

**FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP) CON
L-CISTEÍNA**

YULY ANDREA PRADA VARGAS

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

**FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP)
CON L-CISTEÍNA**

YULY ANDREA PRADA VARGAS

Trabajo de grado presentado como requisito

Para optar el título de:

Química

DIRECTORES

ENRIQUE MEJÍA OSPINO, Químico, Ph.D.,

RODRIGO GONZALO TORRES SAÉZ, Químico, Ph.D.,

CO-DIRECTORA

JOHANNA ALEXANDRA GÓMEZ SANTOS, Química, M.Sc.,

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA

BUCARAMANGA

2012

“...Verde, come quando si va in bicicletta e il vento ti colpisce in faccia...blu come il mare...”

AGRADECIMIENTOS

Entrego mis agradecimientos más sinceros a las personas que han motivado mi crecimiento personal, mi formación académica y profesional.

A mis padres, Israel y Mariela, por su amor inagotable, su apoyo incondicional y por desear siempre para mí y para mis hermanos las cosas más grandes y hermosas.

A mis hermanos, Javier y Angélica, por su afecto y su presencia.

A mi abuela Teresa, por todas sus oraciones, por su comprensión... Por creer siempre en mí. También a mi tía Gloria, por todo su cariño y por motivar desde muy pequeña mi crecimiento intelectual.

Ao Meu Céu Verde e Azul, pelas coisas maravilhosas... Pela confiança e tudo seu amor. Abrigada, porque você está presente em os momentos mais importantes.

A los directores de esta investigación:

Doctor Enrique Mejía Ospino, por todas sus enseñanzas y conocimiento transmitido; por su apoyo y disposición en la realización de este trabajo; por la admiración que despierta al ser un gran ser humano y gran científico.

Doctor Rodrigo Torres Saez, por su buena energía y por todos sus aportes en esta investigación; por ser una persona con grandes virtudes y una labor científica inmensamente grande.

A Johanna Gómez, por codirigir este trabajo; por guiarme en la búsqueda de soluciones cuando la metodología se tornaba rocosa y escarpada.

Al Laboratorio de Investigación Rinaldi, Universidad de Puerto Rico, Recinto de Mayagüez. Por los análisis por Microscopía de Transmisión Electrónica.

A mis compañeras del Laboratorio de Espectroscopía Atómica y Molecular: Lelys Vargas y Lucia Novoa por sus aportes en la síntesis de nanopartículas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. CONCEPTOS GENERALES	17
1.1 NANOPARTÍCULAS	17
1.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULA METÁLICAS	17
1.2.1 Reducción química de una sal metálica	17
1.2.2 Síntesis por métodos de descomposición.....	18
1.2.3 Síntesis por micelas.....	19
1.2.4 Síntesis electroquímica.....	19
1.3 ESTABILIDAD DE NANOPARTÍCULAS	20
1.4 RESONANCIA DEL PLASMÓN SUPERFICIAL.....	22
1.5 POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS	23
1.6 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CONJUGADAS	24
1.7 L-CISTEÍNA	25
1.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	26
1.8.1 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis)	26
1.8.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	26
1.8.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)	27
1.8.4 Medida de potencial zeta (ζ).....	27
1.8.5 Espectroscopía infrarroja (IR).....	28
2. ESTADO DEL ARTE	29
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	32
3.1 PREPARACIÓN DE AgNP	33
3.2 CARACTERIZACIÓN DE AgNP.....	34
3.2.1 Espectroscopía ultravioleta visible	34
3.2.2 Dispersión de luz dinámica	34

3.3	FUNCIONALIZACIÓN DE AgNP CON L-CISTEÍNA.....	36
3.3.1	Estudio del efecto de la concentración de L-cisteína	36
3.3.2	Estudio del efecto de la relación volumétrica	37
3.3.3	Estudio del efecto del pH	37
3.3.4	Estudio del tiempo de interacción Ag-Cys.....	39
4.	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS	40
4.1	CARACTERIZACIÓN DE AgNP	40
4.2	FUNCIONALIZACIÓN.....	43
4.2.1	Análisis UV-Vis del efecto de la concentración de L-cisteína.....	43
4.2.2	Análisis UV-Vis del efecto de la relación volumétrica y el pH.....	43
4.2.3	Análisis DLS del efecto de la relación volumétrica y el pH.....	53
4.2.4	Análisis UV-Vis del tiempo de interacción	54
	de agregados Ag-Cys	
5.	CONCLUSIONES	57
	RECOMENDACIONES	59
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	ANEXOS	64

