

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

MÓDULO DE QUÍMICA INORGÁNICA E INGENIERÍA QUÍMICA

**NANOPARTÍCULAS DE PLATA: PREPARACIÓN,
CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES CON
APLICACIÓN EN INOCUIDAD DE LOS
ALIMENTOS.**

Autora: Minerva Sánchez Moreno

Tutor: Jesús Álvarez Rodríguez

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y QUÍMICA TÉCNICA

Octubre 2017

ÍNDICE

CAPÍTULO 1:

1. Introducción	4
1.1. Nanotecnología y Nanomateriales (NMs)	4
1.2. Nanopartículas de Plata (AgNPs): Características, propiedades y aplicaciones	8
1.3. Aplicación de las AgNPs en la Industria Alimentaria	11

CAPÍTULO 2:

2. Alcance y objetivos del trabajo	14
---	-----------

CAPÍTULO 3:

3. Preparación de las AgNPs	15
3.1. Métodos químicos	15
3.2. Métodos físicos	27
3.3. Métodos biológicos	30

CAPÍTULO 4:

4. Técnicas de caracterización de las AgNPs	32
4.1. Propiedades ópticas y análisis elemental	32
4.1.1. Espectroscopia de adsorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis)	32
4.1.2. Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR)	33
4.1.3. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS)	33
4.1.4. Espectroscopia de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y espectroscopia de absorción atómica (FAAS)	34
4.1.5. Resonancia magnética nuclear (RMN)	34
4.2. Morfología	34
4.2.1. Microscopia electrónica de transmisión (TEM)	35
4.2.2. Microscopia electrónica de barrido (SEM)	36
4.2.3. Microscopia de fuerza atómica (AFM)	37
4.3. Análisis estructural	37
4.3.1. Difracción de Rayos X (XRD)	37
4.3.2. Difusión de luz dinámica (DLS)	39

CAPÍTULO 5:

5. Toxicidad de las AgNPs	39
--	-----------

CAPÍTULO 6:

6. Conclusiones	42
------------------------------	-----------

CAPÍTULO 7:

7. Bibliografía y Referencias	43
--	-----------

<u>ANEXO 1: ABREVIATURAS</u>	50
---	-----------

CAPÍTULO 1:

1. Introducción.

1.1. Nanotecnología y Nanomateriales (NMs).

Actualmente, la nanotecnología juega un papel importante a nivel mundial en cuanto a la investigación y desarrollo científico e industrial se refiere. Se trata de una tecnología multidisciplinar que incluye la física, la química, la biología y la ingeniería. La riqueza científica de este campo radica en que cuando la materia se presenta y es tratada a escala nanométrica, ésta presenta propiedades y fenómenos totalmente novedosos, que difieren significativamente de las que presentan a escala macroscópica.

En Julio del 2004 el informe de la *Royal Society and the Royal Academy of Engineering*, “Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties” [1] pone de manifiesto que las nanotecnologías ofrecen muchos beneficios, pero también es necesario investigar las incertidumbres sobre los efectos de los nanomateriales sobre la salud y el medio ambiente. A día de hoy, no se encuentra una definición única de nanotecnología, pero en el informe antes citado se encuentra una que es ampliamente utilizada, definiendo la nanotecnología como “el diseño, caracterización, producción y aplicación de estructuras, dispositivos y sistemas controlando el tamaño y la forma a escala nanométrica” [1]. Es necesario normalizar la terminología aplicada en este campo. Para ello se han creado comités por organismos de Normalización Europeos, Nacionales e Internacionales (como pueden ser, ISO TC 229, CEN TC 352, AEN/GET 15), dedicados a esta materia.

Según la International Standard Organization (ISO, 2015), nanotecnología es “aplicación del conocimiento científico para manipular y controlar la materia predominantemente a escala nanométrica con el fin de hacer uso de sus propiedades y fenómenos relacionados con su tamaño y estructura, a diferencia de los asociados con átomos o moléculas individuales o con materiales a granel” [2]. Por otro lado la ASTM (American Society for Testing and Materials) la define como, “campo que mide, manipula o incorpora materiales con una o varias de sus dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nm” [3].

En la *Figura 1* se puede observar de un mejor modo cuál es el rango espacial en el que se encuentra la nanotecnología.

El desarrollo de esta disciplina se produce en 1959, a partir de las propuestas del premio nobel de Física Richard P. Feynman, uno de los científicos más importantes del siglo XX. Presentó una charla en la conferencia American Physical Society llamada

“*There’s plenty of room at the bottom*” (“*Hay mucho espacio al fondo*”). En la misma auguraba una gran cantidad de nuevos descubrimientos que serían de gran relevancia en la ciencia y la tecnología del futuro, al tratar la materia a escala atómica y molecular [4].

El prefijo “*nano*” es un término griego que se refiere a algo extremadamente pequeño. El nanómetro es la unidad de longitud que equivale a una milmillonésima parte de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), una longitud 80.000 veces más pequeña que el diámetro de un cabello humano y 10 veces el diámetro de un átomo de hidrógeno [1].

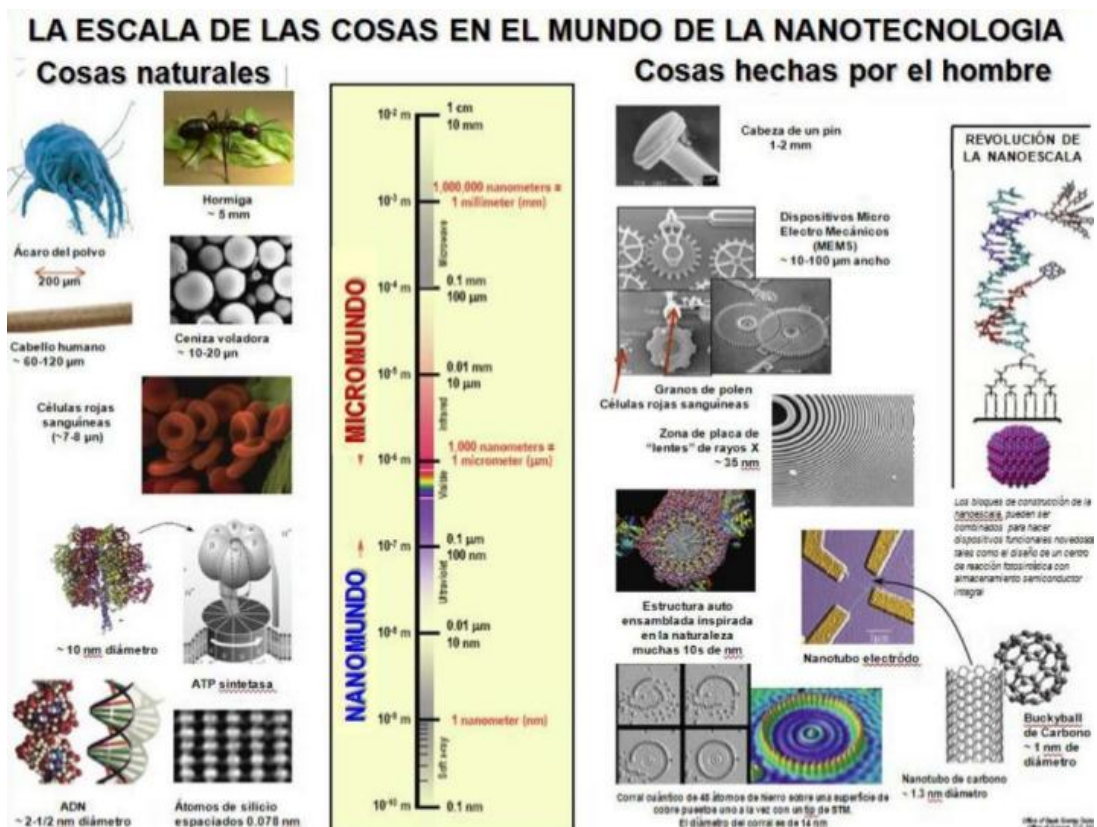



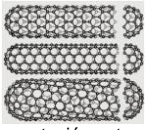
Figura 1. Rango espacial en el que se encuentra la nanotecnología. Fuente: <https://science.energy.gov/bes/community-resources/scale-of-things-chart/> [5].

Según la recomendación de la Comisión Europea del 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial (NM), los *nanomateriales* (NMs) se definen como “*un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 nm y 100 nm*” [6].

Se puede realizar una clasificación de los materiales nanométricos en función de su composición:

- ❖ Basados en el tipo de materiales: En ellos se incluyen los puntos cuánticos y elementos metálicos, como las nanopartículas de plata (AgNPs) y las nanopartículas de oro (AuNPs), y óxidos, tales como el dióxido de titanio (TiO₂). Los puntos cuánticos consisten en cristales semiconductores o nanopartículas (NPs) con un tamaño de 2-10 nm.
- ❖ Basados en carbono: Estos NMs están compuestos principalmente por carbono. Los NMs de carbono esféricos y elipsoides se conocen como fullerenos, mientras que los cilíndricos son llamados nanotubos y nanofibras; además se conocen los planos, como el grafeno y los óxidos grafiticos. Estos NMs tienen importantes aplicaciones potenciales en el campo de los lubricantes, la electrónica, la biomedicina...
- ❖ Dendrimeros: principalmente un dendrímero se basa en la definición de un dendrón, que es una parte de una molécula que comprende exclusivamente unidades repetitivas constitutivas dendríticas y terminales (CRU). Estas unidades son definidas sobre la base de su conectividad, es decir, el número de otras CRU a las que están conectadas [7]. Su aplicación en la medicina y en la química farmacéutica se está convirtiendo en una de las áreas de mayor interés de los dendrímeros.
- ❖ Nanocomposites: material multicomponente que comprende múltiples, diferentes dominios de fase (no gaseosos) en los que al menos un tipo de dominio de fase es una fase continua [8]. Un ejemplo son las nanoarcillas, las cuales se añaden a productos que van desde piezas de automóviles a materiales para el envasado, mejorando así, propiedades mecánicas, térmicas, ópticas, electroquímicas...

En la *Figura 2* podemos observar una clasificación en función del número de dimensiones que en la estructura tenga carácter nanométrico:

 <p>Representación estructural de un fullereno</p>	Nanomaterial 0D: Tres dimensiones a escala nanométrica , donde ninguna de sus dimensiones se encuentran fuera de la nanoescala, como por ejemplo los fullerenos.
 <p>Representación estructural de nanotubos con diferentes capas concéntricas</p>	Nanomaterial 1D: Dos dimensiones a escala nanométrica , se caracterizan por disponer de dos dimensiones en la nanoescala y únicamente una fuera del rango nanométrico, como por ejemplo los nanohilos y/o nanotubos.

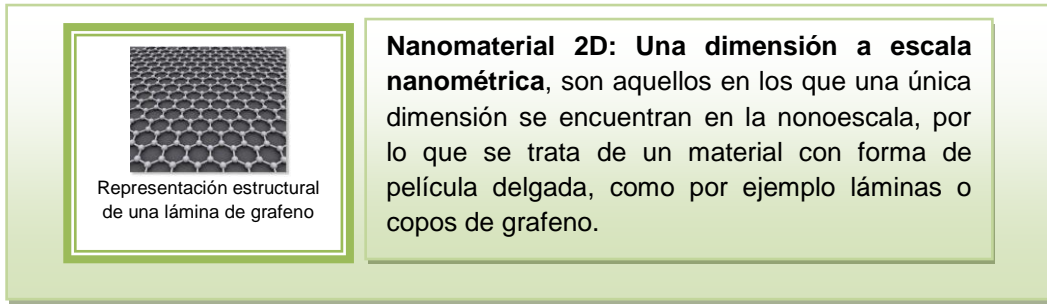


Figura 2. Resumen de la clasificación en función de su estructura [9].

Una NP es un tipo de nanoestructura 0D donde los clusters de átomos que lo forman tienen que tener un tamaño de 1-100 nm. Han suscitado mucho interés debido a sus propiedades, que derivan de la alta relación superficie-volumen, ya que si el diámetro disminuye, el área superficial de la partícula aumenta y como consecuencia se produce un aumento en las propiedades originales del material. El interés sobre especies químicas de tamaño nanométrico es una de las áreas de trabajo más importantes de la investigación en Química, debido fundamentalmente, a la gran variedad de nuevas propiedades y aplicaciones potenciales que se pueden explotar en diversos campos. Sin embargo, esta diferencia de comportamiento a escala nanométrica puede inducir a riesgos potenciales que se expondrán en el Capítulo 5.

Los seres humanos y el medio ambiente siempre han estado expuestos a NPs de origen natural como son los que se producen durante las erupciones volcánicas, incendios forestales, etc. Desde los inicios de la revolución industrial esta exposición ha ido aumentando significativamente, debido a la presencia de fuentes antropogénicas como la combustión interna de los motores de explosión, las centrales térmicas y otras fuentes de termodegradación. Sin embargo, en la actualidad la fuente principal de exposición a NPs para las personas se asocia con la existencia de nuevas NPs fruto del rápido desarrollo de la nanotecnología [10].

El auge y la presencia de las NPs en el día a día llevan implícito la necesidad de fabricarlas en grandes cantidades, a fin de cumplir la demanda prevista. Es por ello, que los avances del mercado y la demanda de la sociedad, ha llevado a que científicos de todo el mundo abarquen el estudio en este campo, encontrándose en la actualidad en plena expansión en aplicación en multitud de sectores.

Se espera que para década 2010-2020 la producción de NMs crezca 20 veces con respecto al último lustro [11]. Esto da pauta a que diversos grupos de investigación traten de generar tecnologías que mejoren los procesos de síntesis y procesamiento desde el punto de vista de ciencia básica para tratar de explicar y entender los fenómenos que se llevan a cabo [11].

1.2. Nanopartículas de Plata (AgNPs): características, propiedades y aplicaciones.

Las NPs de metales, de óxidos metálicos o de compuestos basados en metales (como pueden ser las AgNPs) muestran interesantes propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas y catalíticas que, en general, se relacionan con su tamaño, forma, composición, cristalinidad y estructura de la partícula, pudiendo ser interesantes desde el punto de vista de su aplicación práctica [12].

La presencia de electrones libres en la banda de conducción de la superficie de las nanopartículas metálicas que reciben un haz de luz incidente, induce una excitación colectiva de estos electrones libres, como consecuencia de la fuerte interacción con la luz incidente; se produce una oscilación coherente deslocalizada de los electrones confinados en la superficie de las nanopartículas metálicas, en la interfaz metal-dieléctrico o metal-semiconductor; la excitación electromagnética se llama polaritón del plasmón de superficie; el polaritón es una casi-partícula híbrida resultante del fuerte acoplamiento entre la luz y los electrones libres en la superficie de una NP. Para determinadas frecuencias de la energía incidente, se produce un acoplamiento entre las frecuencias de la onda incidente y de la oscilación del polaritón; este fenómeno se llama resonancia del plasmón de superficie y tiene la capacidad de absorber determinadas frecuencias de la luz incidente y de transmitir las frecuencias no absorbidas que se asocian a un determinado color.

