinta composición frente a las mismas condiciones de producción.

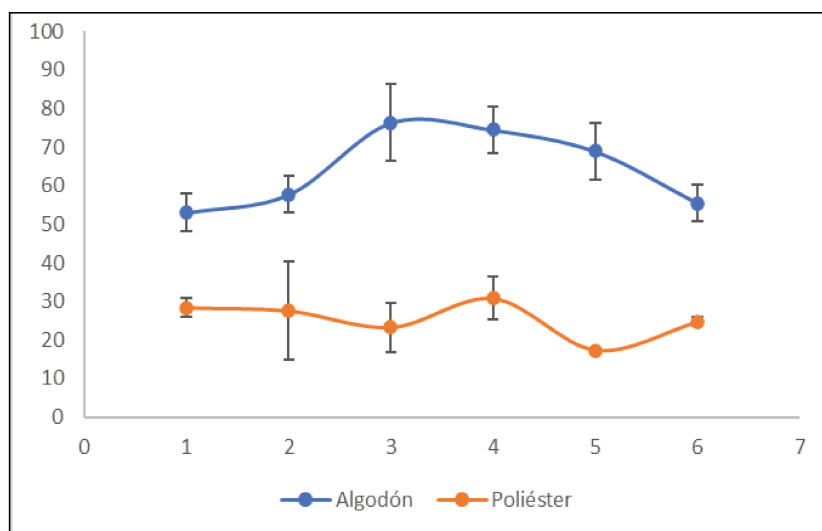


Figura 38. Repetibilidad del ensayo de depósito de nanopartículas de plata en algodón y poliéster.

De los valores de la gráfica se desprende, que, bajo las condiciones establecidas de producción de los textiles en cuanto a tiempos de inmersión, número de capas etc., en el algodón se obtienen cantidades de nanopartículas de plata, mayores que para el poliéster. Esto podría deberse a la química de cada una de las fibras. Ya que como se expuso anteriormente, el algodón es hidrofílico, mientras que el poliéster es hidrofóbico, por lo que esto genera alguna diferencia en la deposición de los polímeros, como de la plata.

4.4.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana por un método por contacto (JIS Z2801)

Como el objetivo del trabajo fue generar textiles con actividad antimicrobiana, se realizó una evaluación de la acción antimicrobiana en el tiempo, aplicando una norma internacional, ya explicada en la parte experimental. Es una prueba de contacto de la superficie impregnada con antimicrobiano, con la bacteria a evaluar. En este caso se utilizaron dos bacterias de referencia, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* como Gram negativa y Gram positiva respectivamente. Y las muestras de tela de algodón y poliéster evaluadas en el apartado anterior. Las siguientes gráficas (39, 40, 41 y 42) muestran los resultados de los ensayos.

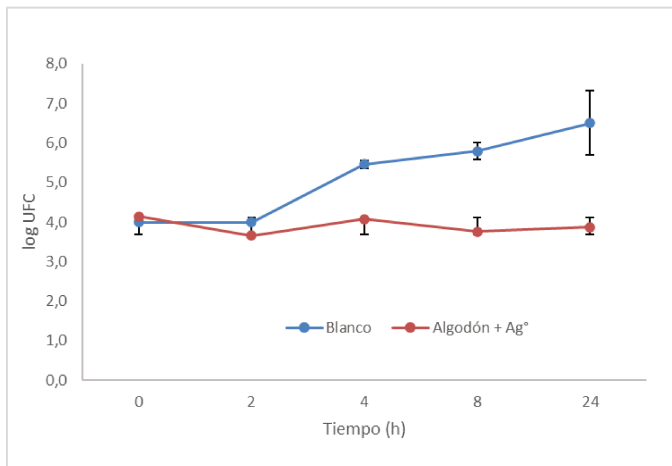


Figura 39. Algodón – *Staphylococcus aureus*

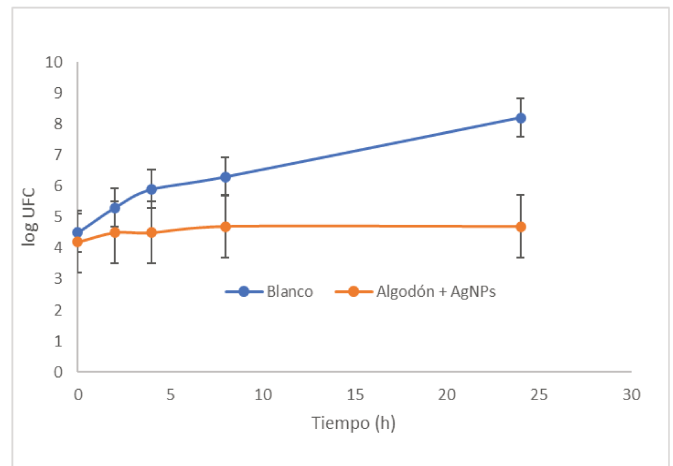


Figura 40. Algodón – *Escherichia coli*

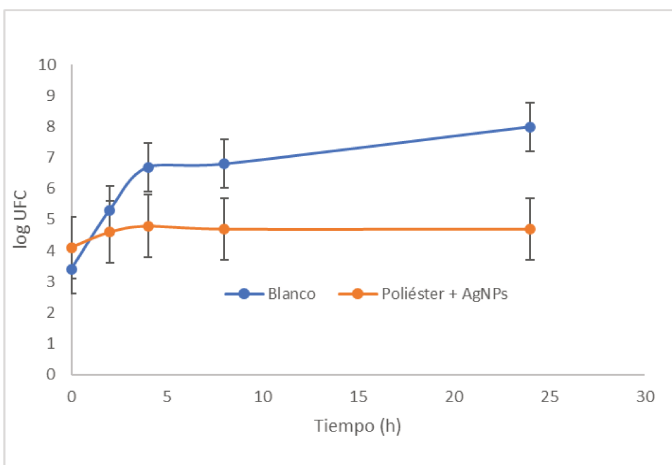


Figura 41. Poliester – *Staphylococcus aureus*

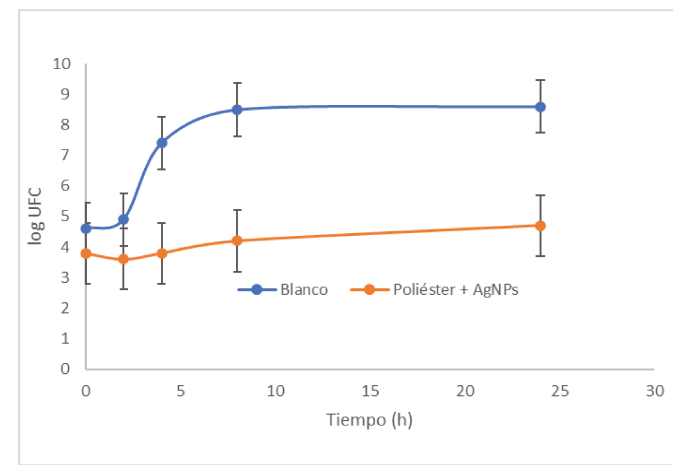


Figura 42. Poliéster – *Escherichia coli*

De los resultados podemos concluir que tanto las muestras de algodón como las de poliéster, lograron inhibir el desarrollo bacteriano. A lo largo del tiempo, sobre todos los blancos el crecimiento bacteriano aumentó, mientras que las telas impregnadas con nanopartículas de plata mantuvieron crecimientos constantes o mostraron un leve aumento del mismo.