LISTA DE FIGURA

	Pág
Figura 1. Estabilización de NP metálicas.	21
Figura 2. Representación del potencial zeta de una AgNP.	24
Figura 3. Esquema de metodología implementada en la funcionalización de AgNP con L-cisteína.	32
Figura 4. A) Montaje de síntesis. B) Coloide de plata formado	33
Figura 5. A) Celda capilar para medición de potencial zeta B) Celda para medición de tamaño de partícula.	35
Figura 6. Parámetros estudiados en la funcionalización Ag-Cys.	36
Figura 7. Espectro UV-Vis de Coloide de plata sintetizado	40
Figura 8. Microfotografía TEM de AgNP sintetizadas.	41
Figura 9. Potencial zeta del coloide de plata sintetizado.	41
Figura 10. Tamaño de partícula del coloide de plata sintetizado.	42
Figura 11. Cambio de coloración del coloide en la funcionalización con L-Cys 10mM en relación 1:2 a diferentes valores de pH.	44
Figura 12. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 1.5 y diferentes relaciones volumétricas.	45
Figura 13. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 3.0 y diferentes relaciones volumétricas.	46
Figura 14. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 6.0 y diferentes relaciones volumétricas.	47
Figura 15. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 7,5 y diferentes relaciones volumétricas.	48
Figura 16. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 8.6 y diferentes relaciones volumétricas.	49

Figura 17. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 11.0 y diferentes relaciones volumétricas.	50
Figura 18. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 1.5 en relación volumétrica 1:2.	54
Figura 19. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 3.0 en relación volumétrica 1:2.	55
Figura 20. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 11.0 en relación volumétrica 1:2.	56
Figura 21. Esquema forma iónica de la L-cisteína en función del pH.	64
Figura 22. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [0,5mM] a diferentes relaciones volumétricas.	65
Figura 23. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [1mM] a diferentes relaciones volumétricas.	66
Figura 24. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [3mM] a diferentes relaciones volumétricas.	67
Figura 25. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [5mM] a diferentes relaciones volumétricas.	68
Figura 26. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [10mM] a diferentes relaciones volumétricas.	69

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Condiciones de medida de tamaño de partícula y potencial zeta.	35
Tabla 2. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] a pH 1,5 y diferentes relaciones volumétricas.	45
Tabla 3. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] a pH 3,0 y diferentes relaciones volumétricas.	46
Tabla 4. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] a pH 6,0 y diferentes relaciones volumétricas.	47
Tabla 5. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] a pH 7,5 y diferentes relaciones volumétricas.	48
Tabla 6. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] a pH 8,6 y diferentes relaciones volumétricas.	49
Tabla 7. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] a pH 11,0 y diferentes relaciones volumétricas.	50
Tabla 8. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [0,5mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro.	66
Tabla 9. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [1mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro.	67
Tabla 10. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [3mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro.	68
Tabla 11. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [5mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro.	69
Tabla 12. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro.	70
Tabla 13. Análisis por DLS y potencial zeta Ag-Cys 10mM pH 1,5.	71

Tabla 14. Análisis por DLS y potencial zeta Ag-Cys 10mM pH 3,0.	71
Tabla 15. Análisis por DLS y potencial zeta Ag-Cys 10mM pH 6,0.	71
Tabla 16. Análisis por DLS y potencial zeta Ag-Cys 10mM pH 7,5.	72
Tabla 17. Análisis por DLS y potencial zeta Ag-Cys 10mM pH 8,6.	72
Tabla 18. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 11,0.	73

RESUMEN

TÍTULO: FUNCIONALIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNP) CON L-CISTEÍNA*

AUTORA: YULY ANDREA PRADA VARGAS**

PALABRAS CLAVES: NANOPARTÍCULAS DE PLATA, FUNCIONALIZACIÓN, L-CISTEÍNA, ENSAMBLE DE NANOPARTÍCULAS

El presente trabajo se inició con la preparación de AgNP por reducción química de nitrato de plata usando como reductor el borohidruro de sodio, por medio de esta síntesis se obtuvo un sistema coloidal con distribución estrecha de tamaños, alrededor de 13 nm de diámetro hidrodinámico, de forma aproximadamente esférica y termodinámicamente estables.

Las AgNP fueron funcionalizadas con L-cisteína, un aminoácido apolar de cadena corta con actividad óptica. Para realizar la conjugación efectiva de las AgNP con este aminoácido fue necesario el estudio de las condiciones experimentales requeridas en dicho proceso, como el pH y la concentración molar del aminoácido, la relación volumétrica y el tiempo de interacción. Tanto las AgNP preparadas como los agregados, Ag-Cys, producto de la funcionalización fueron estudiados y caracterizados mediante técnicas microscópicas y espectroscópicas como: Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM), técnica que permitió conocer la forma, tamaño y textura de las NP preparadas; Dispersión de Dinámica de la Luz (DLS) por medio de la cual se midió el tamaño de las nanopartículas y adicionalmente se realizaron medidas del potencial zeta de los sistemas formados. La Espectroscopía Ultravioleta Visible (Uv-Vis) fue empleada ya que es una técnica útil para conocer la longitud de resonancia plasmónica de las AgNP y observar los efectos batocrómicos producto de las interacciones Ag-Cys. De los estudios de estabilidad en el tiempo, se verificó la baja estabilidad de estos nuevos sistemas debido a la perturbación que sufre el sistema al adicionarse otros iones provenientes del ajuste de pH y de la misma funcionalización.

*Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Enrique Mejía Ospino, Ph.D., Rodrigo Torres Saéz, Ph.D., Codirectora Johanna Alexandra Gómez, M.Sc.