Así, en el caso de las nanopartículas de oro, plata y cobre, presentan disoluciones coloidales de colores intensos cuyas frecuencias de resonancia de plasmón aparecen en el rango de longitud de onda UV-Visible, y que dependen del tamaño y la forma de la partículas tal y como se observa en la *Figura 3* [13].



Figura 3: Clasificación de diferentes morfologías típicas de las AgNPs y AuNPs y su localización en el espectro UV-Vis según la absorción provocada por la SPR. Figura y nota tomada de [13].

Las AgNPs destacan por su potencial y versatilidad, ya que son aplicables en optoelectrónica, catálisis, procesos de remediación ambiental... Como herramienta en aplicaciones biomédicas, debido a sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y estructurales; su fotoactividad las promueve como agente antimicrobiano (bactericida-fungicida) y han resultado ideales para marcaje celular [14].

Entre los agentes antimicrobianos inorgánicos, la plata (Ag) ha sido utilizada desde hace siglos, para combatir infecciones y controlar la contaminación microbiana [15]. El efecto que provoca los iones Ag en los microorganismos es conocido, sin embargo, el mecanismo de acción aún no está del todo claro. Aunque se ha planteado que las AgNPs pueden actuar de una forma similar a la plata iónica, existen indicios de que el efecto biocida que producen cada uno de ellos es distinto [16].

Dentro de la familia de las nanopartículas metálicas, una de las que ha suscitado mayor interés, son las AgNPs, su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con incorporación de AgNPs en diversos materiales, por su capacidad como agente bactericida, contra los microbios como son las bacterias y hongos [17].

Como resultado, debido al poder antimicrobiano que presentan estas NPs se utilizan en multitud de productos de consumo disponibles en el mercado, llegando a ser el NM más utilizado en la producción de bienes de consumo, presentes aproximadamente en 435 productos [18]. En la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las AgNPs en productos para la electrónica, la informática, la industria del textil, la cosmética, en la agricultura e industria alimentaria (como veremos en el siguiente apartado), en medicina...

En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs, evitando así el crecimiento antibacteriano [19]. Por ejemplo, los catéteres se preparan generalmente a partir de materiales que contienen AgNPs, ya que pueden ser útiles para reducir el riesgo de infecciones [20]. También, están incorporadas en la industria textil para la fabricación de ropa antibacteriana [21].

Las AgNPs muestran gran variabilidad en sus características en función de su forma y tamaño. Se ha publicado que el poder bactericida de estas NPs, incrementa con la disminución del tamaño, ya que presentan mayor superficie de contacto [15].

Morrones y col. [22] señalan que las partículas de un tamaño de 1-10 nm presentan una mayor interacción con la membrana celular bacteriana [22]. En cuanto a su forma, **Rai y col.** [23] plantean que las AgNPs de forma triangular tienen un mayor efecto bactericida en comparación con aquellas que presentan forma esférica o cilíndrica [23]. En la *Figura 4* podemos observar diversas formas de las AgNPs.

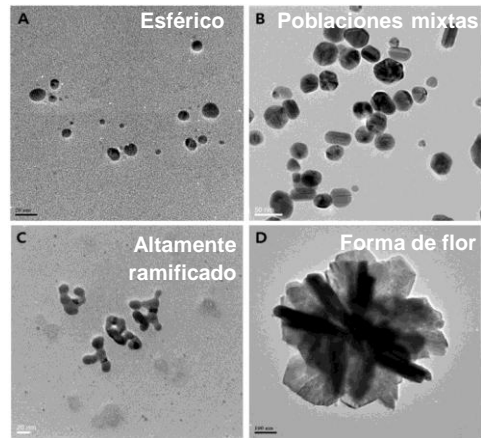


Figura 4: Imagen ilustrativa de diversas formas de AgNPs. Figura y nota tomada de [24].

La morfología de las NPs depende principalmente de los parámetros de fabricación, tales como, la temperatura, el método de fabricación, el flujo del material de crecimiento, la presencia de un sustrato, entre otros. Se pueden obtener NPs de formas diversas como: esféricas, varillas, triangulares, entre otras.

Estudios han demostrado que las AgNPs tienen una actividad eficaz antimicrobiana contra las bacterias y hongos, como se ha mencionado anteriormente. Sin embargo, las actividades antivirales de las AgNPs siguen siendo aún objeto de estudio por los científicos. Actualmente, existen pocos trabajos que investiguen los efectos de las AgNPs contra los virus. Se está evaluando la utilización de las AgNPs contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos, como ocurre con el virus del VIH-1, ya que ha sido demostrado que el tratamiento in vitro con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped [25].

En la Unión Europea, se cuenta con la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (EACH), donde los NMs están regulados por el Reglamento REACH (Reglamento Europeo sobre sustancias químicas) y CLP (Reglamento que armoniza los criterios para la clasificación de sustancias y mezclas, y las normas de etiquetado y envasado para sustancias y mezclas peligrosas), pudiéndose encontrar en el apartado de Reglamentos: <https://echa.europa.eu/es/regulations/nanomaterials> [26].

El Reglamento sobre Productos Biocidas (RPB) incluye disposiciones específicas relativas a los NMs. Estas disposiciones se aplican a los productos y las

sustancias que cumplen los criterios definidos en el RPB. Dichas definiciones se basan en las recomendaciones de la Comisión sobre la definición de NM [27].

Estas disposiciones se aplican a las sustancias activas y no activas que presentan las siguientes características: agregados o aglomerados en los que al menos el 50% de las partículas primarias tienen al menos una dimensión comprendida entre 1 y 100 nm, sin disposiciones para "propiedades novedosas" procedentes de su pequeño tamaño [27].

En concreto, para poder comercializar los NMs en Europa, deben ser probados como seguros, es decir, que no afecten negativamente a la salud pública o al medio ambiente, demostrando su inocuidad previa, basándose en el Principio de Prevención. En octubre de 2012 se constituyó el Grupo de Expertos sobre Nanomateriales (ECHA-NMEG) con el apoyo de las autoridades competentes en cuanto al cumplimiento de REACH y CLP (CARACAL) y del Reglamento de biocidas. Este grupo consultivo informal apoya la ejecución del Plan de trabajo sobre nanomateriales 2016-2018 de la ECHA y proporciona información y asesoramiento sobre cuestiones científicas y técnicas relativas a la aplicación de la legislación REACH, CLP y RPB en relación con los NMs [26].

1.3. Aplicación de las AgNPs en la Industria Alimentaria.

La nanotecnología ofrece grandes oportunidades para la obtención de productos y aplicaciones innovadoras en el sector agroalimentario. Estas aplicaciones se están estudiando y desarrollando e incluso utilizando en las diferentes etapas de la cadena de producción de alimentos, desde la agricultura, el procesamiento y embalaje de alimentos [28]. El avance en los últimos años se hace palpable en numerosas aplicaciones como [29]:

- ✓ el envasado (envases activos y envases inteligentes)
- ✓ el desarrollo de nuevos productos (nanoalimentos funcionales, microcápsulas)
- ✓ la calidad y la seguridad alimentaria (biosensores).
- ✓ la mejora de los procesos de los alimentos (gelatinización, espumas y emulsiones).

Actualmente ya se emplea el término “nanofood”, el cual hace referencia a todo producto alimenticio en donde la nanotecnología ha intervenido en cualquiera de las etapas de su producción, procesamiento, transporte y almacenamiento [16]. Según la información de la que actualmente se dispone, los NMs artificiales que se pueden encontrar en los productos alimentarios se clasifican en tres categorías diferenciadas: NMs artificiales orgánicos, NMs artificiales funcionalizados de superficie y NMs artificiales inorgánicos, encontrándose las AgNPs en este último tipo [30].

Además, se puede destacar su utilización en la fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos (ejemplos *Tabla 1*), ya que sus propiedades biocidas permite prevenir hasta en un 90% el crecimiento de microorganismos en los alimentos [31].

Los usos más recientes de las AgNPs en este sector, están relacionados con el desarrollo de envases con recubrimientos antimicrobianos debido al potencial que poseen con funciones en la calidad y seguridad alimentaria. Los recubrimientos con NMs incorporados son útiles para evitar que la comida conservada en estos recipientes se contamine, con el fin de retrasar su maduración y alargar su vida útil. Esto es debido a la liberación lenta de AgNPs de la superficie revestida. Con ello se consiguen envases alimentarios dotados de propiedades antimicrobianas con menor riesgo de migraciones tóxicas al alimento. Es por ello, que estas medidas pueden reducir en gran medida la incorporación de aditivos en el propio alimento (que aunque está regulada en cuanto a su composición y concentración, es positivo la reducción de los mismos). Las actuales investigaciones sobre ese tipo de superficies tienen por objeto conseguir sensores capaces de detectar la contaminación bacteriana y reaccionar contra ella.

Li y col. [32], investigaron el efecto de un nuevo material de embalaje “nano”, para la preservación de dátiles chinos, para ello, emplearon un material de envase con incorporación de AgNPs, dióxido de titanio (TiO₂) y kaolin. Además de presentar mejores propiedades de barrera y mecánicas, mantuvieron la calidad de los frutos por más tiempo, en comparación con los envases sin recubrimientos nanoestructurados [32].

Los investigadores que trabajan en el campo de la conservación de alimentos han informado del revestimiento sonoquímico, una técnica simple y versátil utilizada para la preparación de materiales con revestimiento de disolución coloidal que AgNPs utilizando ultrasonificación [33]. El recubrimiento demostró ser eficaz contra diversas cepas de bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), dotándonos de procedimientos factibles en la síntesis de materiales que permiten prolongar la conservación de alimentos durante más tiempo.

La empresa Samsung Electronics ha desarrollado una línea de electrodomésticos con la presentación de la *Silver Nano Technology* (Tecnología de NanoPlata). Concretamente, en lo que concierne a electrodoméstico en contacto con los alimentos, incorporan nanoplata en los refrigeradores, con el fin de impedir la proliferación de bacterias, para una mejor conservación de los alimentos [34].

Nanogap, es una compañía Gallega que fabrica NMs como NPs esféricas de 5 a 50 nm, Clústers Cuánticos Atómicos (AQC's), producto exclusivo de Nanogap, de tamaño subnanométrico. Las capacidades tecnológicas de Nanogap le permiten producir una amplia variedad de nuevos nanomateriales con aplicaciones muy variadas en diversos ámbitos como terapia y diagnóstico en biomedicina, componentes electrónicos avanzados o tecnología de seguridad [35].

Concretamente, Nanogap tiene dos productos de clusters cuánticos atómicos que pueden ser incorporados en recubrimientos para proporcionar un efecto antimicrobiano. Estos productos son NGAP AQC Ag-1103 y NGAP AQC Ag-1104. Los beneficios de estos incluyen: eficacia antimicrobiana no tóxica a concentraciones muy bajas, permanencia en películas de recubrimiento delgadas y facilidad de incorporación. Los niveles de la incorporación tan bajos como 10 ppm proporcionan las características antimicrobianas significativas, con el efecto que dura por años [35].

La Autoridad Europea de Normas Alimentarias (EFSA) ha realizado un inventario que proporciona una visión general de la nanotecnología en el sector de la alimentación, ya que recoge sus aplicaciones actuales y futuras, examina la normativa en este ámbito (tanto en la Unión Europea - UE - como en terceros países) y recopila los datos toxicológicos disponibles hasta el momento sobre estos materiales y las evaluaciones de riesgo específicas que se han llevado a cabo en este ámbito en los últimos años. El inventario recopila 633 registros, que incluyen 55 nanomateriales y 12 aplicaciones, procedentes todas ellas de búsquedas bibliográficas (más de 9000 referencias), de consultas a webs de empresas de alimentación y de cuestionarios enviados a institutos de investigación, industrias alimentarias, consultores y otros expertos. Uno de los mayores números de registros corresponde a AgNPs [31, 36].

En la siguiente tabla se recogen en la gran cantidad de productos que se utiliza, especificándose en donde se comercializan.

COMPAÑÍA / INSTITUCIÓN	COMPONENTE NANO
Sharper Image®. (EEUU).	Bolsas de plástico para guardar alimentos tratadas con AgNPs.
BlueMoonGoods, LLC, A-DO Global, Quan Zhou Hu Zhen Nano Technology Co., Ltd y Sharper Image (EEUU, Korea, China, EEUU).	Recipientes de plástico para guardar alimentos tratados AgNPs.
Daewoo, Samsung y LG. (Korea)	Refrigeradores tratados con AgNPs.
Baby Dream® Co., Ltda. (Korea).	Jarros para bebés tratados con AgNPs.
A-DO Global (Korea).	Tablas para picar tratadas con AgNPs.
Changmin Chemicals (Korea).	Cuencos para alimentos tratados con

	AgNPs.
Nanogap (España)	NGAP AQC Ag-1103 se suministra como AQC dispersado en monómero acrílico curable por UV (HDDA) a una concentración de Ag de 10g/litro. Puede utilizarse como un aditivo para conferir propiedades antimicrobianas a recubrimientos.

Tabla 1. Nano agentes antibacteriano en envases y materiales en contacto con alimentos. Fuente: [35, 37].

En cuanto al empleo de las AgNPs en el sector de la agricultura, se ha descubierto su aplicación para prolongar la conservación de los frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático¹ que retarda el crecimiento de hongos.

CAPÍTULO 2:

2. Alcance y objetivos.

Con este Trabajo Fin de Máster se pretende recopilar los principales procedimientos para la preparación y caracterización de las AgNPs, debido al gran interés que han suscitado a sus propiedades antimicrobianas, ópticas, eléctricas, catalíticas y magnéticas.

El estudio se centrará en la presentación de los avances y aplicaciones que tienen las AgNPs en el sector alimentario, concretamente en la inocuidad de los alimentos. Llevará implícito por tanto, examinar los posibles efectos tóxicos que presentan dichas NPs, ya que su aplicación en el sector alimenticio puede dar lugar a una exposición directa humana; y a los posibles efectos que provocan sobre el medio ambiente.

Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica para los últimos 10 años aproximadamente, teniendo en cuenta que es un campo novedoso y que está en crecimiento exponencial. Recopilando para ello información de una variedad de fuentes entre las que destacan: SciFinder, PubMed, Scopus, Google Academic, Web of Science...

¹ Efecto fungistático: suspender o retardar el crecimiento y el desarrollo de los hongos, o la germinación de sus esporas.

Parte fundamental de este trabajo es realzar las técnicas de mayor repercusión investigadora, destacando los parámetros importantes que aún están siendo investigados como: la estabilidad y agregación de las AgNPs, el control sobre el tamaño y la morfología. Se destacarán las nuevas formas de síntesis “bio” que repercuten positivamente, puesto que es un método de síntesis más amigable con el medio ambiente, empleando para ello microorganismos o extractos de plantas. Por otro lado, se hará hincapié en la denominada “síntesis verde”, ya que permite reducir los residuos, empleando sustancias menos tóxicas.