4.4.10 Ensayo de lavado. Evaluación de la pérdida de plata en el agua.

Para ver la eficiencia de anclaje de las nanopartículas en la red polimérica es necesario realizar ensayos de lavado para corroborar que no se desprenda la plata y se generen residuos en el agua. El procedimiento de lavado se realizó según lo descrito en la parte experimental, realizando 6 réplicas por cada muestra de algodón y poliéster, preparadas de igual forma que en los apartados anteriores.

Se cuantificó la plata en la tela antes y después del lavado y en el agua después del lavado, por absorción atómica. Tanto el poliéster como el algodón, cuando son sometidos a un proceso de lavado durante 1 hora, pierden en promedio entre un 11 y un 15 % del contenido de la plata (tabla 10).

Tabla 10. Ensayo de lavado. Cuantificación de Ag⁺

	Tela sin lavar (mg Ag ⁺ / 100 g)	Tela lavada 1 lavado de 1 hora (mg Ag ⁺ / 100 g)	Agua de lavado (mg Ag ⁺ / 100 mL)	% pérdida
Algodón (n = 5)	52 ± 8	46 ± 10	7 ± 4	11
Poliéster (n = 5)	23 ± 4	20 ± 6	4 ± 2	15

El desafío aquí es mejorar la adherencia de las nanopartículas a las fibras, evaluando otro tipo de polímeros o depositando más capas poliméricas. Cualquier paso adicional, agregaría valor a los productos, por lo que habría que evaluar el costo / beneficio de la producción de ese tipo de fibras. Así como también evaluar la utilidad y aplicación.

4.5 Conclusiones

El proceso capa por capa resultó satisfactorio en la producción de redes poliméricas en la superficie de textiles para poder anclar las nanopartículas. Se prepararon muestras de algodón y poliéster con 2 bicapas poliméricas alternadas (PAH / PAA), por inmersión de la tela un tiempo de 15 minutos en cada polímero y lavados intermedios de 15 minutos en agua destilada. Luego se sumergieron en AgNO₃ durante 24 horas y fueron reducidas con NaBH₄ con un tiempo de inmersión de 4 horas. Con la caracterización de las telas se observó que se producen nanopartículas de plata de tamaño nanométrico entre 50 y 100 nm, y que su actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, es buena. El único punto desfavorable de la técnica, comparada con otras, para la producción de textiles, es el costo y el tiempo. El número de capas de polímeros que se requieren, antes de generar las nanopartículas de plata *in situ*, hacen que el proceso alargue su tiempo de producción con el adicional de tener que contar con instalaciones diferentes a las normalmente utilizadas en la industria textil. Esto significa que se debe realizar una inversión importante en maquinarias para nada económicas, dentro del proceso productivo. Comparada con otras técnicas de depósito, esta tecnología para producir es mucho más costosa.

5 DESARROLLO DE UNA PINTURA ANTIMICROBIANA FORMULADA CON NANOPARTÍCULAS DE PLATA

5.1 Introducción

La mayoría de los productos susceptibles de biodegradación, como las pinturas, tienen que estar debidamente conservados para preservarlos de su deterioro microbiológico y prolongar su vida comercial en el envase original. Los microorganismos que se aíslan habitualmente en medios como las pinturas pueden ser tanto bacterias como hongos y levaduras. Cuando los microorganismos penetran en un envase de pintura con un nivel de conservación inadecuado o insuficiente, pueden multiplicarse en gran número y afectar las propiedades del producto por diversos mecanismos:

- Formación de mohos sobre los productos.
- Separación de fases en las emulsiones.
- Variaciones en la viscosidad.
- Cambios en la imagen visual del producto.
- Cambios significativos respecto del olor usualmente asociado a una pintura, que, en un rango de niveles desagradables para el consumidor, puede ir desde un olor a rancio hasta la putrefacción.
- Fermentaciones con la consiguiente generación de gases que provocan hinchamiento en los envases herméticos.

Por esta razón en la formulación de pinturas se incorporan conservantes, que son sustancias o compuestos químicos con efecto antimicrobiano que tienen por misión retrasar o impedir las transformaciones perjudiciales causadas por los microorganismos en los productos. Como estos conservantes forman parte del producto preparado, se requiere un estudio detallado de las propiedades del agente conservante tanto en relación con el producto que tiene que preservar, al envase que lo va a contener y al tipo de pintura (base acuosa, base orgánica, bi-componente, etc.) como respecto de los posibles riesgos para el aplicador y el usuario que se puedan derivar del contacto con estos conservantes (irritaciones, alergias, etc.).

El efecto de los agentes conservantes dependerá de su naturaleza química y de la dosis empleada y puede clasificarse en dos categorías:

- Efecto bacteriostático / fungistático: daña reversiblemente a los microorganismos, los cuales quedan con vida, pero no pueden reproducirse, a menos que vuelvan a disponer de un nuevo ambiente idóneo.
- Efecto bactericida / fungicida: daña irreversiblemente a los microorganismos (muerte celular).

Por su parte, los mecanismos de acción de los sistemas antimicrobianos incluyen:

- Hidrólisis e interferencia en el metabolismo general.
- Oxidación / reducción de ciertos componentes protoplasmáticos.
- Modificación de la permeabilidad de las membranas.
- Acción sobre el sistema enzimático.

Un sistema de conservación eficaz debe cumplir una serie de requisitos esenciales:

- ✓ Efectividad frente a una gran gama de microorganismos (amplio espectro).
- ✓ Compatibilidad con otros componentes activos y con las materias primas básicas de la formulación de la pintura

- ✓ Estabilidad frente al calor y al almacenamiento prolongado.
- ✓ Minimización (o preferiblemente ausencia) de efectos tóxicos, irritantes o sensibilizantes en las concentraciones utilizadas.
- ✓ Activo en bajas concentraciones.
- ✓ No volátil.
- ✓ Capaz de retener su efecto en un intervalo amplio de pH.
- ✓ Sin olor o color que puedan interferir en las características del producto.
- ✓ Facilidad para su uso y manipulación.
- ✓ Bajo costo.

Se puede decir que probablemente no haya en el mercado ningún conservante que cumpla todos estos requisitos, por lo que usualmente habrá que encontrar una solución de compromiso para balancear ventajas y desventajas. Los sistemas conservantes convencionales pueden clasificarse según su modo de acción en:

- *Conservantes de amplio espectro (bacterias, hongos y levaduras):* Nitrodioxanos, clorobutanol, cloruros de polihexametilenbiguanida, ácido dehidroacético, formaldehído, isotiazolinonas, xilenoles, oxazolidinas, ácido salicílico, fenilmercurios, glutaraldehído, derivados undecilénicos, etc.
- *Conservantes que, aun siendo de amplio espectro, son más efectivos contra bacterias:* Nitropropanodiolos, clorhexidinas, azoniadamantanos, imidazolidinilureas, hidantoinas, fenoxietanol, etc.
- *Conservantes que, aun siendo de amplio espectro, son más efectivos frente a hongos:* Parabenos, alcoholes diclorobencílicos, sorbato potásico, benzoato sódico, óxido de piridinetiol, etc.

Tanto esta clasificación como el hecho que cada material actúe por un mecanismo diferente, ponen en evidencia la necesidad de recurrir a sistemas complejos formados por asociaciones de distintos conservantes convencionales cuando se pretende incrementar el espectro de actividad y controlar problemas de toxicidad o insolubilidad mediante el empleo de concentraciones más bajas de cada uno de los compuestos individuales.