SUMMARY

TITLE: Functionalization of silver nanoparticles (AgNP) with L-cysteine*

AUTHOR: YULY ANDREA PRADA VARGAS**

KEYWORDS: Silver nanoparticles, Functionalization, L-cysteine, Nanoparticles assembly

This work began with the preparation of AgNP by chemical reduction of silver nitrate used as a reducing agent sodium borohydride. By means of this synthesis was obtained a colloidal system with narrow size distribution around 13 nm hydrodynamic diameter of approximately spherical shape and thermodynamically stable.

The AgNP were functionalized with L-cysteine, an apolar amino acid short chain optical activity. Effective to perform the conjugation of AgNP with this amino acid was necessary to study the experimental conditions required in this process, such as pH and the molar concentration of amino acid, the volumetric ratio and the interaction time. Both AgNP prepared as aggregates, Ag-Cys, resulting from the functionalization were studied and characterized by microscopic and spectroscopic techniques such as transmission electron microscopy (TEM) technique yielded information on the shape, size and texture of NP prepared; Dynamic scattering of Light (DLS) through which mediated the size of the nanoparticles and further measurements were made of the zeta potential of the systems formed. The Ultraviolet Visible Spectroscopy (UV-Vis) was used because it is a useful technique to know the length of the plasmon resonance and observe the effects AgNP bathochromic product of interactions Ag-Cys. Studies of stability over time, we verified the low stability of these new systems due to the disruption that the system suffers from other ions by adding the adjustment of pH and the same functionalization.

* Degree work

** Faculty of Science. School of Chemistry. Directors: Enrique Mejia Ospino, Ph.D., Rodrigo Torres Saez, Ph.D., Codirector: Johanna Alexandra Gómez, M.Sc.

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es un campo de investigación que se ha desarrollado desde la primera mitad del siglo XX, gracias a la invención de materiales nanoscópicos, fabricados a partir de metales como: oro, plata, cobre, zinc, platino, hierro, y también de compuestos orgánicos como derivados aromáticos y polímeros. Es sorprendente observar como estos agregados metálicos no pueden ser tratados como el material macroscópico de la misma composición, debido a que en las nanopartículas, los electrones de valencia se disponen en estados discretos, como consecuencia de este confinamiento, los electrones ocupan un número finito de estados energéticos cuantizados; de esta manera, se pueden obtener nanopartículas de un mismo metal con propiedades ópticas, electromagnéticas, químicas, y catalíticas diferentes, ya que éstas cualidades varían de acuerdo con su tamaño y morfología, dando lugar a una amplia gama de aplicaciones en campos como la espectroscopia, la bioquímica, la fisicoquímica, las ciencias ambientales, la ciencia de nuevos materiales y la medicina; es por ésta razón que las nanopartículas tienen el papel más importante en la innovación nanotecnológica.

Esa dependencia de las nanopartículas, de su tamaño y forma, ha llevado a la ciencia a indagar e investigar en los métodos de obtención, que incluyen: la síntesis química, la síntesis electroquímica, reducción de compuestos organometálicos, métodos de descomposición y la síntesis por microemulsión, todos estos procedimientos encaminados al obtención de NP con características específicas^{1,2}. Por otra parte, las NP se han convertido, en una fuente de soluciones a problemas que han aquejado a la comunidad científica.

¹ A. ROUCOUX et al., *Chem. Rev.* (2002), Vol. 102, p. 3757-3778

² S. GÜNTER., "Nanoparticles: From theory to application" (2004), Wiley.

Las nanopartículas de plata (AgNP) especialmente, poseen alta actividad antimicrobiana por lo cual son utilizadas en tratamientos médicos para combatir bacterias causantes de enfermedades y células infectadas con virus^{3,4}; su capacidad de difusión y tamaño disminuido, permiten el paso facilitado a través de la membrana celular, por lo cual también son utilizadas como transportadores de fármacos y moléculas biológicamente activas al interior de las células, un sitio que para moléculas de gran peso molecular y mayor volumen es inaccesible⁵.

Las nanopartículas son comúnmente usadas en la identificación de otros analitos por técnicas espectroscópicas, debido a la intensificación de las señales que se obtienen al darse la interacción. De este modo, se da paso a otro campo de exploración bastante importante para la ciencia: “la funcionalización de las NP metálicas con moléculas orgánicas”; en especial, aquellas con grupos funcionales como alcoholes, ésteres, aminas, ácidos, tioles y tioésteres, y más importante aún, la conjugación de NP con polímeros y moléculas biológicas como: proteínas, péptidos, aminoácido y ácidos nucleicos; conduciendo a la existencia de millones de acoplamientos y la aparición de nuevos materiales con propiedades únicas, que se traduce en la investigación constante y exhaustiva alrededor de este campo^{6,7}.

³ C. BAKER et al., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. (2005), Vol. 5(2), p. 244-249

⁴ J.S. KIM et al., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (2007), Vol. 3(1), p. 95–101

⁵ S. JAISWALA et al., *Journal of Antimicrobial Agents*. (2010), Vol. 36 (3), p. 280-283.

⁶ XIA OMING DOU et al., *Society for Applied Spectroscopy*. (1999), Vol. 53(11), p. 1440-1441.

⁷ S.K. BASIRUDDIN et al., *J. Phys. Chem. C*. (2010), Vol. 114, p. 11009-11017.