Una vez sintetizadas las AgNPs, es importante realizar técnicas de caracterización para conocer las propiedades fisicoquímicas que estas presentan. Las técnicas de caracterización de mayor aplicación en este estudio son: microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerzas atómica (AFM), difusión de luz dinámica (DLS), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), difracción de rayos X (XRD), espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de adsorción atómica (AAS), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y espectroscopía de absorción atómica (FAAS).

CAPÍTULO 3:

3. Preparación de las AgNPs.

En este capítulo se presenta una revisión bibliográfica de los principales métodos de síntesis utilizados para la obtención de las AgNPs; exponiendo las ventajas y desventajas que presentan los métodos, y las características del producto obtenido. Así como un análisis detallado de los diversos factores que afectan a la morfología, el tamaño, el rendimiento y la polidispersidad de las AgNPs obtenidas, dando así, la facilidad de adaptarlas a la aplicación específica que se desee.

Los procedimientos de obtención de las AgNPs podemos clasificarlos en tres grupos: *métodos químicos, físicos y biológicos*.

3.1. Métodos químicos.

Según **Poole y Owens**, los métodos químicos pueden ser probablemente los métodos de síntesis de AgNPs más utilizados, ya que tienen un alto potencial para ser escalados a nivel industrial [37]. Generalmente, los métodos químicos, son relativamente fáciles en comparación con otros métodos. Permiten preparar las NPs a gran escala, con una distribución de tamaño monodispersa, es decir, con un tamaño

de partícula muy homogéneo. Es por ello que muchos grupos de investigación están utilizando estos métodos para sintetizar AgNPs.

Los principales procesos de síntesis de AgNPs por métodos químicos son: **reducción química, proceso sol-gel, microemulsión, deposición química de vapor (CVD), termólisis...**

La mayoría de estos métodos están todavía en fase de desarrollo, intentando mejorar inconvenientes relacionados con: la estabilidad en el crecimiento de las AgNPs, la agregación, el control del crecimiento de los cristales, la morfología, el tamaño y la distribución del tamaño de las AgNPs [14].

Desde el punto de vista químico, la síntesis de AgNPs en disolución, precisa de métodos que permitan tener el control riguroso sobre el tamaño y la forma de las NPs, para obtener un conjunto de partículas monodispersas que presenten propiedades determinadas [39]. La síntesis, en general, se lleva a cabo utilizando los siguientes componentes: *precursor metálico* (nitrato de plata,...), *agente reductor* (borohidruros, ascorbatos, citratos...) y *agente estabilizante* (suelen ser ligandos, polímeros o surfactantes cargados).

Las etapas que tienen lugar en la síntesis de las AgNPs son: *nucleación* y *crecimiento* [39]. Ver *Figura 5* y *6*.

El tamaño, la distribución de tamaño y la forma pueden lograrse controlando la etapa de nucleación y el aplilamento de núcleos controlando parámetros experimentales tales como, precursor utilizado en la reacción, concentración, pH, temperatura y agentes reductores [39].

La **reducción química** es ampliamente utilizada para la obtención de suspensiones coloidales, tanto en disolventes orgánicos como acuosos, utilizando distintos tipos de agentes reductores, estabilizantes y medios. Este método permite trabajar en condiciones de temperatura y presión ambiente.

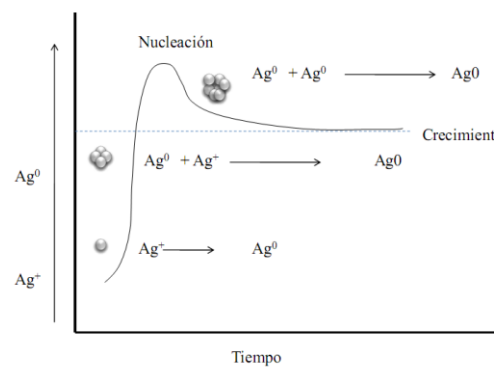


Figura 5. Diferentes etapas que tienen lugar durante la síntesis de las AgNPs. Figura tomada de [40].

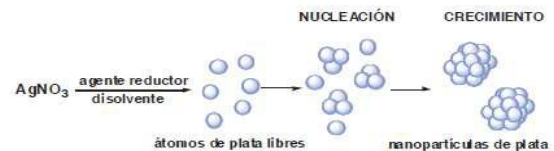


Figura 6. Mecanismo de formación de AgNPs a partir de la reducción de nitrato de plata (AgNO_3). Figura tomada de [39].

Durante la reducción de los iones Ag los diámetros de AgNPs resultantes son variables, dependiendo de la cantidad de iones Ag (Ag^+) que formen átomos de Ag (Ag^0) y después, el número de átomos de Ag que se aglomeren en clústeres que conformarán las AgNPs.

La cantidad de agente reductor debe ser suficiente para estabilizar las AgNPs al momento en que ocurre la reacción, pero no demasiado grande como para aumentar la fuerza iónica total en la disolución y promover la agregación.

En la bibliografía existente para la obtención de AgNPs, los *precursores* más utilizados son el AgNO_3 y el cloruro de plata (AgCl). Como *agentes reductores* para la síntesis de AgNPs se han publicado numerosas opciones entre las que se encuentran: reductores fuertes como el borohidruro de sodio (NaBH_4), borohidruro potásico (KBH_4), hidrógeno elemental y monóxido de carbono, reductores moderados como citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$), ascorbato de sodio [41], hidrazina (N_2H_4) o alcoholes en reflujo prolongado, y reductores débiles como la fructosa y la glucosa [42]. También se utilizan como agentes reductores, reactivo de Tollens, poliol, N, N-dimetilformamida (DMF)... Este es un parámetro importante ya que se ha encontrado que el empleo de agentes reductores fuertes, permiten la formación de NPs de menor tamaño, ya que la velocidad de reacción en la etapa de nucleación es mayor [41, 42].

En este tipo de reacciones se producen sistemas coloidales de baja y alta fuerza iónica, esto debido al alto potencial de reducción de la Ag. Los sistemas coloidales de baja fuerza iónica no necesitan de agentes estabilizantes, debido a que las dobles capas eléctricas formadas alrededor de las partículas evitan la agregación de éstas; mientras que los sistemas de alta fuerza iónica requieren de agentes estabilizantes para prevenir la aglomeración de NPs, y además, estos juegan un papel importante en el control del tamaño y forma de las NPs.

La temperatura es uno de los factores de influencia clave en las reacciones químicas. Es necesario un estudio sistemático del efecto de la temperatura sobre la formación y crecimiento de las AgNPs, la influencia del proceso de calentamiento o enfriamiento en la síntesis de estas NPs. **Jiang y col.** [43] verifican que la temperatura puede afectar significativamente a la forma, tamaño y distribución de tamaño de las AgNPs. En general, el tamaño de las NPs aumenta con el tiempo reacción, y además, cuanto más alta sea la temperatura, más rápido crecerán las AgNPs [43].

Es importante la utilización de agentes estabilizantes que sean capaces de proteger las AgNPs a la par que prevenir su aglomeración en el transcurso de la preparación, sobre todo en disoluciones coloidales de alta fuerza iónica o en fase

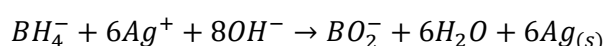
orgánica [39]. La presencia de agentes tensioactivos² como, tioles, aminas, ácidos y alcoholes, permiten estabilizar el crecimiento de las partículas y protegerlas de la sedimentación y la aglomeración [44].

Se ha comprobado que los compuestos poliméricos tales polivinilpirrolidona (PVP), poliacrilatos, polivinilalcohol (PVA), poliacrilonitrilo, poliacrilamida o poli(etilenglicol) son los agentes protectores más eficaces para estabilizar las AgNPs [44].

Los primeros métodos descritos son el **método Lee-Meisel** [45] basado en una variación del *método Turkevich* para la obtención de AuNPs, en el que se emplea AgNO₃ como precursor metálico y C₆H₅Na₃O₇ como agente reductor. Por este método se obtienen AgNPs polidispersas. Desafortunadamente, este proceso simple tiende a producir una gran variedad de tamaños (20-600 nm) y una diversidad de formas (poliedros y placas) en una sola reacción. Aunque son útiles para estudios de NPs individuales, no son adecuados para estudios que involucran la suspensión coloidal entera [45].

Dong y col. [46] demostraron que cambiando el pH de la disolución variaba la morfología de las partículas, obteniéndose para pH = 11,1 formas entre esféricas y varillas, siendo la reacción más rápida, mientras que para pH = 5,7, morfologías de placas triangulares o partículas poligonales, con reacciones más lentas en este caso [46]. También se ha demostrado que es posible dirigir la síntesis con citrato como reductor, para dar un producto predominante en forma de hilos, mediante la adición de pequeñas cantidades de hidróxido de sodio (NaOH) a la síntesis, pero siempre y cuando no se añada en grandes cantidades, puesto que da como resultado una mezcla de partículas polidispersas [47].

Otro método de preparación, es el conocido como el **método Creighton**, utilizando el mismo agente precursor pero en este caso es reducido con NaBH₄. Este método es el más popular en la actualidad, obteniéndose AgNPs de aproximadamente 10 nm y con una buena homogeneidad. La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



² Agentes tensioactivos o también llamados surfactantes, son sustancias que influyen por medio de la tensión superficial en la superficie de contacto entre dos fases.

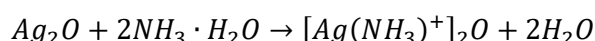
El procedimiento general consiste en poner en contacto el agente reductor y el estabilizante y a estos, adicionarle la disolución con la sal de Ag. Bajo esta metodología, es posible sintetizar AgNPs a altas concentraciones y generar suspensiones estables. Los tipos de estabilizantes que se usan pueden ser polímeros de alto o bajo peso molecular, cargados o sin carga, así como estabilizantes iónicos o neutros. La proporción estabilizante/AgNPs, dependerá del tipo de sustancia que se use y de la concentración NPs en el sistema [40].

A partir de estos dos métodos descritos se han publicado una variedad de reacciones químicas que dan lugar a la síntesis de AgNPs mediante reducción química de una sal de Ag (I) [48-52]. De entre los que merece la pena destacar, la formación de AgNPs a partir de AgNO_3 empleando como agentes reductores polioles [48, 49], ácido ascórbico [50] o monosacáridos [51, 52]. El uso de un agente reductor u otro influye en el tamaño de las NPs obtenidas.

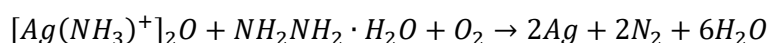
Mediante la **técnica sol-gel** se pueden sintetizar coloides nanoparticulados de Ag. Esta técnica consta de varios pasos: mezclado, gelificación, envejecimiento, secado y sinterizado. En cada una de estas etapas hay muchos factores físicos y químicos que deben estar perfectamente controlados.

Esta técnica permite mejorar considerablemente la velocidad de reacción del óxido de plata (Ag_2O) y la N_2H_4 . A continuación, se presenta el método patentado por **Jixiong y Cheng** [53] para obtener dispersiones coloidales de AgNPs (concentración de Ag comprendida entre 0.001-0.4% en peso) a partir de Ag_2O y de N_2H_4 mediante técnicas sol-gel [53]:

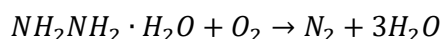
1. Disolución de Ag_2O en una disolución acuosa de NH_3 .



2. Disolución de un agente gelificante en medio acuoso. Formación de un gel que actúe como medio de reacción, impidiendo la formación de agregados de Ag y la precipitación de AgNPs. La concentración del agente gelificante estará comprendida entre 0.2-5 % en peso. Ejemplos de agente gelificante: almidón o derivados del mismo, celulosa, polímeros de acrilato, PVP, ácido algínico, etc.
3. Mezcla del compuesto organometálico de Ag y del gel anteriormente formado.
4. Reacción del compuesto organometálico de Ag y de la N_2H_4 para rendir Ag coloidal.



Puesto que la N_2H_4 presenta una notable toxicidad, tras llevar a cabo la etapa (4) del proceso, durante un periodo aproximado de 0.5-5 horas se somete la dispersión coloidal resultante a la acción oxidativa del oxígeno, el cual se encargará de llevar a cabo la degradación de la N_2H_4 en nitrógeno gas y en agua (H_2O), tal y como se muestra en la siguiente reacción:



Las AgNPs sintetizadas mediante esta técnica tendrán un tamaño de partícula comprendido entre 1 y 100 nm [53].

Por otro lado, se debe indicar que se han desarrollado metodologías para sintetizar AgNPs en ausencia de amoníaco [54], ya que que es perjudicial tanto para la salud como medioambientalmente, a la par que como medio de reacción encarece el proceso de síntesis.

La síntesis de AgNPs tiene lugar en base a la siguiente reacción:



La glucosa actúa de agente reductor, reduciendo el ión de Ag mientras tiene lugar su oxidación a ácido glucónico. Se obtienen AgNPs con un diámetro de 1-100 nm.

En el caso de emplear monosacáridos como agente reductor, se ha desarrollado un método denominado “**síntesis verde**”, por ser más respetuosos con el medio ambiente, ya que disminuyen la utilización de agentes químicos asociados con la toxicidad ambiental de la que comentábamos (ejemplo en la *Figura 7*).

Raveendran y col. [51], obtuvieron AgNPs de aproximadamente 5 nm, provocando la reducción de $AgNO_3$ utilizando como agente reductor la β -D-glucosa, y el almidón como agente de estabilización. Es un método respetuoso con el medio ambiente, a la par que bastante eficiente y emplea sustancias que tienen baja toxicidad y residuos de fácil tratamiento [39].

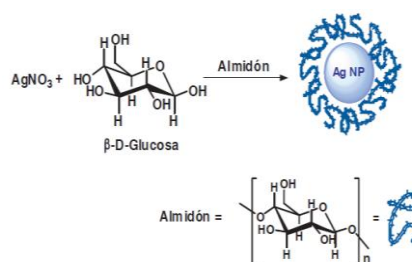


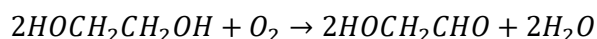
Figura 7: Método de síntesis de AgNPs empleando reactivos respetuosos con el medio ambiente. Figura tomada de [39].

El tamaño de las AgNPs preparadas mediante Ciclodextrina (β -CD) como agente reductor y estabilizante puede controlarse fácilmente, variando la relación molar de β -CD/ $AgNO_3$. Los resultados experimentales mostraron que la superficie modificada por β -CD puede mejorar la actividad catalítica de las AgNPs [52].

En concreto el **Método Poliol**, desarrollado por **Fièvet**, es un método versátil ya que se pueden obtener una amplia variedad de tamaños y formas variando las condiciones de reacción, tales como temperatura, concentración de reactivo y contenido de iones. Es posible conseguir un alto grado de control sobre la nucleación y el crecimiento y, por tanto, sobre los productos finales [47]. En la *Figura 8* se puede observar una serie de morfologías que se han obtenido por este método.

Los disolventes utilizados en este método, pueden ser por ejemplo, el etilenglicol (EG), el 1,2-propilenglicol o el 1,5-pentanodiol. Además, desempeñan la función de agente reductor y estabilizante, previniendo la glomeración de las NPs. En este proceso, el precursor metálico suspendido en el poliol es calentado hasta la temperatura de ebullición del mismo. Durante la reacción, el precursor se disuelve, formando un intermedio que es reducido para generar las AgNPs.