Las isotiazolinonas, por ejemplo, se combinan con derivados halogenados para lograr una protección en estado húmedo (es decir en el envase, no en la película seca) contra bacterias y hongos y su acción es efectiva en un rango de pH de 3,5 a 10,5. [51] Entre las ventajas de los productos halogenados (Bronopol [52] y mezclas) se puede mencionar la excelente actividad bactericida, particularmente efectiva frente a *Pseudomonas*. Pero la misma se contrasta con la pobre actividad fungicida, baja estabilidad por encima de pH 8, asociada con la formación de nitrosaminas. Otro proveedor [53] ofrece una serie de productos con el nombre comercial genérico ACTICIDE® (seguido de siglas como EP o DW que indican características específicas), que consisten básicamente en combinaciones de carbamatos de benzimidazol y algún derivado de la urea para proteger recubrimientos orgánicos del crecimiento superficial de algas y hongos. Entre las características de este tipo de mezclas se mencionan su solubilidad en agua (que puede llevar a su pérdida progresiva de eficiencia cuando el recubrimiento está sujeto, por ejemplo, a lavados habituales e intensivos como los que se llevan a cabo con desinfectantes en salas de hospitales, ambientes en los que se manipulan alimentos y similares), una buena actividad antibacteriana y un rango de actividad en pH de 4 a 9. Entre las desventajas se cuentan una actividad antifúngica baja, la liberación de formaldehído, el costo relativamente alto y la pobre estabilidad al calor (parámetro este último que obviamente no afecta a un nanometal). Basta con estos ejemplos (está fuera del alcance de este trabajo un relevamiento exhaustivo de todos los biocidas comerciales) para mostrar tanto que los productos

convencionales requieren usualmente de mezclas y combinaciones en las que un componente puede paliar las insuficiencias de otro, como que cada ventaja siempre está acompañada de alguna desventaja.

En el caso particular de las nanopartículas de plata, sin embargo, se consiguen prácticamente todas las características mencionadas como esenciales (incluyendo, a pesar de su color negro producido por oxidación por el oxígeno del aire, en altas concentraciones, la no afectación del color debido a las bajas concentraciones requeridas), excepto la del bajo costo. Por lo tanto, en pinturas formuladas a base de nanopartículas de plata el concepto “bajo costo” deberá reemplazarse por el de “costo apropiado al objetivo del producto” orientado al nicho de pinturas especiales.

Se recuerda que la capacidad antimicrobiana incorporada en la formulación de pinturas convencionales a la que se ha hecho referencia hasta aquí no cumple ningún rol en la forma final en que el producto es utilizado, es decir la película seca de recubrimiento protector aplicado sobre distintos tipos de sustratos. En la práctica, la única función antimicrobiana que ofrecen algunas pinturas tradicionales es la focalizada en el combate contra hongos y mohos, usualmente basada en compuestos fungicidas con una vida útil relativamente limitada (requiriendo así una renovación periódica del recubrimiento orgánico) que son liberados gradualmente al medio ambiente y en la eventualidad de contacto con la dermis o de inhalación, pueden provocar alergias u otros efectos indeseados.

Por todo lo expuesto, resulta deseable disponer de una pintura multifuncional, que permita tanto prevenir el deterioro en el envase, como otorgarle a la película seca, una vez aplicado el producto, capacidad fungicida de vida útil prolongada, más capacidad biocida de amplio espectro (microorganismos Gram positivos y Gram negativos), incluyendo virus y patógenos resistentes a los antibióticos convencionales, como los que generan infecciones intrahospitalarias y todo esto minimizando potenciales efectos nocivos sobre las personas.

Por lo tanto, en este trabajo se focalizo el desarrollo en recubrimientos orgánicos de base acuosa en lugar de pinturas a base de solventes por ser ésta una tendencia del mercado, originada por la cada vez mayor demanda de los consumidores y usuarios respecto de minimizar impactos ambientales y maximizar la sustentabilidad y salubridad en todo tipo de producto. La plata en tamaño nanométrico resulta multifuncional en sus efectos microbicidas, de larga vida útil en la película seca y con efectos adversos prácticamente nulos sobre tejidos multicelulares, como la piel y las mucosas.

No resulto fácil el desafío, sin embargo, se estuvo en condiciones de mostrar que fueron cumplidos estos estrictos requisitos mediante la formulación de las nanopartículas de plata en diversos vehículos de base acuosa.

5.2 Objetivos

Formular un recubrimiento polimérico de base acuosa, con acción antimicrobiana mediada por nanopartículas de plata, que pueda ser utilizado tanto en ambientes asépticos (hospitales, farmacéuticos) como en lugares domésticos.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata

La síntesis de nanopartículas de plata coloidales fue descrita en el capítulo I.

5.3.2 Formulación de las pinturas

Las muestras de pintura fueron preparadas por simple mezclado de las nanopartículas coloidales con la pintura acrílica de interior utilizada como base. Las diferentes formulaciones fueron catalogadas con una nomenclatura correspondiente a las variaciones de composición e identificadas como:

A: pintura base + 50 ppm nanopartículas de plata

B: pintura base + 250 ppm nanopartículas de plata

C: pintura base + 500 ppm nanopartículas de plata

El blanco fue constituido por la pintura base sin adición de nanopartículas. Junto con las muestras se evaluó una pintura comercial de la marca IPEL, cuya etiqueta mencionaba concentraciones de 0,25% bactericida, 0,25% fungicida y 0,20 % alguicida.

5.3.3 Ensayos antifúngicos de las pinturas. ASTM D 3273-76

La evaluación antifúngica de las pinturas se realizó siguiendo una norma internacional de control de calidad de pinturas, con el fin de obtener resultados comparables con otras fuentes. Se decidió llevar a cabo el estudio de la capacidad fungicida siguiendo los lineamientos de la norma de amplio uso en el sector, la ASTM D 3273-76: “Resistencia al crecimiento de mohos en la superficie de recubrimientos interiores en una cámara ambiental”.

Esta norma describe una pequeña cámara ambiental (también denominada “cámara tropical”) y las condiciones de operación de esta que permiten evaluar de manera sistemática y reproducible la resistencia de un film de pintura al crecimiento de hongos que puede ocurrir en su superficie. La duración del ensayo propiamente dicho es de cuatro (4) semanas y el ambiente interior, muy severo en cuanto a la proliferación de hongos, permite inferir comportamientos a mediano plazo de las pinturas ensayadas.

Para garantizar resultados confiables, la temperatura y la humedad deben ser efectivamente controladas dentro de los límites relativamente estrechos especificados para el funcionamiento reproducible de la cámara. La velocidad y severidad de crecimiento del moho en el film es una función del contenido de humedad tanto del film como del sustrato. Consecuentemente se necesita una humedad relativa del 95 - 98 % para que los paneles puedan desarrollar rápidamente y mantener el nivel de humedad adecuada para sostener el crecimiento de los hongos.

A fin de implementar este ensayo, se construyó y puso en marcha una cámara ambiental de acuerdo con las especificaciones dimensionales y operativas especificadas por la norma de referencia. Se describen a continuación las principales características del equipo.

La *cámara ambiental* debe ser capaz de mantener una humedad relativa de 95 - 98 % a una temperatura de $32,5 \pm 1$ °C mientras se promueve una inoculación continua con las esporas de los mohos sobre la superficie de los paneles expuestos. El equipo debe mantenerse en una habitación a temperatura controlada (21-24 °C), de manera que la pérdida de calor desde el gabinete resulte suficiente para conseguir efectivamente una humedad relativa del 95 - 98 % a la temperatura del ensayo.