1. CONCEPTOS GENERALES

1.1 NANOPARTÍCULAS

De acuerdo con la definición utilizada por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)⁸, una nanopartícula es una partícula cuyo tamaño se mide en nanómetros, a menudo restringida a las partículas de tamaño “nano”, es decir, con un diámetro entre 1 a 100 nm. Las nanopartículas pueden formar sistemas coloidales al estar dispersas en un solvente.

1.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE NANOPARTÍCULAS MÉTÁLICAS

Existen varios métodos para la preparación de nanopartículas; en el caso de NP metálicas se pueden citar:

1.2.1 Reducción química de una sal metálica: Uno de los métodos más antiguos y más empleado para la preparación de las nanopartículas, es la reducción química de sales metálicas en presencia de agentes estabilizantes ó en ausencia de éstos. El mecanismo de formación de nanopartículas se basa primordialmente, en la reducción de la sal metálica al átomo cero valente y seguidamente, estos átomos actúan como centros de nucleación dando lugar a la formación de “clusters” cuyo crecimiento continuará a medida que se sigan agregando los átomos, formándose así partículas de mayor tamaño y diversas formas⁹.

Las ventajas del método de reducción química son su reproducibilidad y la posibilidad de obtener coloides monodispersos con una distribución estrecha en el tamaño de la partícula; logrando manipular desde la síntesis misma la

⁸ J.H. DUFFUS et al. “IUPAC: Glossary Of Terms Used In Toxicology, 2ª Edición. *Pure appl. Chem.* (2007) Vol. 79 (7), p. 1153–1344

⁹ Á. SIFONTES et al., *Quim Nova* (2010), Vol. 33(6), p. 1266-1269.

morfología de las NP. Además es un procedimiento de bajo costo y de fácil ejecución.

Los agentes reductores usados con mayor frecuencia van desde los ácidos orgánicos, alcoholes, polialcoholes, aldehídos, azúcares hasta agentes inorgánicos; donde la efectividad de la síntesis depende en gran medida en el poder reductor de estos¹⁰.

1.1.2 Síntesis por métodos de descomposición: Estos métodos se basan en la descomposición de precursores metálicos, generalmente complejos metálicos con grupos carbonilos que se encuentran disueltos en un solvente orgánico. El método sonoquímico inicia con la formación, seguida del crecimiento y colapso de burbujas dentro de un líquido; el colapso de estas burbujas calienta el medio hasta alcanzar temperaturas muy altas, dando lugar a que los componentes organometálicos se descompongan rápidamente, liberando átomos metálicos que en presencia de agentes estabilizantes se aglomeran y forman partículas nanométricas¹¹.

La síntesis sonoquímica tiene como dificultad la producción de nanopartículas amorfas y polidispersas.

Otro proceso es, la descomposición fotoquímica la cual consiste en la reducción de sales y complejos metálicos por acción de la radiación de luz ultravioleta visible, este método puede combinarse con la adición de estabilizantes como polímeros o agentes formadores de micelas, ya que en ausencia de estos se forman NP altamente inestables¹².

Por último, se encuentra un método de descomposición basado en el calentamiento progresivo de óxidos metálicos a altas temperaturas en presencia de solventes orgánicos y surfactantes, por el cual se originan NP con una amplia dispersión de tamaños. Para favorecer la monodispersión

¹⁰ P.C. LEE AND D. MEISEL., *J. Phys. Chem.* (1982), Vol. 86, p. 3391-3395

¹¹ S. KENNETH et al., *J. Am. Chem. Soc.* (1996), Vol. 118, p. 11960-11961

¹² TAPAN K., *JACS Communication*, (2004)

es necesario modular el tiempo de exposición y la temperatura, pero también la concentración, la proporción entre reaccionantes y en algunos casos la adición de semillas más pequeñas de NP¹³.

1.2.3 Síntesis por micelas: Es una técnica que también se conoce como “microemulsiones” que consiste en la utilización de gotas de agua sostenidas en una fase orgánica, donde por acción de un agente surfactante, se forma una especie de reactor micelar, dentro del cual se lleva a cabo la reducción de sales metálicas previamente disueltas. Este método tiene la ventaja que el crecimiento de la nanopartícula está dado por la disponibilidad de la sal precursora dentro de la gota, que a su vez se encuentra limitada por el volumen de la micela, este parámetro puede ser controlado mediante la relación agua-surfactante de la mezcla. La microemulsión resulta ser un método novedoso que ha permitido la obtención de nanopartículas monodispersas y con estructuras conocidas como “núcleo-coraza”. Sin embargo es un método muy costoso, ya que antes de dar inicio a la síntesis de la NP, es necesario un procedimiento de fraccionamiento de las micelas formadas, para escoger los tamaños adecuados de éstas¹⁴.