Al encontrarse el agente reductor por separado, es posible tener un control más preciso sobre la reacción, en comparación con la síntesis basada en citrato como agente reductor. Los detalles del mecanismo de reducción se han estudiado recientemente para el sistema basado en EG. Aunque el etilenglicol solo puede reducir un precursor de Ag típico a una temperatura elevada. Tras una investigación más detallada se encontró que el agente reductor primario era el glicolaldehído. Este compuesto se forma cuando el etilenglicol se calienta en presencia de oxígeno (típicamente en el aire), siendo la reacción que tiene lugar la siguiente:



El glicolaldehído, un reductor más fuerte que el EG, se considera el responsable de la reducción del poliol. La identificación del glicolaldehído como agente reductor ayuda a explicar la fuerte dependencia de la temperatura del proceso de poliol. En este trabajo demostraron que la cantidad de glicolaldehído aumentó significativamente a medida que la temperatura para precalentar el etilenglicol aumentó. Esta sensibilidad tiene un gran impacto en la cinética de reducción de un sistema de poliol y, en consecuencia, en la morfología del producto [47].

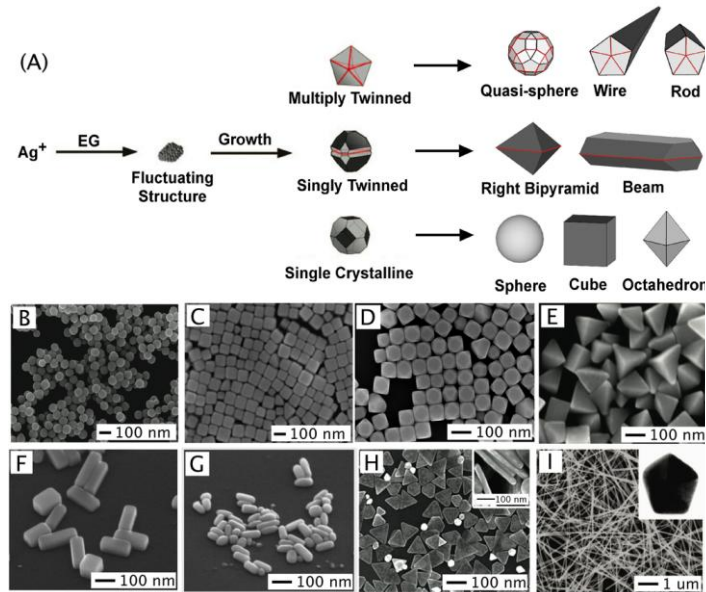


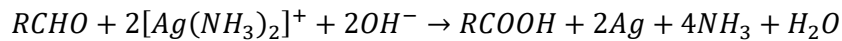
Figura 8: El método poliol para la síntesis de AgNPs. En (A) la reducción de iones Ag^+ por EG conduce a la formación de núcleos que son altamente volátiles. A medida que los grupos Ag crecen, se vuelven más estables y emergen a una de las tres estructuras predominantes: monocristalina, gemela simple y gemela múltiple. En este caso, estos grupos más grandes de átomos de Ag se llaman típicamente semillas, de los cuales crecerán finalmente en nanoestructuras de formas diferentes como esferas (B), (C) cubos, (D) cubos truncados, (E) bipirámidas derechas, (F) barras, (G) esferoides, (H) placas triangulares, (I) alambres [47].

La mayoría de las síntesis de polioles de las AgNPs usan la PVP como un agente estabilizador, porque se ha demostrado que promueve el crecimiento de una variedad de morfologías de partículas de alta calidad. El papel de este polímero en el control de la forma ha sido examinado tanto en la síntesis de nanocables de Ag por medio de un proceso de poliol como en el crecimiento excesivo mediado por semilla de esferas de Ag en un sistema acuoso [47].

El empleo de EG como agente reductor en la síntesis de AgNPs estabilizadas por PVP, conduce a la formación de NPs esféricas con diámetros pequeños, con un promedio de 10 nm aproximadamente. La temperatura ejerce una influencia importante en el control del tamaño de las AgNPs. Este resultado se debe probablemente a que la temperaturas más elevadas se produce un proceso de nucleación-crecimiento más adecuado para la formación homogénea de NPs. Así, la etapa de nucleación es mucho más rápida a altas temperaturas y genera una gran cantidad de núcleos de crecimientos de Ag (nanoclusters) que permiten que la etapa de crecimiento de las NPs transcurra de manera homogénea dando lugar a partículas de tamaño similar.

Guery Saenz y col. [49], reportan en una síntesis de una etapa por medio de reducción química de AgNO_3 , empleando como agente reductor y protector la PVP. Como medio de reducción utilizaron H_2O , un solvente económico y no tóxico, sintetizaron AgNPs con una polidispersidad muy baja y un tamaño de partícula de 30 nm de diámetro [49].

La **síntesis de Tollens** es un método bien establecido durante décadas para obtener AgNPs con un tamaño de partícula controlado. La reacción involucra la reducción de una solución amoniacal de Ag, utilizando varios agentes reductores tales como: el formaldehído, la glucosa, la galactosa, la maltosa y la lactosa. Investigaciones han demostrado que el tamaño de las AgNPs depende fuertemente de la concentración de amonio y del pH del medio durante el proceso de reducción. La reacción que tiene lugar es la que se muestra a continuación:



Por tanto, el proceso de Tollens implica la reducción del complejo $[Ag(NH_3)_2]^+$ por sacáridos, formando así películas de AgNPs con tamaños de partículas que oscilan entre 50-200 nm e hidrosoles con tamaños de partícula entre 20-50 nm y partículas coloidales de Ag de diferentes formas [41].

Como bien hemos comentados con anterioridad el empleo de distintos agentes estabilizantes como aminopropiltrietoxisilano (APS) y posterior hidrólisis con tetraetoxilano (TEOS) o polivinilpirrolidona (PVP), permite la obtención de diferentes tamaños de NPs e incluso nanoprismas de Ag (*Figura 9*).



Figura 9: Síntesis de AgNPs empleando DMF como agente reductor. El empleo del polímero PVP da como resultado NPs o nanoprismas de Ag. Cuando se emplean APS se obtienen AgNPs rodeadas de una capa de sílice. Figura y nota tomada de [39].

Otro polímero de interés en la estabilización de AgNPs son los dendrímeros [55]. Se trata de macromoléculas tridimensionales con estructura arborescente. Este

tipo de moléculas puede estabilizar las AgNPs mediante mecanismos diferentes: el primero consiste en la estabilización estérica mediante la interacción con los grupos funcionales de los dendrímeros dando lugar a una estabilización similar a la de los polímeros no arborescentes; mientras que el segundo método, consiste en la estabilización de AgNPs muy pequeñas en el interior de los dendrímeros lo que produce su encapsulación.

Otro método para sintetizar AgNPs, es mediante **técnicas de microemulsión, el uso de micelas o micelas inversas**. Estas entidades supramoleculares formadas a partir de surfactantes se pueden considerar como nanoreactores en los que se puede producir la reducción de una sal de Ag en presencia de un agente reductor químico como ácido ascórbico, NaBH_4 o $\text{N}_2\text{H}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [46].

El procedimiento para generar AgNPs a partir de éste método consiste en mezclar dos microemulsiones, una con una sal de Ag y la otra con el agente reductor. Luego de mezclar estas dos microemulsiones las colisiones entre las microgotas de H_2O dispersas dan lugar a la reacción de la Ag iónica con el agente reductor.

Algunos de los surfactantes más empleados en la síntesis de NPs son CTAB (Bromuro de cetil trimetil amonio) y AOT (bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio). Cuando se emplea el surfactante AOT en una mezcla dodecano/ H_2O se pueden sintetizar AgNPs por reducción de AgNO_3 con N_2H_4 en el interior de las micelas inversas formadas (ver *Figura 10*).

Resulta ser una técnica viable y atractiva, ya que se pueden sintetizar NPs con una distribución de tamaño estrecha, además de que el tamaño puede ser fácilmente controlado mediante la variación de la composición de la microemulsión.

Zhang Wanzhong y col. [56], así lo hicieron en sus experimentos. Estudiaron los efectos de la concentración de los precursores y las proporciones molares de agua a AOT sobre el tamaño de la partícula y la distribución de tamaños. Obtuvieron AgNPs esféricas con un rango medio de 2-5 nm de diámetro. Como resultado, se obtienen coloides de AgNPs que tienen una estabilidad favorable y se puede conservar durante mucho tiempo sin precipitación [56].

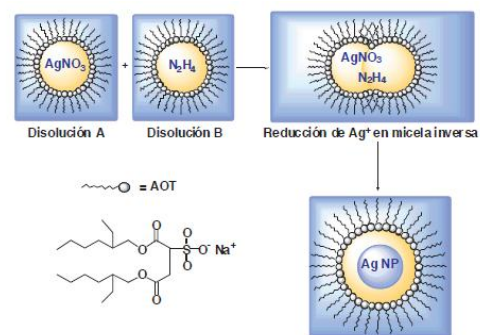


Figura 10: Producción de AgNPs mediante micelas inversas de AOT formadas en una mezcla dodecano/ H_2O . Figura y nota tomada de [39].

El grupo de investigación de la Profesora Murphy [57] ha desarrollado un método de síntesis de nanoestructuras de Ag unidimensionales (nanobarras o nanocables), como se puede ver en la *Figura 11*, empleando micelas formadas con el surfactante CTAB en un proceso en dos pasos denominado "seed-mediated growth" (crecimiento dirigido por sembrado) [39].

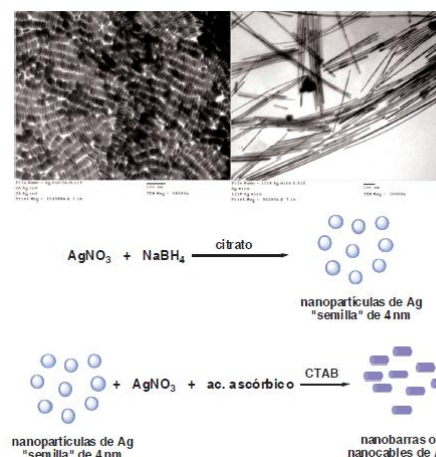


Figura 11: Síntesis de nanobarras y nanocables de Ag empleando micelas de CTAB. Figura y nota tomada de [39].

En cuanto al **método organometálico** merece especial atención, nombrar el grupo del *Dr. Chaudret*, ya que lo han estudiado ampliamente para las síntesis de NPs de un gran número de metales y óxidos metálicos. Este método consiste en el empleo de precursores organometálicos en los que el metal se encuentra en bajo estado de oxidación y que pueden descomponerse bajo condiciones de reacción suaves, es decir, de forma espontánea o mediante el empleo de un gas reductor, evitando así el empleo de agentes reductores fuertes. Esta metodología basada en la descomposición controlada de complejos organometálicos mediante ruptura de enlaces metal-ligando, da lugar a centros metálicos desnudos y ligandos libres por separado, evitando así, en gran medida, la contaminación de la superficie de las NPs y permitiendo, además, un mayor control de la cinética de reacción [39].

Este método da lugar a la formación de AgNPs con un elevado control sobre su tamaño y forma mediante el empleo de precursores organometálicos susceptibles de descomponerse en condiciones muy suaves de reacción, y agentes químicos estabilizantes como polímeros, ligandos alquílicos de cadena larga o sustratos inorgánicos. Un buen agente estabilizante es crucial puesto que como ya hemos comentado con anterioridad, permite evitar los procesos de agregación descontrolada de AgNPs, permitiendo producir un alto control sobre la morfología de las nanoestructuras obtenidas. (*Figura 12*) [13].

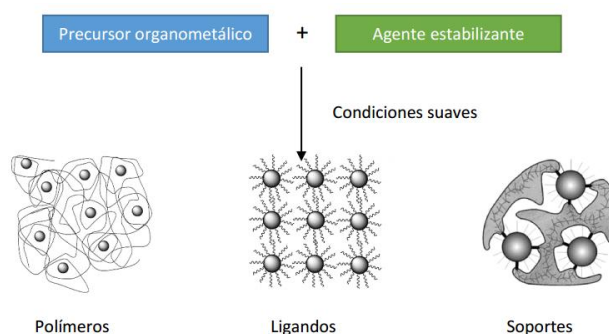


Figura 12: Representación del método organometálicos para la obtención de MNPs, mediante la estabilización de las partículas utilizando polímeros, ligandos alifáticos de cadena larga o materiales inorgánicos. Figura tomada de [13].

El método de **deposición química de vapor** (CVD, de sus siglas en inglés, *Chemical Vapor Deposition*). Es una técnica que consiste en la atomización de materiales sólidos a partir de precursores en fase vapor. Implica la reacción entre los precursores volátiles del material a depositar y diferentes gases reactivos y tiene como resultado la formación de sólidos no volátiles que se depositan sobre un sustrato en forma de pequeñas partículas o formando capas finas.

Entre sus principales ventajas destacan la obtención de NPs de alta pureza, generación de NPs de forma rápida y continuada en un proceso automatizable y que permite controlar el tamaño y la forma de las NPs. Por el contrario, en muchos casos es necesario, el uso de precursores peligrosos, ya sea por su toxicidad, inflamabilidad, explosividad o corrosividad, etc. Es un proceso basado en una reacción química y compleja, debido a que suelen intervenir compuestos multiespecie en las reacciones, se lleva a cabo en varias etapas y a alta temperatura, se producen productos intermedios y el crecimiento de las NPs está sujeto a muchas variables independientes (flujo, presión parcial, presión del sistema,...) [58].

La **termólisis**, se lleva a cabo por la descomposición de sólidos a altas temperaturas, por este proceso se pueden obtener diversas formas de AgNPs, con tamaños inferiores a 5 nm. Por lo general, la termólisis permite degradar compuestos orgánicos como carbonilos, acetatos y acetilacetatos empleando disolventes con puntos de ebullición altos [16]. **Kashiwagi y col.** [59] en sus investigaciones recurrieron a la termólisis controlada utilizando alquilcarboxilatos de Ag con alquilaminas primarias para la obtención de AgNPs. El proceso se lleva a cabo sin la presencia de disolvente, por lo que se ve favorecido por ser un proceso más limpio. Obtuvieron AgNPs de tamaño pequeño (2.8-15.4 nm). Los autores llegaron a la conclusión que el tamaño y la dispersabilidad de las NPs dependen de la longitud de la

cadena alquílica de los precursores, alquilcarboxilatos y alquilaminas. Es un método que presenta ventajas sobre otros métodos, ya que es una técnica que se puede adaptar a gran escala y un bajo costo, resultando por tanto un método sintético fácil de obtención de AgNPs [59]. El empleo de altas temperaturas permite emplear los ligandos alquílicos de cadena larga como disolvente y agente estabilizante al mismo tiempo. Utilizando un método de inyección rápida de un compuesto organometálico como $[Ag(Mes)]_4$ (Mes=mesitol) en una disolución de hexadecilamina a 300 °C se pueden obtener AgNPs de unos 9 nm de diámetro [39].