La cámara consiste en un gabinete de tamaño apropiado para contener aproximadamente veinticinco (25) paneles de ensayo rectangulares, de 75 x 100 mm de lado, bajo las condiciones mencionadas y consta de las siguientes partes:

- **Tanque de polipropileno**, con un reborde y una tapa inclinada con lados rectos, construida en acrílico, de manera que la humedad de condensación caiga por los costados y sea recirculada en vez de gotear sobre los paneles.
- **Elemento calefactor** de potencia regulable por un controlador, instalado en la parte inferior de la cámara mediante una conexión hecha a través de la pared posterior. Está ubicado de tal forma que quede sumergido cuando haya aproximadamente 50 - 75 mm de agua en la parte inferior de la cámara.
- **Termostato** regulado a 32,5 °C en la zona de la cámara correspondiente a los paneles de ensayo, para regular el suministro de calor, actuando sobre el elemento calefactor del agua a través del controlador.
- **Bandeja plástica**, aproximadamente 25 mm más pequeña que las dimensiones internas de la cámara y alrededor de 50 mm de profundidad, con el fondo formado por una malla resistente a la corrosión. La bandeja está sostenida aproximadamente 25 mm por encima del nivel del agua y centrada en la cámara y, para sostener la tierra, tiene un film delgado de polietileno sobre la malla.
- **Ventilador pequeño**, montado en la pared posterior justo por encima del lecho de tierra en la bandeja y perpendicular al mismo, que permite uniformar la dispersión y circulación de las esporas del moho en el interior de la cámara, de manera de conseguir una inoculación continua de las superficies de los paneles pintados.
- Serie de **barras de madera**, suspendidas a través del ancho de la cámara a una altura y con un espaciado que permiten colgar verticalmente los paneles de ensayo de 70 x 100 mm, los que deben quedar suspendidos, mediante un método apropiado de sujeción, aproximadamente 75 mm por encima de la tierra inoculada con esporas.
- **Psicrómetro**, para medir la humedad relativa en el área de ensayo.



Figura 43. Cámara tropical construida para realizar los ensayos de evaluación antifúngica.

La metodología de trabajo, así como los materiales empleados se ajustaron de la manera más estricta posible a los lineamientos fijados por la normativa de referencia.

Se utilizó tierra calidad invernadero, apropiada para propagación de plantas, conteniendo 25 % de abono. Se midió el pH de la tierra para garantizar que estuviese entre los límites fijados por la norma (entre 5,5 y 7,6) y se colocó la tierra en la bandeja no permitiendo que la misma se compactase. Sobre este sustrato se sembraron *Aspergillus niger* y otras especies de hongos ambientales de recolección local y representativos de distintos ambientes (domésticos, oficinas, etc.).

Para la confección de los paneles se utilizaron maderas de pino (*Pinus elliottii*), lo más similar posible a la sugerida por la norma (*Pinus ponderosa sapwood*). Se verificó que la madera estuviese libre de resinas excesivas, nudos, anillos de crecimiento u otras anomalías y presentase superficies suaves.

Luego de cortadas, las maderas se secaron en estufa a 45°C para evitar una contaminación por los hongos propios de la putrefacción de la madera y cualquier otra eventual fuente de contaminación diferente de los hongos que serían inoculados en la cámara.

Los paneles se prepararon por triplicado, aplicando dos capas del recubrimiento a evaluar a ambas caras y en todos los bordes de las muestras. El espesor por capa de pintura se estima correspondiente a un rendimiento del orden de 11 m²/l. Se dejó un (1) día de secado entre la aplicación de la primera y la segunda mano. Una vez recubiertos, los paneles fueron acondicionados a una temperatura de 23 ± 2 °C en un ambiente con humedad relativa controlada a 50 ± 10 %. Este acondicionamiento se mantuvo durante cuatro (4) días posteriores a la aplicación de la última capa y antes de colocar las muestras en la cámara para comenzar la exposición ambiental.

Los parámetros y condiciones más importantes del ensayo se describen a continuación:

- Se colocó la turba en la bandeja del gabinete y se agregó agua en la cubeta hasta la profundidad especificada por norma.
- Se equilibró el gabinete durante 24 horas antes de inocular la tierra con la suspensión de hongos específica.
- Para preparar esta suspensión de hongos, se usó un cultivo de 10 - 14 días, mediante el siguiente procedimiento: se agrega una gota de un detergente no iónico al 25% (m/v) a 95-100 mL de agua destilada estéril y se agita. Se pipetea 5 mL de la solución en el cultivo de hongos, raspando la superficie del cultivo con un hisopo estéril para remover todas las esporas y micelios posibles sin levantar la superficie del agar. Se vierte el agua del cultivo raspado en la mezcla de

agua destilada/detergente para diluir. Se agita vigorosamente durante 15 a 20 minutos. Se utiliza una pipeta para distribuir la suspensión de hongos uniformemente sobre la superficie de la tierra en la bandeja del gabinete.

- Se dejó el gabinete en operación continua durante dos (2) semanas para que el moho esporule y se equilibre con el medio ambiente antes de comenzar el ensayo. No es necesario recontaminar continuamente la cámara con los paneles después de que una cantidad suficiente de microorganismos hayan crecido en el suelo, siempre que la cámara se mantenga en operación continua.
- La viabilidad del crecimiento del moho en el gabinete fue verificada colocando placas abiertas y cara arriba con agar extracto de malta / agar dextrosa de papa, distribuidas en diferentes lugares. Después de 1 hora, se cubren las placas y se incuban a $32,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 3 días. Se comprobó un crecimiento satisfactorio de los hongos.
- Una vez completada la fase inicial de acondicionamiento, se procedió a la exposición de las muestras, colocando los paneles en forma vertical con el extremo inferior a aproximadamente 76 mm por encima de la tierra inoculada y con suficiente espacio para permitir la circulación de aire y para prevenir el contacto entre paneles o con las superficies de las paredes.

5.3.3.1 Muestras procesadas

- La colocación de los paneles se hizo en forma aleatoria en el gabinete, de manera de no sesgar el resultado de las réplicas. A modo de ejemplo se muestra la figura 44, un esquema de distribución de los paneles en la cámara.

	1	2	3	4	5	6
1	A	C		C	A	B
2	<i>Blanco</i>		<i>Blanco</i>		<i>Blanco</i>	
3	C	B	A	B		

Figura 44. Posición relativa de los paneles de ensayo en el interior de la cámara

- Cada una de las pinturas se evaluó por triplicado, usando como soporte muestras rectangulares de madera de pino de 70 x 100 mm. Se incluyeron paneles de control, sin recubrimiento, en todos los ensayos, los cuales consistieron en muestras de madera sin pintar similares a las empleadas como soporte de las distintas formulaciones de recubrimientos.
- El ensayo duró un total de 4 semanas con una preparación previa que consiste en la ambientación de la cámara para lograr las condiciones de temperatura y humedad del ensayo y la inoculación del hongo.

5.3.3.2 Interpretación de resultados

Para la cuantificación, se evaluó el crecimiento de hongos cada semana, durante 4 semanas. Esta determinación cuantitativa se lleva a cabo mediante una escala de 1 a 10 usando los patrones fotográficos incluidos en la norma ASTM D 3274, “*Evaluating degree of surface disfigurement of paint by fungal growth*”.