1.2.4 Síntesis electroquímica: Este proceso consiste en la preparación de agregados metálicos en donde la fuente es una lámina de metal. Esta lámina se dispone en una celda electroquímica como ánodo; en el ánodo se generan los cationes metálicos que se mueven hacia el cátodo formándose átomos cero valentes, que se agregan sobre el cátodo o se precipitan, generando NP metálicas que se dispersan en la solución electrolítica; el control de la densidad de corriente hace posible la versatilidad de tamaños

¹³ S. MARTÍNEZ et al., *Acti.* (2011), Vol. 2(2), p. 47-57

¹⁴ S. BUENDIA ACEVES., Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia en Ingeniería Química. Instituto Politécnico Nacional, México. 2009

que pueden obtenerse mediante esta técnica. Los primeros en implementar esta síntesis fueron *Reetz et al.*,

1.3 ESTABILIDAD DE NANOPARTÍCULAS

La estabilidad de las NP en suspensión, depende del carácter liofóbico del coloide, es decir, en su mayoría las NP obtenidas son termodinámicamente inestables lo cual lleva a la separación de las fases por coagulación y agregación de las nanopartículas. Sin embargo la velocidad de separación de las fases presentes en la suspensión puede ser tanto rápida como infinitamente lenta. Ésta tendencia de los sistemas coloidales ha sido descrita en la teoría clásica llamada “DLVO” por las iniciales de sus descubridores (*Derjaguin, Landau, Verweert y Overbeek*)¹⁵; la cual plantea que la estabilidad de los coloides depende de la energía potencial total, U_{DLVO} , que está dada en primer lugar, por las fuerzas de repulsión electrostática, en segundo lugar por las fuerzas atractivas de Van der Waals y finalmente por la energía potencial derivada del solvente, que está relacionada estrechamente con su constante dieléctrica, sin embargo ésta última contribución es depreciable para la mayoría de sistemas; ésta teoría predice sustancialmente la estabilidad de los coloides cuando se trata de NP en sistemas estabilizados por cargas electrostáticas. Sin embargo, no toma en consideración el efecto mayormente significativo de la estabilización estérica, que tiene lugar cuando en el medio de síntesis se incorporan agentes poliméricos y surfactantes de alto peso molecular, que se extienden desde la superficie de la nanopartícula creando una envoltura alrededor de ella, hasta una distancia donde la fuerza atractiva de Van der Waals ya no es lo suficientemente grande, y por tanto suprime la atracción entre partículas,

¹⁵ I. LEVINE. Físicoquímica: Química de superficies. Vol. 2ª Edición, editorial McGraw-Hill. Madrid (1996), p. 379–405

de este modo, se hace posible la estabilización del coloide dejando de lado las fuerzas de repulsión electrostática^{16,17}.

Estos dos tipos de estabilización son ilustrados a continuación en la figura 1.

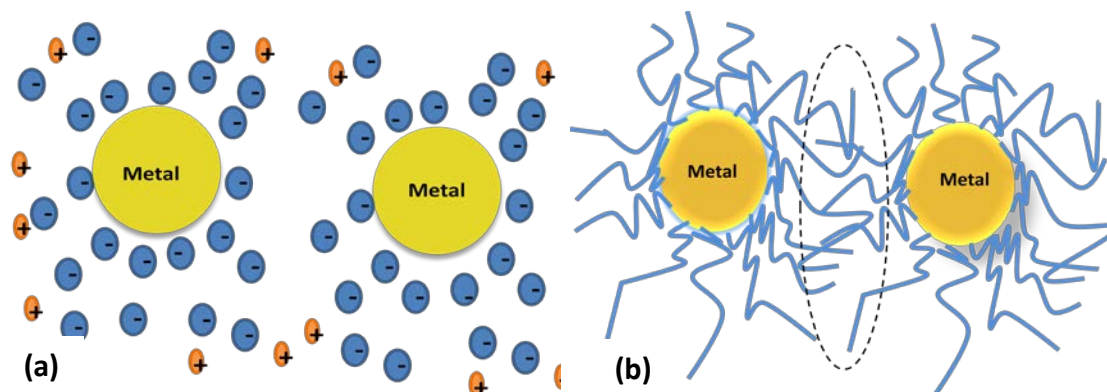


Figura 1. Estabilización de NP metálicas. (a) Estabilización por fuerzas electrostáticas. (b) Estabilización estérica.

Muchos investigadores han reportado el uso de estos agentes estabilizantes adicionados en la síntesis de NP, entre los mas reportados se encuentran: el polivinil alcohol (*PVA*), polietilenglicol (*PEG*), duodecilsulfoxido de sodio (*SDS*) y bromuro de celtitrimetilamonio (*CTAB*), entre otros. La naturaleza química de estos agentes puede ser catiónica, aniónica y no-iónica, la cual varía de acuerdo a la carga superficial en las nanopartículas metálicas y con la finalidad de la síntesis¹⁸.

¹⁶ J. ISRAELACHVILI., "Intermolecular and Surface Forces". 2ª Ed. San Diego (CA): Academic Press. (1992)

¹⁷ SOMASUNDARAN et al., "In Concentrated Dispersions" ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC. (2004)

¹⁸ O. V. DEMENTEVA et al., *Colloid Journal*. (2008), Vol. 70(5), p. 561–573

1.4 RESONANCIA DEL PLASMÓN SUPERFICIAL

El color visible que se percibe de las suspensiones coloidales, depende del tamaño de las nanopartículas, y es debido a lo que se conoce como “*plasmón de superficie*”, definido por Aroca¹⁹ como los cuantos, producto de las oscilaciones de cargas superficiales, producidas por un campo eléctrico externo. El fenómeno del plasmón se observa tanto en películas ultra delgadas como en nanopartículas y se relaciona estrechamente con la cantidad de superficie. El primero en hacer una descripción teórica del plasmón de superficie en las nanopartículas fue Mie²⁰, quien predijo para las NP, la absorción y dispersión en la longitud visible, como suma de las oscilaciones magnéticas y eléctricas.