3.2. Métodos físicos.

Los principales procesos de síntesis de AgNPs por métodos físicos son: **evaporación-condensación, ablación por láser pulsante (PLD), técnica del arco de descarga, magnetron sputtering, irradiación con microondas, síntesis sonoquímica, métodos electroquímicos, técnica ultrasónico spray pirólisis, reducción fotoquímica...**

En este apartado se clasifican diferentes fuentes de producción de energía, que en la formación de sistemas nanoestructurados ayudan a la generación de partículas con diversas formas y tamaños.

Generalmente la síntesis de AgNPs por métodos físicos se efectúa por procesos de **evaporación-condensación**. Para la obtención de AgNPs es un método que aunque es uno de los más sencillos y mejor controlados, presenta algunos inconvenientes. Principalmente el horno tubular ocupa mucho espacio y consume una gran cantidad de energía, además de incrementar la temperatura ambiental alrededor del proceso, con lo que se requiere de mucho tiempo para conseguir una estabilidad térmica [60].

Un método físico novedoso que permite seleccionar y controlar el tamaño de las NPs en sistemas coloidales es la técnica de **Ablación por Láser Pulsado (PLD**, por sus siglas en inglés *Pulse Laser Ablation*) [61]. La síntesis mediante este sistema utiliza un láser de alta potencia dirigido a un blanco sólido (en forma de disco), que se encuentra sumergido en un líquido junto con los precursores. La incidencia del láser provoca que el blanco se caliente en el punto focal y éste a su vez promueve la reacción entre los precursores, generando diminutas partículas. Las propiedades de las AgNPs obtenidas y el rendimiento de la ablación dependen de muchos factores, como las características del láser (energía, potencia máxima, frecuencia de oscilación, longitud de onda λ), la duración de los impulsos láser (en el régimen femto, pico y nanosegundos), la fluencia del láser, la duración del tiempo de ablación y el medio

líquido con o sin presencia de tensioactivos [62]. Mediante esta técnica se pueden producir de 2-3 g/min de AgNPs [38]. Por esta técnica se pueden obtener AgNPs esféricas con un tamaño de 2-5 nm [63].

Técnica del arco de descarga, por esta técnica investigadores han podido obtener AgNPs con un tamaño inferior a 10 nm evitando el uso de agentes tensioactivos, utilizando electrodos de Ag en H₂O desionizada [64].

Magnetron sputtering, es un método muy versátil, pudiéndose obtener AgNPs con un diámetro medio de 10 nm. El proceso consiste en el bombardeo iónico del material, denominado blanco, con iones procedentes de un gas ionizado por acción de un campo eléctrico a baja presión. Es un método que se realiza en un único paso, además de ser fácilmente automatizable, lo que lo hace factible a escala industrial. No requiere de reacciones químicas, es por tanto, no contaminante. Se obtienen NPs de alta pureza, con un control muy bueno del tamaño de estas [58].

Las técnicas de **microondas** [65] resultan ser también un procedimiento ventajoso y atractivo para la preparación de AgNPs, ya que el calentamiento homogéneo favorece la nucleación de las partículas metálicas y por lo tanto reduce en gran medida el tiempo de reacción. La irradiación con microondas conlleva obtener nanoestructuras estables, de tamaño pequeño y distribución uniforme.

El **método sonoquímico**, consiste en la aceleración de reacciones químicas a través de ondas de ultrasonido. El efecto sobre la velocidad de reacción química de la radiación ultrasónica recae sobre el fenómeno de la cavitación, el cual crea “puntos calientes” en el micro ambiente, elevando la temperatura y presión de forma importante (hasta 5000°K y 1800atm, respectivamente). Estas condiciones extremas pueden ser aprovechadas para la fabricación de materiales con estructuras y propiedades diferentes. Por este método se pueden obtener AgNPs altamente monodispersas, en el que Ag⁺ en una disolución etanólica de AgNO₃ se redujo por irradiación con ultrasonidos en presencia de benzilmercaptano sin tener que introducir otros reactivos reductores o protectores. Además del efecto estabilizante, el benzilmercaptano mejoró notablemente la tasa de reducción [16].

Elsupikhe y col. [66] han desarrollado un método “sonoquímico verde” para la preparación de AgNPs en diferentes concentraciones de carragenano kappa (κ-carragenano), ver *Figura 13*.

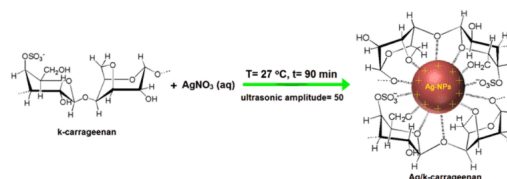


Figura 13: Diagrama esquemático que ilustra la interacción entre los grupos cargados de AgNPs que están rodeados de κ-carragenano. Figura y nota tomada de [66].

El κ -carragenano³ se utilizó como un estabilizador ecológico natural, y la irradiación ultrasónica se utilizó como un agente reductor verde. Se determinó un aumento de AgNPs con el aumento de la concentración de κ -carragenato [66].

En lo que respecta a la **síntesis electroquímica**, *Reetz y Helbig*, fueron los primeros en reportar dicha técnica para la síntesis de NPs; donde una hoja metálica es disuelta anódicamente en un disolvente aprótico. De acuerdo **con Rodríguez-Sánchez y col.** [67], este procedimiento permite obtener AgNPs de alta pureza y con tamaños inferiores a 10 nm, así como controlar su tamaño mediante el ajuste de la densidad de corriente. Sin embargo, señalaron que también tienen sus limitaciones, la deposición de Ag en el cátodo durante el proceso electroquímico disminuye la superficie efectiva para la producción de NPs [67].

Ultrasónico Spray Pirolisis, (**USP**, de sus siglas en inglés, Ultrasonic Spray Pyrolysis) es una técnica sintética simple de aerosol, ampliamente utilizada para la síntesis de los nano-materiales como películas delgadas o NPs. Debido a su fácil viabilidad, flexibilidad y rentabilidad, el método USP es una importante alternativa a la deposición de vapor químico (CVD). Los precursores de la técnica se preparan a menudo por la ruta sol-gel. La composición de las NPs sintetizadas o la película puede modificarse fácilmente mediante cambios de los parámetros de procesamiento.

Mediante este método, se puede tener control total sobre los parámetros de proceso más importantes tales como: amplitud ultrasónica, solución precursora, composición precursor/viscosidad, tasa de flujo, temperatura de deposición o temperatura del sustrato [68].

La **síntesis fotoquímica** es un proceso limpio, con alta resolución espacial, comodidad de uso y gran versatilidad. Se lleva a cabo por la aplicación de radiaciones con diversas longitudes de onda, tales como rayos gamma γ , láser de ión Ar, láser Nd:YAG, luz visible y luz ultravioleta. Esta técnica permite fabricar los NPs en diversos medios incluyendo células, emulsión, películas de polímero, micelas de tensioactivos, cristales, etc [44].

³ La carragenina es un polímero natural económico, que se encuentra en varias especies de algas rojas. Carragenatos son polisacáridos sulfatados lineales que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria, para gelificar, espesar, estabilizar propiedades. Su principal aplicación es en productos lácteos y carne, debido a su fuerte unión a las proteínas alimentarias. La κ -carragenina se encuentra como aditivo en helado, crema, queso, batidos, aderezos para ensaladas, salsas, leche condensada, leche de soja y otras vegetales.

El método fotoinducido podría utilizarse para convertir nanoesferas de Ag en nanocristales de Ag triangulares (nanoprismas) con longitudes de borde deseadas en un rango de 30-120 nm, consiguiendo con un número mayor de bordes aumentar las propiedades características de las NPs. El proceso de crecimiento de partícula se controla usando iluminación de haz doble de NPs. El proceso de foto-reducción directa de AgNO₃ en presencia de citrato de sodio (NaCit) se realiza con diferentes fuentes de luz (UV, blanco, azul, verde y naranja) a temperatura ambiente [19]. Al igual que en otros métodos, la disolución de surfactante ayuda a llevar a cabo el proceso de crecimiento de AgNPs por control difusional disminuyendo la difusión o el coeficiente de transferencia de materia de los cationes de Ag. También ayuda a mejorar las distribuciones de tamaños de las NPs, aumentando la tensión superficial en la interfaz solvente-NPs.

3.3. Métodos biológicos.

Debido al impacto que tienen las síntesis propuestas con anterioridad (química y física) con el medio ambiente, en la actualidad se están desarrollando métodos y buscando nuevas alternativas para la producción de AgNPs que sean más amigables con la naturaleza. Estos métodos de síntesis los podemos describir como procesos biológicos, donde las biomoléculas sustituyen a los agentes reductores y estabilizantes convencionales, utilizándose pétalos de flores o plantas (algas, levaduras, hongos y bacterias) para lograr la reducción de los iones metálicos. **Anil y col.** [69] utilizaron la bacteria *Shewanella oneidensis* (un agente reductor del metal) para la biosíntesis de las AgNPs, utilizando la disolución de AgNO₃ como precursor. Obtuvieron AgNPs esféricas y prácticamente monodispersa, en el intervalo de tamaño 2-11 nm. Este método de síntesis basado en bacterias es económico, simple, reproducible y requiere menos energía en comparación con las vías de síntesis química [69]. En otro estudio, se utiliza el hongo *Trichoderma viride* para la biosíntesis extracelular de AgNPs a partir de disolución de AgNO₃ como precursor. Obtuvieron AgNP con geometrías variables y tamaños en el intervalo de 5-40 nm. Queda latente en la investigación, que el *T. viride* demuestra ser un componente biológico importante para la biosíntesis extracelular de AgNPs estables [70]. Además, usando bacterias aerotransportadas como las *Bacillus sp.* y AgNO₃ se sintetizaron AgNPs estables de 5-15 nm de tamaño. Las AgNPs biosintetizadas se recogieron de la región periplásmica⁴ de la célula bacteriana [71].

⁴ Región periplásmica: espacio entre la membrana externa e interna.

En otro estudio publicado por **Venkata Subbaiah y Savithramma** [72], investigaron que las AgNPs también pueden ser sintetizadas a partir de hojas de *Cadaba Fruticosa*⁵ usando AgNO_3 como precursor. Las NPs sintetizadas biológicas fueron muy potentes contra los microbios [72].

Cabe mencionar, alguna patente para dar indicación de su uso industrial, por ejemplo, la patente US8394421B2 “*Synthesis of nanoparticles by fungi*”, esta patente trata sobre la biosíntesis de las AgNPs usando un hongo, que es medioambientalmente amigable e industrialmente abundante, llamado *T. Reesei* [73]. Otro ejemplo, la patente US7052765 B2 “*Method for manufacturing antibacterial polyester master batches and fibers both containing nano-silver particles*”, en ella se muestra cómo desarrollar grana y fibras de poliéster aditivadas con AgNPs, a fin de conferir a ambos materiales propiedades antibacterianas [74].

A nivel industrial, se pretende el desarrollo de técnicas de síntesis con altos rendimientos y que además, no genere una gran cantidad de productos secundarios de difícil gestión medioambiental.

La preparación de AgNPs por métodos químicos nos permiten reproducir el proceso a gran escala y por tanto obtener un rendimiento importante de NPs, así como obtenerlas con una distribución de tamaño estrecha (monodispersas) y homogéneas. La estructura, tamaño y forma se pueden controlar variando simplemente las condiciones de preparación. Sin embargo en el proceso de síntesis, se eliminan demasiados subproductos tóxicos y peligrosos y se pueden obtener AgNPs que no sean del todo puras, por lo que requieren un paso más para la prevención de la agregación de partículas. En cambio a la hora de producir AgNPs los métodos físicos son más rápidos y no requieren de tantos productos químicos peligrosos, como en la síntesis química. También se obtienen NPs de tamaños controlados y uniformes, pero son procesos más caros, ya que requieren equipos altamente costosos, por lo que no se reproducen a gran escala como ocurre con los químicos. Sin duda alguna los métodos biológicos son más amigables con el medio ambiente, ya que no utilizan productos tóxicos, pero no son reproducibles a gran escala, aunque se obtienen partículas de alta calidad aún se encuentran en fase de desarrollo para obtenerlos a mayor escala y obtener con ellos grandes cantidades de NPs.

⁵ Cadaba Fruticosa: es un género de plantas con flores.

CAPÍTULO 4:

4. Técnicas fisicoquímicas de caracterización de las AgNPs.

La caracterización de las AgNPs es una etapa fundamental para comprender y controlar la síntesis, así como conocer las aplicaciones posteriores que se les pueden atribuir. Para ello se utilizan una amplia variedad de técnicas instrumentales diferentes tales como: Espectroscopia de absorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis), Microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM, SEM), Microscopía de fuerza atómica (AFM), Difusión de luz dinámica (DLS), Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS), Difracción de rayos X (XRD), Espectroscopia de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR), Resonancia magnética nuclear (RMN), también siendo posible por la espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y espectroscopía de absorción atómica (FAAS) [24].

A través de estas técnicas podemos obtener información de parámetros como: composición, estructura, topología, morfología, cristalinidad, tamaño del poro, entre otras. Todo ello por la interpretación de la interacción de una señal (eléctrica, luminosa, térmica, etc) en una porción del material a caracterizar.

4.1. Propiedades ópticas y análisis elemental.

4.1.1. Espectroscopia de absorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis).

La *espectroscopia de absorción de luz Ultravioleta-Visible (UV-Vis)* es una de las técnicas más ampliamente utilizada para la caracterización primaria de las NPs sintetizadas, además, también se utiliza para controlar la síntesis y estabilidad de las AgNPs. Es una técnica rápida, sencilla y aplicable a diferentes tipos de NPs. Se basa en la absorción de radiación ultravioleta y visible por el analito, como consecuencia de lo cual se origina un estado activado que posteriormente elimina su exceso de energía en forma de calor.

Como bien hemos comentado con anterioridad, las AgNPs poseen propiedades ópticas que las hacen interactuar fuertemente con longitudes de onda específicas de la luz [75]. La espectroscopia UV-Visible es una técnica sensible a la presencia de coloides de Ag debido a que estas NPs presentan un pico de absorción intenso por la excitación de plasmones superficiales.

En las AgNPs, la banda de conducción y la banda de valencia se encuentran muy próximas entre sí, lo que facilita que los electrones se muevan libremente. Estos electrones libres dan lugar a una resonancia de plasmón de superficie (SPR), que se produce debido a la oscilación colectiva de los electrones de las AgNPs en resonancia

con la onda de luz. Cuando la frecuencia del campo electromagnético se hace resonante con el movimiento coherente de electrones, se produce una fuerte absorción (produciéndose un cambio de color). Los espectros de absorción que se obtienen, se centran en la banda de SPR. La posición y la forma de esta banda están influenciadas por diferentes factores tales como el medio circundante, el tamaño, la forma, la polidispersidad de las partículas y las sustancias adsorbidas en sus superficies [76]. La aparición de un pico de absorción alrededor de los 400-450 nm es un indicativo de la presencia de AgNPs [77]. La emisión de un pico a 400 nm corresponde a AgNPs de menos de 5 nm de diámetro, mientras que si el pico de absorción se desplaza a 420 nm, el tamaño predominante de las AgNPs es de alrededor de 20 nm [16].