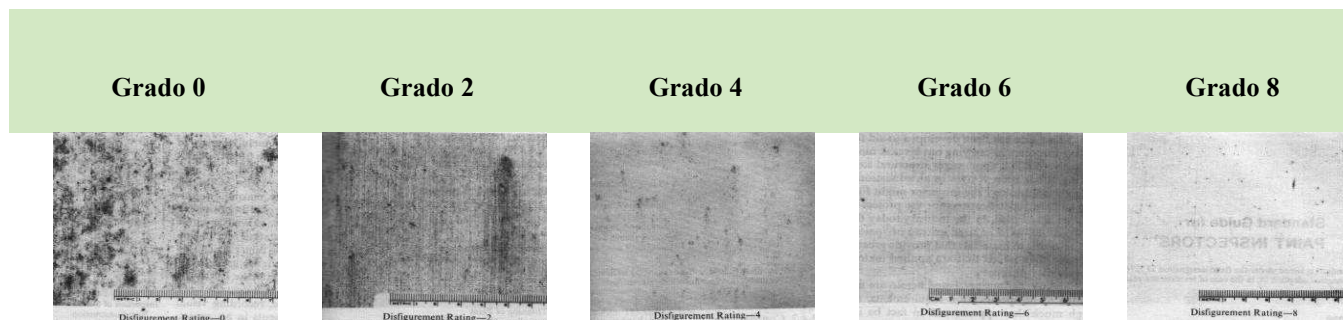


Figura 45. Patrones fotográficos de comparación de crecimiento fúngico en maderas Norma ASTM D 3274

El informe de los resultados, de acuerdo con la norma de referencia, corresponde al final de la cuarta semana de exposición y se detalla como el promedio y el rango de los 3 paneles replicados para cada muestra de pintura. El resultado de cualquier panel que difiriera en más de 2 unidades de crecimiento de los otros dos puede considerarse como fallido y descartarse. En ese caso, se informaría solo el promedio de los 2 paneles restantes. Si todos los paneles en un conjunto de réplicas difieren en más de 2 unidades, todos los resultados deben descartarse y hay que repetir el ensayo.

La resistencia antifúngica de las muestras ensayadas se contrasta por comparación con los patrones fotográficos de norma contra los cuales se cuantifica. Al respecto se resalta que a mayor numeración corresponde mayor resistencia (lo que se refleja en un menor grado de ensuciamiento superficial por crecimiento de hongos).

Utilizando los patrones fotográficos de la norma de referencia, se calculó un promedio de cada triplicado y se obtuvieron los valores que se presentan en la tabla 11 para la resistencia antifúngica de las muestras ensayadas.

5.3.4 Ensayos antibacterianos de las pinturas. JIS Z2801:2000

La evaluación de la eficacia bactericida se lleva a cabo según el método descrito en la norma internacional “JIS Z2801:2000 Antimicrobial products – Test for antimicrobial activity and efficacy”. Esta norma hace referencia específicamente a las películas secas (es decir al recubrimiento ya aplicado sobre un sustrato, no al producto en el envase), complementada con una técnica microbiológica de recuento de microorganismos.

La actividad antibacteriana se mide cuantificando las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias que sobreviven luego de estar en íntimo contacto durante 24 horas a 35 -37 °C, con una superficie que contiene un agente antibacteriano. Y el efecto antibacteriano se mide comparando la cantidad de UFC en un material tratado con las UFC presentes sobre el material no tratado.

En este caso la superficie con el agente antibacteriano corresponde a una película seca que se desprende totalmente del sustrato de manera que en el análisis bacteriológico no exista interferencia con

el mismo y solo se evalúe el recubrimiento propiamente dicho. Para ello, las muestras se realizan pintando dos capas de cada formulación a ensayar sobre cuadrados de vidrio. Al ser aplicada la pintura sobre vidrio la adherencia es muy baja, lo que permite el desprendimiento total del recubrimiento. Además, el material de vidrio puede ser esterilizado sin problemas antes de realizar las muestras, de manera que se eliminan posibles contaminaciones bacterianas no previstas provenientes del sustrato.

El ensayo se llevó a cabo frente a *Staphylococcus aureus*, cepa compatible con ATCC 25923 Gram positiva, y *Escherichia coli*, cepa compatible con ATCC 25922 Gram negativa. Las cepas certificadas fueron obtenidas de la Cátedra de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

El inóculo se preparó a partir de cultivos frescos en agar de los dos microorganismos, generando una suspensión en solución fisiológica de NaCl 0,9% (m/v), en una concentración de 1×10^5 UFC/ml para ambas bacterias.

5.3.4.1 Muestras procesadas

Placas planas de vidrio con dimensiones de 5 x 5 cm fueron pintadas con dos manos de cada una de las pinturas en evaluación, dejando secar en estufa a 40 °C.

A: pintura base + 50 ppm nanopartículas de plata

B: pintura base + 250 ppm nanopartículas de plata

C: pintura base + 500 ppm nanopartículas de plata

D: pintura comercial IPEL 0,25% bactericida, 0,25% fungicida, 0,20 % alguicida.

Por otro lado, el blanco de cultivo se obtuvo inoculando placas de vidrio sin pintar y fue evaluado un blanco de pintura base.

5.3.4.2 Interpretación de resultados

El cálculo de la actividad antimicrobiana que indica la norma JIS utilizada, se hace en base a un triplicado de cada una de las muestras (blanco: sin antimicrobiano, muestra: con antimicrobiano) a los tiempos 0 y 24 h de aplicación del inóculo. La fórmula que se utiliza es:

$$R = (\log (B/A) - \log (C/A)) = \log (B/C)$$

R: valor de la actividad antimicrobiana

A: promedio de UFC de bacteria a tiempo 0 de los blancos (**sin** antimicrobiano)

B: promedio de UFC de bacteria a tiempo 24 h de los blancos (**sin** antimicrobiano)

C: promedio de UFC de bacterias a tiempo 24 h de las muestras (**con** antimicrobiano).

La norma ISO no especifica un valor numérico para determinar la eficacia antimicrobiana. De todas maneras, a modo de guía se pueden usar los criterios que se describen en la tabla 11 y que fueron propuestos por la Paint Research Association (PRA) de Inglaterra, para clasificar los niveles de actividad antibacteriana en términos de los valores calculados por la norma JIS.

Tabla 11. *Criterios de validación de PRA*

Actividad antimicrobiana R	Porcentaje de mortandad	Comentario
< 1,5	< 96,8 %	POBRE
1,5 a 2,0	96,8 a 99,0 %	ACEPTABLE
2,0 a 3,0	>99,0 a 99,9 %	BUENA a MUY BUENA
> 3,0	>99,9%	EXCELENTE

5.3.4.3 Procedimiento

Las muestras preparadas en los soportes de vidrios secas se inocularon con 0,4 mL de cada uno de estos cultivos, por separado, se cubrieron con un polietileno de 4 x 4 cm estéril, e incubaron durante 24 h a 35-37 °C, en condiciones de saturación de humedad. Luego se separó la película polimérica de pintura y se lavó con 10 mL de solución salina NaCl 0,9% (m/v) para recuperar las bacterias de las superficies pintadas.

A continuación, se realizaron diluciones en solución salina y se sembró 1 mL en placas con medio de cultivo para bacterias (agar nutritivo). Estas placas se incubaron a 35-37°C durante 48 horas y al finalizar ese período se llevó a cabo el recuento de UFC (unidades formadoras de colonias) en cada muestra.