Las observaciones espectroscópicas de NP se correlacionan, en general, con la teoría de Mie, haciendo algunos ajustes relativos a la dispersión de tamaños y el índice de refracción del solvente. Por ejemplo, la dispersión en el tamaño de las partículas reales (en oposición a las calculadas) produce un ensanchamiento en la banda de absorción al visible.

El máximo de absorción del plasmón para las AgNP en el desarrollo experimental se ubica en un rango entre 380-400 nm para tamaños entre 1-50 nm esta longitud de onda corresponde al color violeta, y es la luz que las NP absorben. La luz que se transmite hace que el coloide se vea de un color amarillo muy llamativo. Cuando las AgNP se agregan, ese máximo de absorbancia se desplaza hacia longitudes de onda más largas, es decir tiene lugar un comportamiento batocrómico; es por esta razón que el plasmón de superficie es de vital importancia para la caracterización de nanopartículas por análisis en el ultravioleta visible.

¹⁹ R.F. AROCA R.F., *John Wiley & Sons*. (2006), p. 35-71

²⁰ G. MIE., *Ann. Phys.* (1908), Vol. 25(3), p. 377-445

1.5 POTENCIAL ZETA DE NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas de plata con tamaños entre 1-100 nm, son las que han recibido mayor atención debido al amplio rango de aplicaciones, ya que el área superficial del plasmón aumenta en la medida en que disminuye el tamaño. Las nanopartículas pueden tomar múltiples formas, sin embargo las preparaciones más comunes son la que conllevan a formas esféricas, ya que resulta más fácil la predicción de su comportamiento frente a los fenómenos de luz mediante la teoría clásica propuesta por Mie, como se ha comentado anteriormente.

En general las partículas dispersas en un sistema acuoso adquieren una carga superficial. En el caso de las AgNP ésta medida, conocida como potencial zeta, se encuentra dada por los átomos de plata no reducidos que se ubican superficialmente en la nanopartícula, y por la adsorción de los iones negativos que circundan en la fase dispersante. Ésta carga intrínseca de la partícula más los iones fijos adsorbidos conforman lo que se conoce como la doble capa eléctrica. El espesor de ésta doble capa es, lo que se conoce en la teoría clásica como la longitud de *Debye*, las cargas que quedan por dentro de esta longitud no ejercen fuerza efectiva, por eso se habla de apantallamiento. Las cargas superficiales modifican la distribución de los iones presentes, lo que da origen a una zona alrededor de la partícula que es eléctricamente diferente al medio de la suspensión. Esta zona a su vez se divide en dos partes: una capa interior atraída fuertemente a la partícula producto de los átomos Ag^+ , y que se mueve junto con la partícula, llamada capa de *Stern*, y una región exterior, que se hace difusa a medida que aumenta la distancia desde la superficie formada por los iones negativos adsorbidos, el límite de ésta es lo que se conoce como plano de deslizamiento o plano de corte hidrodinámico y corresponde al final de la doble capa eléctrica (Figura 2). El potencial zeta (ζ) se mide en Milivoltios (mV) y su magnitud se correlaciona con la estabilidad coloidal; las partículas con un alto potencial zeta, ya sea positivo o negativo, se repelerán unas con

otras. Los valores reportados para AgNP en medio acuoso varían entre $\zeta < -30$ mV ó $\zeta > +30$ mV, lo cuales son considerados óptimos^{21,22}.

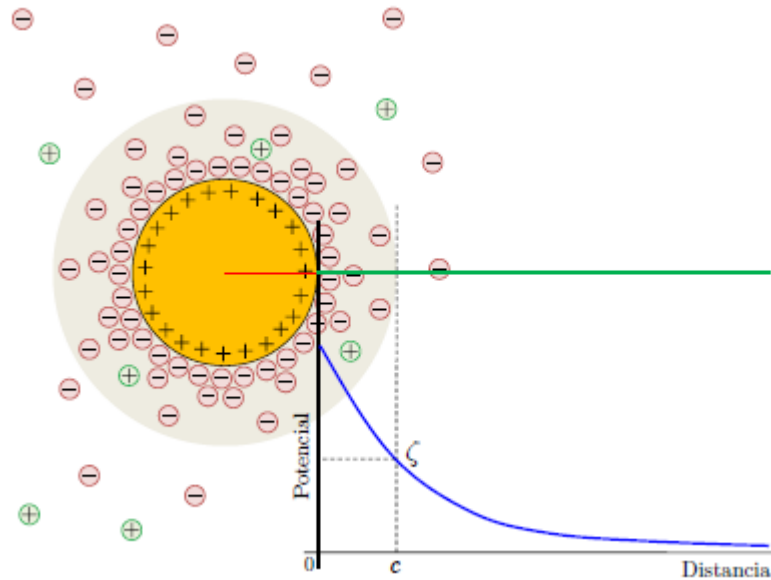


Figura 2. Representación del potencial zeta de una AgNP. Se observa la zona interior de iones Ag^+ fuertemente atraídos y la zona exterior difusa de iones negativos absorbidos. [Tomado de A. Guerrero., Santiago de Chile, 2008]