4.1.2. Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier (FTIR).

La *espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier* (FTIR) utiliza la interacción de la radiación infrarroja con la materia para obtener información sobre la estructura molecular, utilizándose con frecuencia para averiguar si las biomoléculas están involucradas en la síntesis de AgNPs. La FTIR es una técnica capaz de proporcionar exactitud y reproducibilidad, con una relación señal-ruido favorable. Mediante el uso de la espectroscopía FTIR, es posible detectar pequeños cambios de absorbancia del orden de 10^{-3} , lo que ayuda a que la caracterización sea más precisa [24]. El principal uso en la caracterización de las AgNPs es detectar las especies químicas enlazadas a la superficie, así como estudiar las reacciones de oxidación sobre su superficie [16].

4.1.3. Espectroscopía fotoelectrónica de Rayos (XPS).

La *espectroscopía fotoelectrónica de rayos X* (XPS, de sus siglas en inglés, X-ray photoelectron spectroscopy) es una técnica espectroscópica cuantitativa de análisis químico de superficie. El análisis proporciona información sobre la composición elemental, el estado químico de cada elemento, la posición de los átomos con respecto a la estructura cristalina del material, la homogeneidad superficial y el estado de adsorbatos. XPS también se conoce como espectroscopia de electrones para el análisis químico (ESCA). Se realiza en condiciones de alto vacío [24]. Esta técnica permite medir el estado de oxidación del elemento metálico y determinar las energías de enlace de la plata reducida, pudiéndose observar la efectividad del método de reducción seguido para la formación de AgNPs [78].

4.1.4. Espectroscopía de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y espectroscopía de absorción atómica (FAAS).

Otras técnica como la *espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo* (ICP) y la *espectrometría de absorción atómica* (FAAS) permiten determinar la concentración del metal en la muestra. En la *Figura 14* se puede observar una ilustración del conjunto de las técnicas.

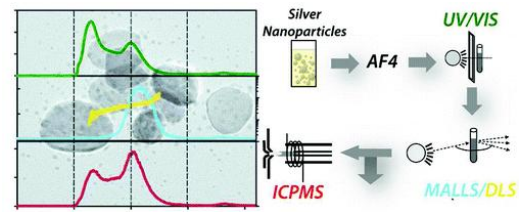


Figura 14: Figura tomada de [79].

Debido a que las AgNPs presentes en una misma muestra pueden tener diferentes composiciones y pudiendo presentar polidispersidades, es necesaria la caracterización combinando distintas técnicas que sean capaces de aportar información para el mejor estudio de las mismas. En un trabajo se publicó una comparación entre la caracterización de los productos de AgNPs. Una combinación con un método para distinguir y cuantificar las partículas y las fracciones de Ag disueltas mediante *fraccionamiento de flujo de campo asimétrico* (A4F), seguido de un UV-Vis y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), para la validación de los datos se compararon los datos con la técnica TEM y DLS [79].

4.1.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es un método espectroscópico de análisis no destructivo, que se basa en la absorción de energía de radiación electromagnética (del orden de las radiofrecuencias) por núcleos atómicos que tienen un momento magnético. Dicha absorción ocurre a frecuencias características que dependen del spin nuclear (^1H , ^{13}C , etc.) y del entorno molecular en el que se encuentran y sólo tiene lugar en presencia de un campo magnético intenso. Esta técnica se utiliza para la determinar la corona orgánica de las AgNPs [80].

4.2. Morfología.

Los microscopios electrónicos son una de las técnicas más comúnmente utilizadas para la caracterización de las AgNPs. Nos permiten observar su forma, tamaño, rugosidad y cristalinidad. Operan con los principio básicos de un microscopio óptico, pero usando un haz de electrones en lugar del haz de luz visible, ya que éstos tienen una λ mucho menor, lo que hace posible llegar a resoluciones mucho mayores que un microscopio óptico.

Estos microscopios cuentan con un cañón de electrones, una serie de lentes magnéticas que crean campos que dirigen y enfocan el haz de electrones hacia la muestra, y un sistema que registra las imágenes que producen los electrones al interactuar con la muestra. Una parte importante de un microscopio electrónico la constituye el sistema de vacío necesario para que los electrones no puedan ser desviados por las moléculas de aire.

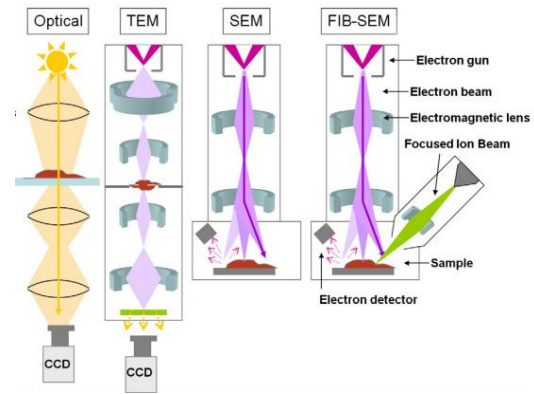


Figura 15: Principios de la imagen por microscopía óptica en comparación con las técnicas microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM) y haz de iones enfocados (FIB)-SEM. Figura y nota tomada de [81].

Su alta resolución los convierte en una opción muy frecuente en la visualización y caracterización de los NMs.

4.2.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La *microscopía electrónica de transmisión* (TEM, de sus siglas en inglés, transmission electron microscopy) es una técnica ampliamente utilizada para completar la caracterización estructural de las AgNPs, permitiendo obtener imágenes que aportan información del tamaño, morfología y estado de agregación de estas NPs (*Figura 16 derecha*). El microscopio electrónico de transmisión utiliza un haz de electrones de alta energía (80-300keV) con una longitud de onda comprendida entre 0.001 y 0.1 nm. Estos electrones se transmiten a través de una capa muy delgada de la muestra, dando lugar a electrones transmitidos, otra parte se dispersa y otra da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos, tales como, emisión de luz, electrones secundarios, rayos X, etc. Este microscopio emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de las muestras [81]. Se pueden obtener dos tipos de imágenes: campo oscuro, y campo claro. Las imágenes en campo claro son producidas por electrones que se propagan a través de la muestra, mientras que, en campo oscuro la imagen es producto de los electrones difractados. El TEM de campo claro se utiliza ampliamente en la investigación de alimentos (por ejemplo, en estudios sobre el análisis morfológico y dimensionamiento de nanoestructuras de alimentos, como pueden ser, almidones y micelas de caseína).

En cuanto a la preparación previa de la muestra para su observación en TEM, es necesario realizar una dispersión de las AgNPs en un disolvente y dejarlas secar

sobre una rejilla cobre con recubrimiento de carbono [81]. Con lo que dicha técnica requiere especial y sumo cuidado en una buena preparación de la muestra [82].

4.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

En *microscopio electrónico de barrido* (SEM, de sus siglas en inglés, scanning electron microscopy,) está equipado con diversos detectores, entre los que se pueden destacar: el detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución, el detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie, y un espectrómetro de energía dispersiva que permite colectar los rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis semicuantitativo y de distribución de elementos en superficies (*Figura 16 izquierda*). El microscopio electrónico de barrido utiliza un haz de electrones de energía baja (1-30 keV).

Esta técnica se utiliza para la obtención de imágenes de la superficie de la muestra, proporcionando imágenes con una resolución de gran profundidad de toda la zona de la micrografía enfocada. Permite determina aspectos morfológicos y tamaño de las AgNPs. En un enfocado por haz de iones (FIB-SEM), el haz de iones puede cortar el material pudiendo así, seleccionar muestra y obtener la imagen en 3D [82].

Su principal ventaja es la sencilla preparación de la muestra, que aunque las muestras SEM no necesitan ser tan delgadas como las de TEM, para evitar la acumulación de carga electrostática en ésta durante la irradiación, la muestra, o al menos la superficie de ésta, debe ser conductora, por lo que muchas veces hay que recubrir la muestra con una capa de material conductor, con el riesgo de que se pierda parte de la información de la superficie.

La técnica más reciente de SEM consigue una alta resolución, capaz de identificar la morfología de las NPs por debajo del nivel de 10 nm [24]. La combinación de SEM con espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (EDX) puede utilizarse para examinar la morfología del polvo de Ag y también para realizar análisis de composición química [24].

Tanto las técnicas TEM y SEM convencionales, necesitan un tratamiento complejo previo de preparación de las muestras, en menor o mayor medida, para que las muestras puedan insertarse en la cámara de vacío del microscopio electrónico. Estos problemas pueden solventarse en parte, mediante el uso de SEM medioambiental (ESEM) y TEM medioambiental (ETEM), donde es posible mantener un vapor más alto alrededor de la muestra, permaneciendo hidratadas, mientras se obtienen las imágenes [82].

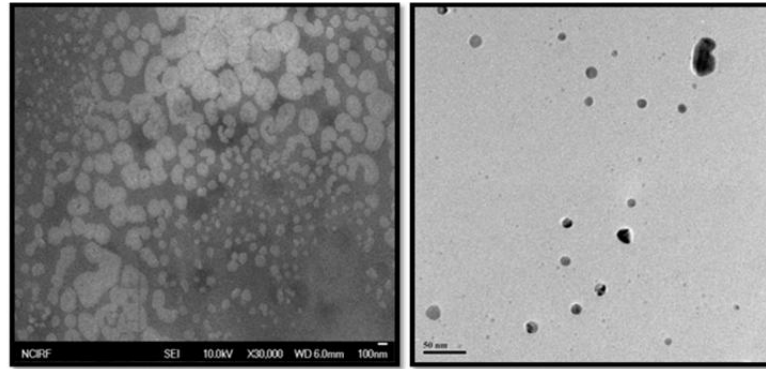


Figura 16: Podemos observar a la izquierda imagen SEM de AgNPs, y a la derecha imagen de TEM de AgNPs. Figura y nota tomada de [23].

4.2.3. Microscopía de fuerzas atómicas (AFM).

En general, la microscopía de fuerzas atómicas (AFM, de sus singlas en inglés, atomic force microscopy) se utiliza para investigar la dispersión y agregación de los AgNPs, además de su tamaño, morfología y estructura. El AFM es una de las pocas herramientas capaz de brindar información espacial acerca de una superficie en las coordenadas X, Y y Z con suma precisión en la escala nanométrica. Por ejemplo, la adsorción de materiales sobre la superficie, la erosión de una superficie o cambios en la rugosidad por la acción de un agente pueden ser cuantificados mediante esta técnica. Por lo general, puede operar bajo distintos regímenes de fuerzas, de acuerdo al modo de operación elegido: contacto, no contacto o intermitente (que deben de ser escogidos según las condiciones de operación adecuadamente). Sin embargo, un inconveniente importante es la sobreestimación de las dimensiones laterales de las muestras, por lo que es necesario prestar especial atención para evitar errores en la medición [24].

4.3. Análisis estructural.

4.3.1. Difracción de Rayos X (XRD).

La técnica de *difracción de rayos X* (XRD, de sus siglas en inglés, X-ray diffractometry) permite identificar y caracterizar estructuras de naturaleza cristalina. Normalmente, se combina con TEM o SEM para dar una distribución elemental de las AgNPs. Este método está basado en la interacción de una onda electromagnética de rayos con la nube electrónica de los átomos de un sólido cristalino, cuyos parámetros de celda⁶ son del orden de magnitud de la longitud de onda de la radiación incidente.

⁶ Parámetros de celda hace referencia a la distancia constante de las celdas unitarias o “dimensiones de cada celda” con respecto a su estructura cristalina.

Parte de esta radiación es absorbida y posteriormente devuelta en forma de radiación dispersada en todas las direcciones del espacio. Las distintas radiaciones dispersadas sufren fenómenos de interferencia que, únicamente, son constructivas en direcciones muy bien definidas, dando lugar al difractograma del cristal. Las condiciones necesarias para que se produzca la difracción vienen determinadas por la *Ley de Bragg*.

Los componentes básicos de un equipo de difracción de rayos X son: una fuente (del haz de radiación), un dispositivo encargado de seleccionar el intervalo de longitud de onda de la radiación incidente, un soporte para la muestra, un detector de radiación o transductor y un dispositivo de lectura.

El método analítico de la difracción de rayos X del polvo al azar o de Debye-Scherrer consiste en irradiar con rayos X sobre una muestra formada por multitud de cristales colocados al azar en todas las direcciones posibles. **Rong He y col.** [83] así lo hicieron en su trabajo, determinaron las estructuras de los coloides de Ag (*Figura 17*) por difracción de rayos X en polvo con patrones de difracción de rayos X con radiación Cu-Ka ($L\sim 0.15542$ nm).

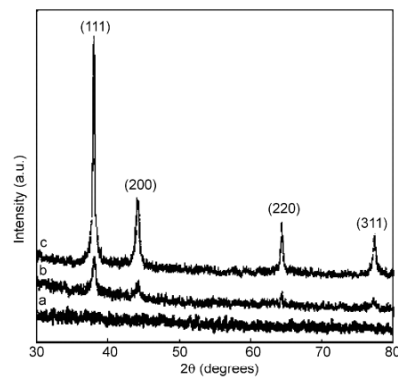


Figura 17: Patrones XRD del coloide de Ag preparado en diferentes disolventes: a) Etanol y piridina, b) DMF, d) N-metil-2-pirrolidona. Figura y nota tomada de [83].

Obtuvieron diferentes morfologías de AgNPs (esféricas y nanoprismas) con diferentes colores en función del disolvente utilizado, como se puede observar en la *Figura 18* [83].

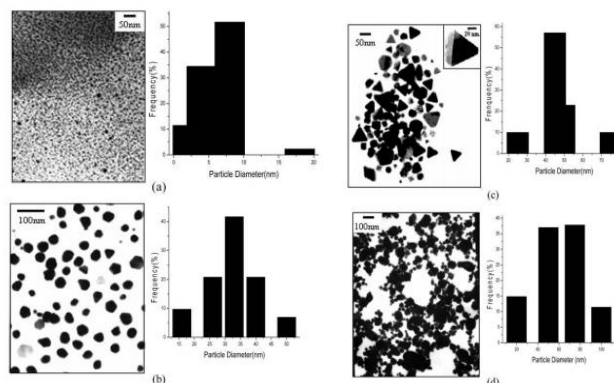


Figura 18: Imágenes TEM y distribución de tamaños en histogramas de las AgNPs en diferentes disolventes: a) Piridina, b) etanol, c) DMF, d) N-metil-2-pirrolidona. Figura y nota tomada de [83].

4.3.2. Dispersión dinámica de luz (DLS).

La *dispersión dinámica de luz* (DLS, de sus siglas en inglés, dynamic light scattering), se encuentra entre las técnicas más importantes, y comúnmente utilizadas para la caracterización de AgNPs. Es una técnica no destructiva, la cual permite determinar el radio hidrodinámico⁷.