5.4 Resultados y Discusión

Las pinturas luego de prepararse se evaluaron durante unos meses para observar si presentaban cambios en la textura y color. Las adicionadas con nanopartículas de plata con el tiempo se vuelven más oscuras, de un color marrón claro, y a veces con tintes negros, lo cual se puede observar en la figura 46, principalmente en la formulación con 500 ppm de NpAg. Esto no afectaría en absoluto la actividad antimicrobiana, pero si pudiera afectar la estética de la pintura, en particular después de su aplicación y con el paso del tiempo.

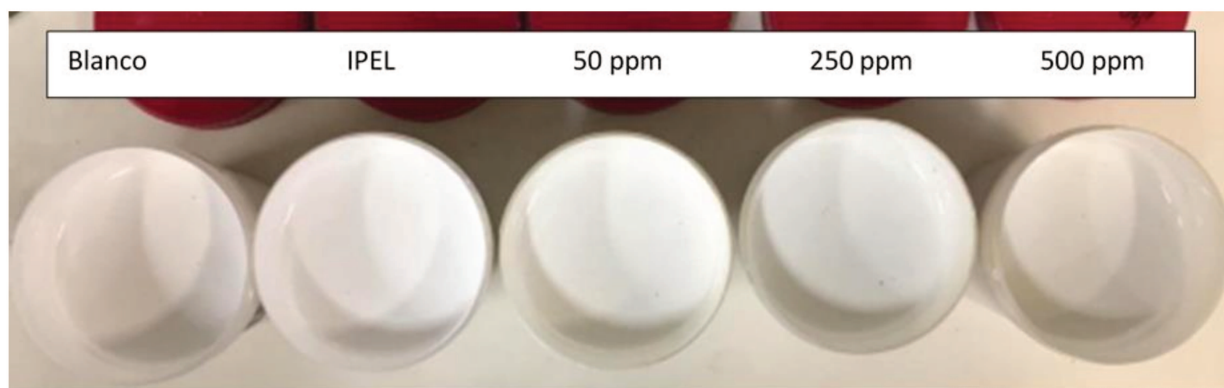


Figura 46. Muestras de pintura preparadas







Utilizando los patrones fotográficos de la norma de referencia, se calculó un promedio de cada triplicado y se obtuvieron los valores que se presentan en la tabla para la resistencia antifúngica de las muestras ensayadas.

En la tabla 12 se muestra una foto de los triplicados para cada muestra, las mismas fueron comparadas con los patrones de referencia presentes en la norma de ensayo, a partir del cual se llegó al valor ASTM para cada muestra.

En términos generales y para todas las series, el ensayo presentó un buen rendimiento operacional, quedando demostrado por la alta repetitividad de los resultados entre los triplicados. De acuerdo con lo observado se puede inferir, que las muestras con mayor contenido de nanopartículas B y C ofrecen una buena resistencia al crecimiento de hongos, ya que los valores ASTM rondaron entre 3 y 4 mayormente, lo que significa que la inhibición del ataque fúngico es buena comparada con la ausencia de agente biocida. Estos resultados indican que las pinturas preparadas y sus formulaciones (o sea sus contenidos en nanopartículas), tienen una performance equiparable o mejor a una pintura comercial, como la muestra elaborada por IPEL (D). Ya que la capacidad antifúngica se relaciona con el contenido de nanopartículas de plata, para lograr una optimización con fines industriales / comerciales, se debería realizar un ulterior ajuste técnico / económico en la preparación de la formulación, por lo tanto, se debería balancear el efecto antifúngico con respecto a la dosificación del biocida, garantizando un compromiso entre costos y rendimientos con respecto a las formulaciones comerciales tales como la IPEL

Las series experimentales también permitieron descartar formulaciones de baja efectividad, como las de las muestras A, con bajo contenido de nanopartículas que no presentó una buena inhibición del crecimiento fúngico con una capacidad fungicida prácticamente nula representada por los valores ASTM de 1, es decir igual que el blanco sin antimicrobiano.

Tabla 12. Resultados de actividad antifúngica de las pinturas

Muestra	Concentración NpAg (ppm)	Valor ASTM (28 días) (n = 3)	Fotografía de ensayo
Blanco	Madera sin pintar	0	
Blanco pintura	0	1 ± 1	
A	50	1 ± 1	
B	250	3 ± 1	
C	500	4 ± 1	
D Pintura comercial	0,25% bactericida 0,25% fungicida 0,20 % alguicida	2 ± 1	

El desarrollo de recubrimientos antibacterianos podría ser una ruta prometedora para posibles aplicaciones principalmente en ambientes hospitalarios donde se requiere de una determinada asepsia para evitar la circulación de microorganismos y prevenir infecciones intrahospitalarias. La evaluación de la actividad frente a bacterias de las pinturas formuladas se resume en la tabla 13A y 13B.

Tabla 13. Resultados evaluación antibacteriana de pinturas frente a *Staphylococcus aureus* (SA) y *Escherichia coli*.(EC)

	Muestra	UFC 48 h	R	Eficiencia
SA	Blanco	$3,5 \times 10^5$	--	--
	Blanco pintura	$1,1 \times 10^5$	0,502	70%
	A	$7,0 \times 10^4$	0,699	80%
	B	$6,6 \times 10^4$	0,724	81%
	C	$4,6 \times 10^4$	0,881	87%
	D	$6,2 \times 10^4$	0,752	82%

	Muestra	UFC 48 h	R	Eficiencia
EC	Blanco	$3,7 \times 10^5$	--	--
	Blanco pintura	$1,2 \times 10^5$	0,632	67%
	A	$5,4 \times 10^4$	0,836	85%
	B	$2,4 \times 10^4$	1,188	93%
	C	$8,0 \times 10^3$	1,665	98%
	D	$8,0 \times 10^3$	1,665	98%

En base a los resultados obtenidos se pudo observar que las muestras presentan inhibición al crecimiento bacteriano, pese a que bajo el criterio de validación de PRA, presentan una actividad antimicrobiana de aceptable a pobre. Las de mejor comportamiento son la pintura comercial de IPEL, cuyos componentes activos se conocen las proporciones, pero se desconocen los compuestos, y la pintura formulada con nanopartículas de plata de concentración 500 ppm. Las dos tienen una actividad aceptable.

Las formulaciones preparadas con nanopartículas pueden mejorar su comportamiento agregando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO). Hemos visto en otros ensayos (que escapan del tema de esta tesis) que, formulando las pinturas con plata y óxido de zinc en la conformación de nanopartículas, la actividad antimicrobiana mejora notablemente. El agregado de estas nanopartículas tiene la ventaja de tener menor costo, a la vez que un buen comportamiento antimicrobiano.

5.5 Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos se puede concluir que se cumplió con el objetivo planteado, de evaluar y cuantificar la acción fungicida de la nanoplata formulada en pinturas de base acuosa. Se pudo observar que la nanoplata actúa como inhibidor del crecimiento de hongos ambientales bajo condiciones extremas de temperatura y humedad, convirtiéndolo en un interesante ingrediente en la formulación de pinturas antifúngicas, obteniéndose un comportamiento similar o mejor que el de pinturas comerciales locales, formuladas con distintos agentes biocidas.

Los resultados obtenidos son promisorios, debido a que se logró inhibir efectivamente el crecimiento de bacterias y hongos. Los ensayos biológicos que involucran organismos vivos tienen un rango de error bastante grande, debido a que no se pueden controlar todos los factores presentes en el crecimiento de un organismo, por lo tanto, todos estos resultados deben ser verificados con nuevas

pruebas, optimizando la metodología para evitar contaminación en cualquiera de sus puntos, y comparando con otro tipo de ensayos para minimizar dichos errores y comprobar la verdadera actividad de los biocidas. Además, se planea extender estas validaciones a otros organismos patógenos resistentes a antibióticos convencionales para disponer de datos propios al respecto y compararlos con la eficacia que se atribuye en la bibliografía a la nanoplata como bactericida de amplio espectro.