1.6 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS CONJUGADAS

Para otorgar funcionalidad o estabilidad a las NP, éstas pueden conjugarse con diversos compuestos orgánicos. El tamaño significativamente pequeño de estos agregados les confiere propiedades de difusión y de movilidad de gran interés en varios campos de investigación. Para el caso de las AgNP, se ha promovido la investigación y la búsqueda de aplicaciones biomédicas

²¹ I. OLMEDO., Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Chile. Santiago, Chile (2007)

²² Malvern Instruments. Zeta Potential Theory "Zetasizer Nano Series User Manual". Worcestershire, Inglaterra. (2004)

ya que, poseen actividad antibacteriana. En tales experimentos sobresale la conjugación de moléculas orgánicas con grupos funcionales característicos como lo son los aminoácidos, tioles, tioésteres, ácidos nucleicos, alcoholes y otras moléculas con actividad biológica²³.

Se ha descrito que las nanopartículas metálicas, al ser sometidas a un campo magnético oscilante, pueden absorber energía de forma eficaz, disipando dicha energía solo al medio local, es decir, sólo a lo que está directamente unido a la nanopartículas. Partiendo de esto, los conjugados de nanopartículas han sido usados en tratamientos de enfermedades causadas por bacterias y para combatir virus destruyendo las células directamente afectadas²⁴.

1.7 L-CISTEINA

La L-cisteína es un aminoácido de cadena corta, no cargado a pH neutro, el cual posee una cadena lateral apolar debido a la presencia de un grupo sulfhídrico (-SH). El sulfhídrico altamente nucleófilo es quien le confiere las propiedades químicas y reaccionantes a la cisteína. Este aminoácido “no esencial” (que los organismos vivos pueden sintetizarlo) es muy importante en los procesos metabólicos que tienen lugar en nuestro organismo ya que forma una de las estructuras más importantes, como lo es el *glutathione*, un tripéptido constituido por glicina, ácido glutámico y cisteína, este péptido es el encargado de ayudar en las tareas de desintoxicación del hígado, siendo principalmente el grupo -SH proveniente de la cisteína el encargado de atrapar los radicales libres, metales pesados y demás productos secundarios originados en procesos hormonales y metabólicos para facilitar su eliminación. La cisteína por sí misma, en su forma modificada N-acetilcisteína (NAC) o formando estructuras peptídicas, tiene propiedades

²³ Q.A. PANKHURST et al. *J Phys D: Appl Phys.* (2003), Vol. 36(13), p. 167-181

²⁴ H. WEI et al. *Nanotechnology.* (2007), Vol. 18, p. 175610

antioxidantes y cumple un papel muy importante en la prevención de enfermedades cardíacas dado que evita la oxidación del colesterol¹².

1.8 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Dadas las propiedades ópticas y electrónicas de las NP y el comportamiento del plasmón superficial, las NP y sus conjugados pueden ser estudiados haciendo uso de técnicas espectroscópicas y microscópicas; de ellas, las que se mencionan a continuación fueron consideradas y utilizadas en el desarrollo del presente trabajo.

1.8.1 Espectroscopía ultravioleta visible (UV-Vis): La espectroscopía UV-Vis, permite tener un espectro de la región electromagnética comprendida entre longitudes de onda de 350 a 800 nm, dando lugar a las transiciones que involucran a los electrones de valencia. Esta región espectral, es la única detectable por el ojo humano, en el cual las soluciones coloreadas absorben selectivamente, como producto de las transiciones electrónicas de más baja energía²⁵.

1.8.2 Microscopía de transmisión electrónica (TEM): Este análisis se realiza en un microscopio, que utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto; la imagen es producto de la interacción, los electrones termoiónizados de bajas longitudes de onda atraviesan los átomos del material; la pantalla que conforma este equipo está recubierta de pintura de fluoruros, que se ilumina al ser bombardeada por los electrones, creando la imagen en el rango de longitudes de onda del espectro visible. La técnica de TEM brinda información interna y ultraestructural de las nanopartículas²⁶.

²⁵ D.A. SKOOG and J.J. LEARY., "Análisis Instrumental". Ed. McGraw-Hill. Madrid, 2008

²⁶ A. NAIK., "Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil" (2009)

1.8.3 Dispersión de luz dinámica (DLS): Es una técnica óptica utilizada para medir el diámetro de las partículas en sistemas coloidales metálicos y poliméricos con partículas de tamaño nanométrico. Básicamente, el instrumental empleado consiste en: A) una fuente de luz láser monocromática que incide sobre la una solución muy diluida a analizar; B) un fotómetro posicionado a un dado ángulo de detección, θ_r , medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partículas; y C) un correlador digital que conjuntamente con un software específico, permiten obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo²².