La DLS es un método que depende de la interacción de la luz con las partículas. Analiza la intensidad de luz dispersa en función del tiempo, para determinar el tamaño hidrodinámico de las partículas. Este método puede utilizarse para la medición de distribuciones estrechas de tamaño de partícula, especialmente en el rango de 2-500 nm.

Para esta técnica es necesario conocer la viscosidad de la fase dispersante, así como, mantener la temperatura constante durante toda la medición. El radio hidrodinámico es afectado por los iones presentes en el medio y las modificaciones superficiales, ya que esto varía la velocidad de difusión de las partículas dispersas. El tamaño obtenido de DLS es generalmente más grande que TEM, que puede ser debido a la influencia del movimiento browniano. Tiene la ventaja especial de sondear una gran cantidad de partículas simultáneamente [24].

CAPÍTULO 5:

5. Toxicidad de las AgNPs.

Como ya hemos comentado con anterioridad, la aplicación de AgNPs está en plena expansión ya que se encuentran hoy día en multitud de aplicaciones en la vida cotidiana, debido a las características que poseen, pero sobre todo a su efecto antimicrobiano. Es por ello, que es importante y necesario investigar sobre las implicaciones toxicológicas que conllevan su empleo, tanto en la salud humana como en el medio ambiente.

La exposición humana, pueden tener lugar a través de los alimentos, el aire y por contacto con la piel, pudiendo causar consecuencias perjudiciales y graves afecciones en la salud. A pesar de la poca información, estudios in vivo e in vitro ponen de manifiesto que las AgNPs producen una toxicidad determinada en una variedad de órganos, incluyendo pulmones, cerebro, riñones, teniendo su principal acumulación en el hígado [80].

⁷ Radio hidrodinámico: tamaño de la NP, núcleo+corona+capa de disolvente.

Para determinar la inocuidad o la peligrosidad (ya que pueden originar en mayor o menor medida contaminación en función de la metodología adoptada, así como, la utilización de sustancias químicas secundarias perjudiciales para la salud y el medio ambiente), *caracterización e identificación* para poder estudiar los posibles efectos tóxicos presentes, *distribución y comportamiento* en los tejidos y fluidos biológicos una vez ingeridos [84].

Además, es muy importante considerar la posible transferencia de las AgNPs a los alimentos, aunque los envases que contengan AgNPs como recubrimiento antibacteriano, antes de su comercialización deben estar incorporados en el REACH. Por ello, algunos científicos y el REACH-Reglamento (CE) nº 1907/2006, sugieren que la evaluación del riesgo potencial de las NPs debe realizarse caso por caso de forma individual, teniendo en cuenta el NM, su tamaño y si van a ingerirse como tal, ya que entonces serían necesarios estudios de toxicidad y genotoxicidad⁸ apropiados [80].

Diversas investigaciones han confirmado que existen una serie de propiedades físico-químicas de las AgNPs que están involucradas en su toxicidad intrínseca, como son principalmente: [80]

- ❖ *Tamaño*, presentándose mayores efectos tóxicos las de menor tamaño.
- ❖ *Superficie específica*, estrechamente ligada con el tamaño de la NPs, ya que conforme disminuye el tamaño la superficie específica aumenta, dejando un mayor número de átomos expuestos en la superficie, encontrándose disponibles para que reaccionen. El área superficial también influye en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs).
- ❖ *Estado de aglomeración*, las AgNps tienen una tendencia natural a formar aglomerados⁹ o agregados¹⁰, pudiendo cambiar el lugar de depósito de las NPs en el organismo en función de si se trata de uno u otro. Como consecuencia la estabilidad influye en la toxicidad.
- ❖ *Forma*, es un aspecto importante, ya que las AgNPs que en su forma contienen más caras son más reactivas, siendo las AgNPs esféricas las que presentan menor toxicidad.

⁸ Genotoxicidad: capacidad para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos.

⁹ Aglomerados: son grupos de partículas unidas mediante fuerzas relativamente débiles de tipo van der Waals, electroestáticas o de tensión superficial, que pueden redispersarse por medios mecánicos.

¹⁰ Agregados: son grupos de partículas fuertemente asociadas cuya redispersión por medios mecánicos no resulta fácil.

- ❖ *Carga superficial*, existen estudios que demuestran una correlación directa entre la carga superficial y la toxicidad de las AgNPs. El **Badawy y col.** [85] observaron que las AgNPs estabilizadas con citrato con cargas superficiales negativas fueron menos citotóxicas que las AgNPs con cargas superficiales positivas estabilizadas con polietilenoamina ramificada.

Puesto que actualmente no existe legislación específica, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria publicó una Guía de Orientación para evaluar los riesgos de las aplicaciones de la nanociencia y de las nanotecnologías en los alimentos y en la cadena alimentaria. Una de sus recomendaciones consistía en la necesidad de desarrollar, mejorar y validar metodologías rutinarias para estudiar en profundidad la toxicidad de las NPs, dado el gran número de nuevos NMs que hay en el mercado [36].

Según la REACH, las sustancias fabricadas o importadas >1T/a requieren registro, pero si se sabe que es de alto nivel de preocupación tendrá que ser registrada incluso si es por debajo de 1T/a y los procesos de autorización y restricción se aplicarán igualmente. Cuando una sustancia existente se introduce en el mercado en forma de NM, el dossier de registro tendrá que incluir propiedades específicas de la nanoforma (va incluida en el tonelaje). Las Autoridades Competentes pueden requerir más información (aspectos de seguridad, salud, propiedades físico-químicas, medio ambiente) [86].

Como se ha mencionado con anterioridad, el efecto bactericida de los iones de Ag en los microorganismos es bien conocido, sin embargo, el mecanismo aún no está del todo claro. Algunos estudios han sido desarrollados para explicar los efectos inhibitorios de iones Ag y Ag metálica en microorganismos. Plateándose que los iones Ag interaccionan fuertemente con los grupos tiol de enzimas vitales, provocando su inactivación. Es posible también que el ADN de bacterias tratadas con NPs pierda su capacidad de replica, debiéndose a la afinidad de la Ag a interaccionar con grupos fosforilados y azufrados [16].

Aunque se ha planteado que las AgNPs pueden actuar de una forma similar a la Ag iónica, hay indicios de que el efecto biocida que producen cada uno de ellos es distinto. De acuerdo con **Morones y col.** [22], los iones Ag producen una región de bajo peso molecular en el centro de la bacteria. Este efecto se debe a que el microorganismo agrupa y protege su ADN como mecanismo de defensa contra compuestos tóxicos. En cambio, al utilizar AgNPs, no se aprecia dicha región en las

células bacterianas. El efecto bactericida de las AgNPs puede ser favorecido por la liberación de iones una vez que éstas han ingresado en el interior de las células [23].

Científicos estudiaron la interacción de las AgNPs con diferentes bacterias Gram-negativas, donde se observó que partículas de 1 a 10 nm presenta un efecto bactericida importante. Estas NPs se unen a la membrana provocando cambios en la permeabilidad y afectando a las funciones respiratorias de la misma. En este mismo estudio se propuso que las NPs pequeñas penetran en el interior de las bacterias dañando las estructuras que contienen grupos funcionales basados en azufre y fósforo, como las cadenas de ADN, por otro lado también contribuyen al efecto bactericida iones Ag que se desprenden de la superficie de la NP, como se puede observar en la *Figura 19* [39].

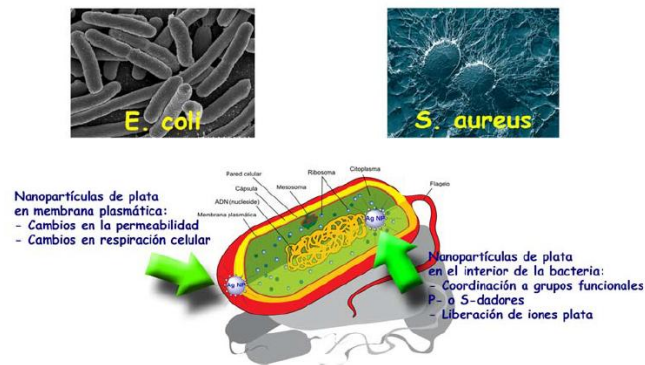


Figura 19. Micrografías de microscopía electrónica de barrido de los microorganismos *E. coli* y *S. aureus*. Esquema de la actuación de las AgNPs sobre una bacteria [39].

Otro estudio analiza la actividad de AgNPs frente a la *E. coli* en función de su tamaño y forma. Identifican que los nanoprismas de Ag de forma triangular truncada presentan mayor efecto biocida que las de forma esférica o barra, lo que sugiere que AgNPs con misma área superficial pero distinta forma pueden presentar distintas áreas superficiales efectivas [39]. Cabe destacar también, que la inhibición bacteriana depende de la concentración de AgNPs y de la cantidad de microorganismos presentes, encontrándose diferencias en la actividad biocida en función del microorganismo estudiado [86].

CAPÍTULO 6:

6. Conclusiones.

Las AgNPs son de los NMs más utilizados en productos para el consumo, ya que poseen propiedades que las hacen muy atractivas, entre las que se pueden destacar: propiedades biológicas, ópticas, magnéticas, electrónicas, catalíticas y su buena actividad antibacteriana y antifúngica. Es por ello, que tienen aplicaciones

en diversos sectores como: la electrónica, cosmética, médica, farmacéutica, textil, alimentaria...

Se ha estudiado más en profundidad su aplicación en la inocuidad de los alimentos, ya que su potencial como antibactericida y efecto fungistático es bastante elevado, utilizándose sobre todo en el envasado de alimentos. Estos envases aportan que los alimentos tarden más tiempo en degradarse, retardando el crecimiento de los microorganismos, favoreciendo por tanto, a que estos estén más frescos y sean más duraderos.

Este trabajo proporciona una visión general de los procesos de preparación que existen hoy día, siendo el más utilizado la reducción química. Debido al auge que presentan dichas AgNPs, cada vez se publican más trabajos científicos, investigando en nuevas técnicas que sean más amigables con el medio ambiente y el ser humano.

Un aspecto importante que se ha presentado es la caracterización de las AgNPs ya que es un proceso fundamental para evaluar la preparación de las AgNPs y sus propiedades. Por medio de estas técnicas podemos obtener información de composición (ICP, XPS...), estructura (XRD...), morfología (TEM, SEM...), permitiéndonos saber cuándo el proceso de síntesis ha concluido y evaluar la calidad del lote de AgNPs preparado. También estas técnicas nos dotan de conocimientos para proponer otras aplicaciones.

De la búsqueda de información, lectura y estudio realizado a lo largo de la elaboración de este TFM cabe destacar que del aumento de la producción de las AgNPs en la industria agroalimentaria, pone de manifiesto un mayor riesgo de exposición y/o bioacumulación en el cuerpo humano. Es por ello, que es necesario ahondar más en el estudio de su toxicidad, para prevenir su posible repercusión y/o riesgo sobre la salud pública.

Aunque se dispone en Europa del marco legislativo más restrictivo del mundo (el REACH), es necesario desarrollarlo para todas las formulaciones, de forma que se puedan aprovechar los beneficios de los NMs sin poner en riesgo a los consumidores.

CAPÍTULO 7:

7. Bibliografía y Referencias.

[1] Royal Society and the Royal Academy of Engineering. (2004). “Nanoscience and Nanotechnologies: Opportunities and Uncertainties”. Royal Society and Royal Academy of Engineering, London.

- [2] ISO. (2015). ISO nanotechnologies-Vocabulary part 1: Core terms. International Organization for Standardization, DD ISO/TS 80004-1:2015. Disponible en Internet: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:68058:en>.
- [3] ASTM International: E 2456-06 Terminology for Nanotechnology. ASTM International, West Conshohocken, USA (2008). <https://www.astm.org/Standards/E2456.htm>
- [4] Feynman, R. (1959). “*There’s plenty of room at the bottom*”. Disponible en Internet: www.its.caltech.edu/~feynman/plenty.html.
- [5] U. S. DEPARTMENT OF ENERGY. Basic Energy Sciences (BES). Disponible en Internet: <https://science.energy.gov/bes/community-resources/scale-of-things-chart/>.
- [6] Comisión Europea. 2011. Recomendación de la Comisión de 18 de octubre de 2011 relativa a la definición de nanomaterial. Diario Oficial de la Unión Europea L275: 38-40. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32011H0696>.
- [7] IUPAC. Disponible en Internet: <https://iupac.org/recommendation/nomenclature-terminology-dendrimers-regular-dendrons-hyperbranched-polymers>.
- [8] IUPAC. Disponible en Internet: <https://goldbook.iupac.org/html/C/CT07545.html>.
- [9] Berlanga Mora, I. (2013). “Síntesis y caracterización de nanomateriales 0D, 1D Y 2D”.
- [10] Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sánchez-Granados, E., Grilo, A., et al. (2009). “Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas”. *Revista De Toxicología*, 26(2-3).
- [11] Almendárez-Camarillo, A., & González-Calderón, J. A. (2011). “Nanomateriales: Su crecimiento, caracterización estructural y tendencias”.
- [12] Escobar Falconí, V. E. (2015). “*Síntesis y Caracterización De Nanopartículas De Plata Por Espectroscopia De Infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, Absorción Atómica De Llama (FAAS) y Microscopía De Barrido Electrónico (SEM)*”.
- [13] Sábel Santibáñez Vallejo. (2012). TFE. “*Síntesis de nanopartículas plata-sílice a través de un método organometálico*”. Universidad de la Rioja.
- [14] Gómez Quintero, T., Arroyo Ornelas, M. A., Hernandez Padrón, G., & Acosta Torres, L. S. (2013). “Nanopartículas de plata: Aplicaciones biomédicas”. *Química Hoy*, 3(3).
- [15] Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (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*, 73(6), 1712-1720.
- [16] Mendez, M. A. (2009). “*Síntesis y Caracterización De Nanopartículas De Plata: Efecto Sobre Colletotrichum Gloesporioides*”, 90.
- [17] Haider, A., & Kang, I. (2015). “Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: A comprehensive review”. *Advances in Materials Science and Engineering*.
- [18] Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella Jr, M. F., Rejeski, D., et al. (2015). “Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory”. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6(1), 1769-1780.