Si tuviéramos que resaltar la combinación de novedad y ventajas que conforman la innovación postulada, entendida como conocimiento del estado del arte (tener en cuenta que la nanotecnología es la más joven de las disciplinas científicas, nacida recién en las décadas finales del siglo XX) que se materializa en un producto, podríamos mencionar los siguientes aspectos principales del producto desarrollado:

- ✓ La pintura es de base acuosa por lo cual, al mismo tiempo que se minimiza su impacto ambiental, se mejora la salubridad en el ambiente de trabajo al no haber emisión de vapores orgánicos volátiles
- ✓ Disponemos de conocimiento propio para la síntesis de nanopartículas de plata con distintas características (morfología y rango de tamaños), que es el insumo diferencial y esencial de la innovación propuesta
- ✓ La plata es un antimicrobiano de amplio espectro (virus, bacterias, hongos, microalgas) y multifuncional: actúa como preservador en el envase y como bactericida – fungicida en el recubrimiento aplicado sobre un sustrato (película seca)
- ✓ El atrapamiento físico de las nanopartículas de plata en la matriz polimérica evita su emisión al medio cuando el recubrimiento está sujeto a lavados, lluvia y similares
- ✓ Las características hipoalérgicas de estas nanopartículas permiten asegurar la salubridad para pintores y usuarios
- ✓ La capacidad antimicrobiana frente a organismos patógenos resistentes a antibióticos convencionales mejora la salubridad y la seguridad operativa en ambientes de alto riesgo, como salas de cirugía, de terapia intensiva, de internación y similares, que siempre están expuestos al riesgo de infecciones intrahospitalarias de difícil control
- ✓ Por el mecanismo múltiple de acción que muestra la nanoplata, según se ha fundamentado con la amplia revisión bibliográfica, los microorganismos no pueden desarrollar resistencia por mutación como lo hacen con antibióticos convencionales lo que potencia la eficacia del producto
- ✓ Según lo han demostrado múltiples investigadores en forma científica (y lo ha confirmado en forma práctica el empleo de plata como desinfectante, que se origina ya en el Imperio Romano y que lleva más de un siglo acompañando a la medicina moderna), por su mecanismo de acción la nanoplata no afecta tejidos multicelulares como la piel y las mucosas
- ✓ La nanoplata, por su gran superficie específica (que en partículas esféricas de 10 nm de diámetro puede alcanzar valores teóricos de más de 300 m²/g), requiere una muy pequeña masa para alcanzar efectividad, con lo que se cumple uno de los preceptos básicos del desarrollo sustentable, justamente el referido a preservar los recursos actuales para uso de las generaciones futuras

6 CONCLUSIONES GENERALES

Los diferentes trabajos desarrollados en el marco general de la tesis, desde la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata y su aplicación para utilización como agente antibacteriano y fungistático sobre distintos sustratos, han permitido alcanzar los objetivos planteados.

Se acotaron los parámetros y se optimizaron los insumos para la síntesis química de nanopartículas coloidales, caracterizándolas tanto desde el punto de vista de algunas propiedades clave para su utilización práctica (tamaño adecuado y muy buena estabilidad en suspensión), como de la cuantificación de su actividad antimicrobiana.

Se llevaron a cabo experiencias con dos alternativas para la incorporación de nanopartículas de plata a sustratos textiles: fabricación *ex situ* y generación *in situ*.

En el primer caso, la técnica usada para la impregnación de textiles con las nanopartículas le confiere al sustrato una buena capacidad antimicrobiana frente a bacterias modelo de Gram positivas y Gram negativas, que además resulta persistente luego de varios ciclos de lavado. Por otra parte, desde el punto de vista ambiental, también se verificó que las nanopartículas presentan muy buena adhesión a los textiles ensayados, lo que minimiza el impacto ecológico eventual de su migración al medio en aguas de lavado.

En el proceso *in situ* capa por capa (LBL) ensayado se mostraron resultados satisfactorios en la producción de redes poliméricas en la superficie de textiles en las cuales se anclan las nanopartículas. Estas nanopartículas de plata, con tamaños entre 50 y 100 nm, también exhiben buena actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, desde el punto de vista de un eventual escalado del proceso a nivel industrial, aparecen como puntos desfavorables el costo y la complejidad operativa cuando se compara esta técnica con la fabricación *ex situ* y posterior incorporación a los textiles.

Por último, también se evaluó experimentalmente el resultado de incorporar las nanopartículas de plata fabricadas *ex situ* a recubrimientos orgánicos, fundamentalmente pinturas de base acuosa. A partir de los resultados obtenidos en los ensayos se puede concluir que estas formulaciones presentan una muy buena acción fungicida. Se verifica que la nanoplata actúa como inhibidor del crecimiento de hongos ambientales bajo condiciones extremas de temperatura y humedad, obteniéndose un comportamiento similar o mejor que el de pinturas comerciales locales, formuladas con agentes biocidas convencionales. También se logró inhibir efectivamente el crecimiento de bacterias, lo que lleva a concluir que la optimización de las formulaciones, así como su eventual combinación con otras nanopartículas metálicas puede resultar en productos eficaces en su función y competitivos comercialmente respecto de los biocidas convencionales.

7 BIBLIOGRAFÍA

- [1] P Feynman (1960) Plenty of Room at the Bottom. An Invitation to Enter a New Field of Physics. *Caltech Engineering and Science* 23 (5): 22-36.
- [2] BI Lee, L Qi, T Copeland (2005) Nanoparticles for Materials Design: Present & Future. *Journal of Ceramic Processing & Research* (6):31-40.
- [3] GP Wiederrecht (2004) Near-Field Optical Imaging of Noble Metal Nanoparticles. *The European Physical Journal Applied Physics* (28): 3-18.
- [4] M Faraday (1857) The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (147): 145-181.
- [5] M Faraday, LP Williams, R FitzGerald, O Stallybrass (1971) The selected correspondence of Michael Faraday. *Libro impreso: biografía*. Cambridge (England): University Press.
- [6] M Reibold, P Paufler, AA Levin, W Kochmann, N Patzke, DC Meyer, (2006) Materials: Carbon Nanotubes in an Ancient Damascus Sabre. *Nature* (444): 286.
- [7] W Kochmann, M Reibold, R Goldberg, W Hauffe, AA Levin, DC Meyer, T Stephan, H Müller, A Belger, P Paufler, (2004) Nanowires in ancient Damascus steel. *Journal of Alloys and Compounds* (372) L15–L19.
- [8] ME Calafat (2003) Nanomateriales. *Rev. Real Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* (97) 271-287.
- [9] G Cao, Y Wang (2011) Chapter 7 Nanostructures Fabricated by Physical Techniques. *Nanostructures and Nanomaterials. Synthesis, Properties, and Applications*, 2th Edition, Imperial College Press.
- [10] DL Feldheim, CA Foss, (2002) *Metal Nanoparticles, synthesis, characterization, and applications*. Eds. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [11] C Flytzanis, F Hache, MC Klein, D Richard, P Roussignol, (1991) Nonlinear optics in composite material: semiconductor and metal crystallites in dielectrics. *Progress in Optics* (29): 321-411.
- [12] K Kelly, E Coronado, L Zhao, G Schatz (2003) The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal Phys. Chem. B* (107): 668-677.
- [13] DC Joy, CS Joy, (1996) Low Voltage Scanning electron microscope. *Micron 3-4* (27):247-263.
- [14] VNE Robinson, (1974) Electron Detectors Used for Imaging in the Scanning Electron Microscope. *Scanning Electron Microscopy* 1 (3): Article 19.
- [15] M Knoll, E Ruska, (1932) Das elektronenmikroskop. *Zeitschrift für Physik A: Hadrons and Nuclei* (78): 318-339.
- [16] BK Mehta (2017) Green synthesis of silver nanoparticles and their characterization by XRD. *J. Phys.: Conf. Ser.* (836): 012050
- [17] KH Cho, JE Park, T Osaka, SG Park, (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. *Electrochimica Acta*, 5 (51): 956-960.
- [18] S Pal, YK Tak, JM Song, (2007) Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology* 6 (73): 1712–1720.
- [19] J Jeevanandam, A Barhoum, Y Chan, A Dufresne, M Danquah, (2018) Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity, and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology* (9):1050–1074.
- [20] MA Raza, Z Kanwal, A Rauf, AN Sabri, S Riaz, S Naseem. (2016) Size and shape dependent antibacterial studies of silver nanoparticles synthesized by wet chemical routes. *Nanomaterials* (6) 74.

-
- [21] YK Tak, (2015) Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter?. *Scientific Reports* (5):16908.
- [22] P Courtois, A Rorat, S Lemiere, R Guyoneaud, E Attard, C Levard, F Vandebulcke, (2019) Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: A review of effects on microorganisms, plants and animals. *Environmental Pollution* (253): 578-598.
- [23] PD Howe, S Dobson (2002) Silver and silver compounds: environmental aspects. *Concise International Chemical Assessment Document 44*. World Health Organization. Geneva.
- [24] JS Holler, BA Fowler, GF Nordberg, (2015) Chapter 53: Silver. *Handbook on the Toxicology of Metals* (4th Edition) (2):1209-1216.
- [25] PC Cardoso (2016) Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños (Bs. As)* 58 (260):19-28.
- [26] S Temizel-Sekeryan, AL Hicks, (2020) Global environmental impacts of silver nanoparticle production methods supported by life cycle assessment. *Resources, Conservation & Recycling* (156) 104676.
- [27] WP Wijnhoven, WJGM Peijnenburg, CA Herberts, WI Hagens, AG Oomen, EHW Heugens, B Roszek, J Bisschops, I Gosens, D Van De Meent, S Dekkers, WH De Jong, M van Zijverden, AJAM Sips, RE Geertsma (2009) Nano-silver – A review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 2 (3): 109-138.
- [28] T Klaus-Joerger, R Joerger, E Olsson, C Granqvist. (2001) Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends Biotechnol.* (1):15-20.
- [29] DV Goia (2004) Preparation and formation mechanisms of uniform metallic particles in homogeneous solutions. *J. Mater. Chem.* (14): 451-458.
- [30] K Ghosh, S Kundu, S Mandal. (2003) Studies on the Evolution of Silver Nanoparticles in Micelle by UV-Photoactivation. *Journal of Nanoparticle Research* (5): 577–587.
- [31] A Henglein (2001) Reduction of Ag (CN)₂⁻ on Silver and Platinum Colloidal Nanoparticles. *Langmuir* 8 (17): 2329–2333.
- [32] I Pastoriza-Santos, LM Liz-Marzán (2002) Formation of PVP-Protected Metal Nanoparticles in DMF. *Langmuir* 7 (18): 2888-2894.
- [33] B Wiley, Y Sun, B Mayers, Y Xia, (2005) Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver. *Chemistry – A European Journal* (11): 454-463.
- [34] M Gutierrez, A Henglein (1993) Formation of colloidal silver by "pushpull" reduction of silver (1+). *J. Phys. Chem.* (97): 11368-11370.
- [35] SM Yakout, AA Mostafa, (2015) A novel green synthesis of silver nanoparticles using soluble starch and its antibacterial activity. *International journal of clinical and experimental medicine* 8 (3):3538–3544.
- [36] P Raveendran, J Fu, SL Wallen (2003) Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* 125 (46): 13940-13941.
- [37] N Vigneshwaran, RP Nachane, RH Balasubramanya, PV Varadarajan (2006) A novel one-pot 'green' synthesis of stable silver nanoparticles using soluble starch. *Carbohydrate Research* 12 (341): 2012-2018.
- [38] G Decher, JD Hong (1991) Buildup of ultrathin multilayer films by self-assembly process I: consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromol Chem Macromol Symp.* (46): 321-327.

-
- [39] G Decher, JD Hong (1991) Buildup of ultrathin multilayer films by self-assembly process II: consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles and polyelectrolytes on charged surfaces. *Ber Bunsenges Phys Chem.* (95):1430-1434.
- [40] P Hammond. (2000). Recent explorations in electrostatic multilayer thin film assembly. *Current Opinon in Colloid and Interface Science* (4): 430-442.
- [41] SRM Shiratori (2000) pH Dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. *Macromolecules* (33): 4213-4219.
- [42] P Hammond (2012) Building biomedical materials layer-by-layer. *Materia Today* 5 (15): 196-206.
- [43] J Choi, MF Rubner, (2005) Influence of the Degree of Ionization on Weak polyelectrolyte Multilayer Assembly. *Macromolecules* (38): 116-124.
- [44] Hill, T. L. (1986) Chapter 21: Polymer and Polyelectrolyte Solutions and Gels. *An introduction to Statistical Thermodynamics*. Dover Publications: New York.
- [45] GS Manning, (1969) Limiting laws and counterion condensation in polyelectrolyte solutions I. Colligative properties. *The Journal of Chemical Physics* (51): 924-933.
- [46] V. Kavanov, (2002) Fundamentals of Polyelectrolyte Complexes in Solution and the Bulk. *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*. Pag. 47-86. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [47] G Decher, JD Hong, (1991) Buildup of ultrathin multilayers films by a self – assembly process: 1. Consecutive adsorption of anionic and cationic bipolar amphiphiles on charged surfaces. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* (46): 321-327.
- [48] G Decher, JD Hong, (1992) Buildup of ultrathin multilayers films by a self – assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* (210/211): 831-835.
- [49] X Zhang, H Chen, H Zhang, (2007) Layer by layer assembly: From conventional to unconventional methods. *Chemical Communications* (14): 1395-1405.
- [50] KC Krogman, KF Lyon, PT Hammond (2008), Metal ion reactive thin films using spray electrostatic Lbl assembly. *Journal Phys. Chem. B* (112): 14453-14460.
- [51] AV Thomsen, JF Schwensen, R Bossi, P Banerjee, E Giménez-Arnau. (2017). Isothiazolinones are still widely used in paints purchased in five European countries: a follow-up study. *Contact Dermatitis, Wiley* 78 (4): 246-253.
- [52] DR Karsa (2007) Chapter: F.2 Biocides. *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*. Editores: I Johansson, P Somasundaran. Elsevier Science B.V
- [53] X Chen, HJ Schluesener, (2008). Nano-silver: a nanoparticle medical application. *Toxicol. Lett.* (176):1-12.
- [54] Smith and nephew: <https://www.smith-nephew.com/> (septiembre 2021)
- [55] H Dong, D Wang, G Sun, J Hinestroza (2008) Assembly of Metal Nanoparticles on Electrospun Nylon 6 Nanofibers by Control of Interfacial Hydrogen-Bonding Interactions. *Chemistry of Materials* (20) 21.