- [19] Tran, Q. H., & Le, A. (2013). “Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives”. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
- [20] Samuel, U., & Guggenbichler, J. (2004). Prevention of catheter-related infections: “The potential of a new nano-silver impregnated catéter”. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 23, 75-78.
- [21] Freeman, A., Halladay, L., & Cripps, P. (2012). “The effect of silver impregnation of surgical scrub suits on surface bacterial contamination”. *The Veterinary Journal*, 192(3), 489-493.
- [22] Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., et al. (2005). “The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*”, 16(10), 2346.
- [23] Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). “Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials”. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76-83.
- [24] Zhang, X., Liu, Z., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). “Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches”. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.
- [25] Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., et al. (2005). “Interaction of silver nanoparticles with HIV-1”. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1), 6.
- [26] European Commission. Nanomaterials-Chemicals-Enterprise and Industry. Disponible en Internet: <https://echa.europa.eu/es/regulations/nanomaterials>.
- [27] European Commission. Nanomaterials under Biocidal Products Regulation - Echa. Disponible en Internet: <http://echa.europa.eu/regulations/nanomaterials-under-bpr>.
- [28] Berekaa, M. M. (2015). “Nanotechnology in food industry; advances in food processing, packaging and food safety”. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 4(5), 345-357.
- [29] Almengor, L. (2009). “Nanotecnología en la industria alimentaria”. *Revista Electrónica, Facultad De Ingeniería, Universidad Rafael Lendívar*, 13, 35-52.
- [30] AESA (European Food Safety Authority). (2009). “Scientific Opinion on The Potential Risks Arising from Nanoscience and Nanotechnologies on Food and Feed Safety”. *Scientific Opinion of the Scientific Committee*, aprobado el 10 de febrero de 2009, *EFSA J.*, 958: 1-39.
- [31] Pérez-Surio, A. F., & Oliver, A. C. (2015). “Nanopartículas de plata en envases de uso alimentario”. *Revista De Salud Ambiental*, 15(2), 80-87.
- [32] Li, H.; Li F.; Wang, L.; Sheng, J.; Xin, Z.; Zhao, L.; Xiao, H.; Zheng, Y. y Hu, Q. (2009). “Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujube* Mill. Var. *Inermis* (Bunge) Rehd)”. *Food chemistry*, 114 (2), 547-542.
- [33] M. E. Samberg, P. E. Orndorff, and N. A. Monteiro-Riviere. (2011). “Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods,” *Nanotoxicology*, vol. 5, no. 2, pp. 244–253.
- [34] Nanotecnología: Samsung recubre los equipos con una nanoprotección de plata para una vida más limpia. Disponible en Internet: <http://www.informativos.net/salud/nanotecnologia->

samsung-recubre-los-equipos-con-una-nanoproteccion-de-plata-para-una-vida-mas-limpia_45603.aspx.

[35] <https://www.nanogap.es/>

[36] EFSA Scientific Committee. (2011). “Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain”. *EFSA Journal*, 9(5).

[37] Consumer Products Inventory: The Project on Emerging Nanotechnologies. Disponible en Internet: <http://nanotechproject.org/cpi/products/bluemoongoodstm-fresh-box-silver-nanoparticle-food-storage-containers/>.

[38] Poole Jr, C. P., & Owens, F. J. (2003). “*Introduction to nanotechnology*” John Wiley & Sons.

[39] Monge, M. (2014). “Nanopartículas de plata: Métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas”. *Anales De Química*, 105. (1).

[40] Portillo Alejo, D. (2015). TFM. “*Potencial De Nanopartículas De Plata Inmovilizadas Mediante La Técnica De Ultrasonido Recubiertas En Corcho Granular Como Agente Microbiano*”. Instituto de sostenibilidad. Universidad Politécnica de Cataluña.

[41] Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). “Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities”. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1), 83-96.

[42] Mehta, S., Chaudhary, S., & Gradzielski, M. (2010). “Time dependence of nucleation and growth of silver nanoparticles generated by sugar reduction in micellar media”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 343(2), 447-453.

[43] Jiang, X., Chen, W., Chen, C., Xiong, S., & Yu, A. (2010). “Role of temperature in the growth of silver nanoparticles through a synergetic reduction approach”. *Nanoscale Res Lett*, 6(1), 32.

[44] Irvani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V., & Zolfaghari, B. (2014). “Synthesis of silver nanoparticles: Chemical, physical and biological methods”. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385-406.

[45] Lee, P., & Meisel, D. (1982). “Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols”. *The Journal of Physical Chemistry*, 86(17), 3391-3395.

[46] Dong, X., Ji, X., Wu, H., Zhao, L., Li, J., & Yang, W. (2009). “Shape control of silver nanoparticles by stepwise citrate reduction”. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(16), 6573-6576.

[47] Rycenga, M., Cobley, C. M., Zeng, J., Li, W., Moran, C. H., Zhang, Q., et al. (2011). “Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications”. *Chemical Reviews*, 111(6), 3669-3712.

[48] Morales, J., Morán, J., Quintana, M., & Estrada, W. (2009). “Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por la ruta sol-gel a partir de nitrato de plata”. *Revista De La Sociedad Química Del Perú*, 75(2), 177-184.

[49] Saenz, G., Hernández, M. C., & Martínez, L. A. (2011). “Síntesis acuosa de nanopartículas de plata”. *Revista Latinoamericana De Metalurgia y Materiales*, 34-35.

- [50] Velikov, K. P., Zegers, G. E., & van Blaaderen, A. (2003). “Synthesis and characterization of large colloidal silver particles”. *Langmuir*, 19(4), 1384-1389.
- [51] Raveendran, P., Fu, J., & Wallen, S. L. (2003). “Completely “green” synthesis and stabilization of metal nanoparticles”. *Journal of the American Chemical Society*, 125(46), 13940-13941.
- [52] Li, P., Li, S., Wang, Y., Zhang, Y., & Han, G. (2017). “Green synthesis of β -CD-functionalized monodispersed silver nanoparticles with enhanced catalytic activity”. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 520, 26-31.
- [53] Jixiong, Y. J., Cheng. (2003). US Patent 2003/0185889 A1. “Colloidal nanosilver solution and method for making the same.”.
- [54] Jixiong Yan, J. C. (2003). US Patent 2003/0190851 A1. “Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same.”.
- [55] Sun, X., Dong, S., & Wang, E. (2004). “One-step preparation and characterization of poly(propyleneimine) dendrimer-protected silver nanoclusters”. *Macromolecules*, 37(19), 7105-7108.
- [56] Zhang, W., Qiao, X., Chen, J., & Wang, H. (2006). Preparation of silver nanoparticles in water-in-oil AOT reverse micelles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 302(1), 370-373.
- [57] Murphy, C. J., & Jana, N. R. (2002). “Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires”. *Advanced Materials*, 14(1), 80-82.
- [58] Bolaños Rodríguez, N. (2016). TFM. “Desarrollo de nanopartículas de plata mediante magnetron sputtering para aplicación en biosensores”. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales y de Telecomunicaciones. Universidad Pública de Navarra.
- [59] Kashiwagi, Y., Yamamoto, M., & Nakamoto, M. (2006). “Facile size-regulated synthesis of silver nanoparticles by controlled thermolysis of silver alkylcarboxylates in the presence of alkylamines with different chain lengths”. *Journal of Colloid and Interface Science*, 300(1), 169-175.
- [60] El-Nour, K. M. A., Eftaiha, A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. (2010). “Synthesis and applications of silver nanoparticles”. *Arabian Journal of Chemistry*, 3(3), 135-140.
- [61] Tsuji, T., Iryo, K., Watanabe, N., & Tsuji, M. (2002). “Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: Influence of laser wavelength on particle size”. *Applied Surface Science*, 202(1), 80-85.
- [62] Tsuji, T., Kakita, T., & Tsuji, M. (2003). “Preparation of nano-size particles of silver with femtosecond laser ablation in water”. *Applied Surface Science*, 206(1), 314-320.
- [63] Pyatenko, A., Shimokawa, K., Yamaguchi, M., Nishimura, O., & Suzuki, M. (2004). “Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in pure water”. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 79(4), 803-806.
- [64] Tien, D., Tseng, K., Liao, C., Huang, J., & Tsung, T. (2008). “Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method”. *Journal of Alloys and Compounds*, 463(1), 408-411.

- [65] Kahrilas, G. A., Wally, L. M., Fredrick, S. J., Hiskey, M., Prieto, A. L., & Owens, J. E. (2013). “Microwave-assisted green synthesis of silver nanoparticles using orange peel extract”. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(3), 367-376.
- [66] Elsupikhe, R. F., Shameli, K., Ahmad, M. B., Ibrahim, N. A., & Zainudin, N. (2015). “Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of κ -carrageenan”. *Nanoscale Research Letters*, 10(1), 302.
- [67] Rodriguez-Sanchez, L., Blanco, M., & Lopez-Quintela, M. (2000). “Electrochemical synthesis of silver nanoparticles”. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(41), 9683-9688.
- [68] Página Hielscher-Tecnología de Ultrasonidos. Disponible en Internet: <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-spray-pyrolysis.htm#46846>.
- [69] Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Moon, J., Gu, B., Mortensen, N. P., et al. (2010). “Silver nanocrystallites: Biofabrication using shewanella oneidensis, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria”. *Environmental Science & Technology*, 44(13), 5210-5215.
- [70] Fayaz, A. M., Balaji, K., Girilal, M., Yadav, R., Kalaichelvan, P. T., & Venketesan, R. (2010). “Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: A study against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(1), 103-109.
- [71] Pugazhenthiran, N., Anandan, S., Kathiravan, G., Prakash, N. K. U., Crawford, S., & Ashokkumar, M. (2009). “Microbial synthesis of silver nanoparticles by bacillus sp”. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(7), 1811.
- [72] KP, V. S., & Savithamma, N. (2013). “Synthesis of silver nanoparticles and anti microbial activity from cadaba fruticosa—an important ethnomedicinal plant to treat vitiligo of kurnool district, andhra pradesh, india”. *Journal of Pharm Research*, 3(12).
- [73] Mansoori, G. A. (2013). US Patent 8394421 B2. “*Synthesis of Nanoparticles by Fungi*”.
- [74] Lin, J., Tseng, Y., & Chien, H. (2006). US Patent 7052765 B2 “*Method for Manufacturing Antibacterial Polyester Master Batches and Fibers both Containing Nano-Silver Particles*”.
- [75] UV/VIS/IR Spectroscopy Analysis of Nanoparticles. (2012). Disponible en Internet: <http://50.87.149.212/sites/default/files/nanoComposix%20Guidelines%20for%20UV-vis%20Analysis.pdf>.
- [76] Das, R., Nath, S., Chakdar, D., Gope, G., & Bhattacharjee, R. (2009). “Preparation of silver nanoparticles and their characterization”. *Journal of Nanotechnology*, 5, 1-6.
- [77] Bhui, D. K., Bar, H., Sarkar, P., Sahoo, G. P., De, S. P., & Misra, A. (2009). “Synthesis and UV–vis spectroscopic study of silver nanoparticles in aqueous SDS solution”. *Journal of Molecular Liquids*, 145(1), 33-37.
- [78] Iturbe, J. L., Nestor, A. V., Mendieta, V. S., & Borja, M. A. (2015). “Obtención y caracterización de nanopartículas de plata soportadas en fibra de algodón”.
- [79] Hagendorfer, H., Kaegi, R., Parlinska, M., Sinnet, B., Ludwig, C., & Ulrich, A. (2012). “Characterization of silver nanoparticle products using asymmetric flow field flow fractionation

with a multidetector approach—a comparison to transmission electron microscopy and batch dynamic light scattering”. *Analytical Chemistry*, 84(6), 2678-2685.

[80] Ávalos, A., Haza, A., Mateo, D., & Morales, P. (2013). “Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente/silver nanoparticles: Applications and toxic risks to human health and environment”. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1.

[81] Dudkiewicz, A., Tiede, K., Loeschner, K., Jensen, L. H. S., Jensen, E., Wierzbicki, R., et al. (2011). “Characterization of nanomaterials in food by electron microscopy”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(1), 28-43.

[82] Liu, J., Yu, S., Yin, Y., & Chao, J. (2012). “Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 33, 95-106.

[83] He, R., Qian, X., Yin, J., & Zhu, Z. (2002). “Preparation of polychrome silver nanoparticles in different solvents”. *Journal of Materials Chemistry*, 12(12), 3783-3786.

[84] Fúnez, A. Á., Duaso, A. I. H., & Gómez, P. M. (2016). “Nanotecnología en la industria alimentaria ii: Evaluación del riesgo y legislación/nanotechnology in food industry ii: Risk assessment and legislation”. *Revista Complutense De Ciencias Veterinarias*, 10(2), 18.

[85] El Badawy, A. M., Silva, R. G., Morris, B., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., & Tolaymat, T. M. (2011). “Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles”. *Environ.Sci.Technol*, 45, 283-287.

[86] Bondarenko, O., Juganson, K., Ivask, A., Kasemets, K., Mortimer, M., & Kahru, A. (2013). Toxicity of ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. *Archives of Toxicology*, 87(7), 1181-1200.

También me he apoyado para la elaboración de este TFM en apuntes y actividades de las asignaturas cursadas en el presente Máster en Ciencia y Tecnología Química.

ANEXO 1: ABREVIATURAS

AAS:	Espectroscopía de absorción atómica
AESA:	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
AFM:	Microscopía de fuerza atómica
AgNPs:	Nanopartículas de plata
AOT:	Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio
APS:	Aminopropiltriethoxisilano
ASTM:	Sociedad Americana para Pruebas y Materiales
ATR:	Espectroscopía de reflexión total atenuada
AuNPs:	Nanopartículas de oro
A4F:	Fraccionamiento de flujo de campo asimétrico
CTAB:	Bromuro de cetil trimetil amonio
CVD:	Deposición química de vapor (Chemical Vapor Deposition)
DLS:	Difusión de luz dinámica (Dynamic light scattering)
DMF:	Dimetilformamida
DT:	Dodecanotiol
EACH:	Agencia Europea de sustancias y preparados químicos
EDX:	Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X
EFSA:	Autoridad Europea de Normas Alimentarias
EROS:	Especies reactivas de oxígeno
ESCA:	Espectroscopía de electrones para el análisis químico
ESEM:	SEM medioambiental
ETEM:	TEM medioambiental
FAAS:	Espectroscopía de absorción atómico
FTIR:	Espectroscopía por infrarrojo de transformada de Fourier
HDA:	Hexadecilamina
ICP:	Espectrometría de emisión atómica con fuentes de plasma de acoplamiento inductivo.
ICP-MS:	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IPC:	Inventario de productos de consumo de nanotecnologías
ISO:	Organización Internacional de Normalización
NaCit:	Citrato de sodio
NMs:	Nanomateriales
NPs:	Nanopartículas
PLAL:	Ablación por láser pulsada en líquido
PLD:	Ablación por láser pulsado (Pulser Laser Ablation)
PVA:	Polivinilalcohol
PVP:	Polivinilpirrolidona
REACH:	Reglamento Europeo sobre sustancias químicas

RMN:	Resonancia magnética nuclear
RPB:	Reglamento que armoniza los criterios para la clasificación de sustancias y mezclas.
SEM:	Microscopía electrónica de barrido (Scanning electron microscopy)
SPR:	Resonancia de plasmón superficial
TEOS:	Tetraetoxilano
TEM:	Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy)
TFM:	Trabajo final de máster
USDA:	Departamento de agricultura de los Estados Unidos
USP:	Ultrasónico spray pirolisis (Ultrasonic Spray Pyrolysis)
UV-Vis:	Espectroscopia de adsorción de luz ultravioleta y visible Ultravioleta-Visible
XPS:	Espectroscopía de fotoelectrones emitidos por rayos X (X-ray photoelectron spectroscopy)
XRD:	Difracción de rayos X
λ:	Longitud de onda
β-CD:	Ciclodextina