1.8.4 Medida de potencial zeta (ζ): Es una medida de la estabilidad de una suspensión e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundantes alrededor de las partículas y así desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula. Las medidas de potencial zeta son hechas usando la técnica llamada microelectroforesis. Un microscopio de alta calidad es usado para observar cómodamente las partículas coloidales que se encuentran dentro de una cámara llamada celda electroforética. Dos electrodos colocados en los extremos de la cámara son conectados a una fuente de poder creándose un campo eléctrico que cruza la celda. Las partículas cargadas presentes en el sistema coloidal migran por efecto del campo eléctrico, su movimiento y dirección están relacionados con su potencial zeta, el cual se calcula a partir de la movilidad electroforética²⁷

²⁷ T. VISHAL et al., *Electrophoresis* (2008), Vol 29, p.1092–1101

1.8.5 Espectroscopía infrarroja (IR): Es una técnica que se emplea para realizar el análisis del espectro vibracional de las moléculas y de las formas cristalinas de un compuesto. El rango espectral se encuentra entre 4000 a 600 cm^{-1} . Los espectros de absorción, emisión y reflexión en el infrarrojo son resultado de distintos cambios energéticos producidos por las moléculas desde unos estados vibracionales y rotacionales a otros. De este modo, se presentan un conjunto de bandas características de la estructura del sistema molecular, permitiendo la identificación de grupos funcionales, interacciones, conformaciones estereoquímicas y cristalinidad del analito ^{23,28}.

²⁸ L.A. CLEMENTI. Asociación Argentina de Materiales. 2| Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales – Posadas – Misiones, 16 - 17 Octubre 2008

2. ESTADO DEL ARTE

Las bondades de las NP, específicamente las nanopartículas de plata (AgNP) son aprovechadas en aplicaciones biomédicas como lo propone el autor C. *Baker et al*, quienes en su trabajo exploran en las propiedades antimicrobianas de la AgNPs, al intentar combatir e inhibir el crecimiento de microorganismos como las *E. coli*²⁹; tres años más tarde aparece J.S. *Kim* y su grupo de investigación, quienes también dirigen su atención hacia la actividad antimicrobiana de las AgNP sobre cultivos de Levaduras, *E. coli* y *S. aureu*; el resultado de este estudio tuvo por resultado efectos de inhibición en el crecimiento de levaduras y *E.coli*, a bajas concentraciones de AgNP mientras que no produce efecto significativo en las *S. aureu*³⁰. El alto poder antibacterial de la AgNP hace necesario un uso moderado de éstas, ya que ataca tanto células maléficas como benéficas de acuerdo con las investigaciones citas, es por esto que S. *Jaiswa et al*, plantea en su trabajo encapsular las AgNP con β -*ciclodextrin*, un compuesto no tóxico y soluble en medio fisiológico, el cual crea una envoltura alrededor de la AgNP para evitar la interacción con células sanas y bacterias benéficas, el ingreso a través de la pared celular es facilitado por efectos de quimioabsorción; ya en el interior de la bacteria la capsula se rompe y se liberan la AgNP, arrojando resultados positivos en la inhibición del crecimiento de estos microorganismos³¹.

El estudio de las interacciones de NP con otras moléculas es tema de actualidad, y es lo que a un grupo grande de investigadores motiva continuamente, prácticamente el desarrollo nanotecnológico y creación de nuevos materiales ha ido siempre de la mano de la producción intelectual y

²⁹ C. BAKER., *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. (2005), Vol. 5(2), p. 244-249

³⁰ J.S KIM et al., *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. (2007), Vol. 3(1), p. 95-101

³¹ S. JAISWALA et al., *Journal of Antimicrobial Agents*. (2010), Vol. 36 (3), p. 280-283

científica de los estudiosos del tema. Es por esto, que es de gran importancia citar autores como: *X. Oming et al*³², quienes centraron su interés en las interacciones con moléculas biológicas como la glicina, realizando un estudio el efecto del pH en la funcionalización con AuNP y AgNP; ellos observaron que la glicina con valores de pH igual a 6.0 y 3.9 interaccionaba fuertemente con los coloides de oro, llevando a la formación de agregados que en los análisis por ultravioleta visible fueron evidentes al presentarse una segunda banda de absorbancia entre 800-830 nm; las observaciones en cuanto al comportamiento del coloide de plata, mostraron fuerte interacción con la glicina a un valor de pH igual a 2.3.

De esta manera, las investigaciones realizadas sobre lo que se conoce como “ensamble” es de gran interés para la comunidad científica, ya que representa la clave hacia la funcionalidad y especificidad de las NP, como lo menciona el investigador, *S.K. Basiruddin*, junto con *R. Nikhin*, en un trabajo desarrollado alrededor de este tema, en el cual se plantea que la conjugación de estos materiales con cientos de moléculas diferentes ofrece la oportunidad de indagar sobre millones de acoplamientos con una afinidad establecida para cierto grupos de moléculas como péptidos, anticuerpos, oligonucleótidos, vitaminas, etc.³³. En este aspecto convergen gran cantidad de trabajos como el desarrollado por *A. Guerrero*, quien investigó acerca de las estructuras de péptidos conjugados con NP metálicas con fines terapéuticos³⁴ bajo la dirección y supervisión del investigador *M. Kogan*³⁵, el cual ha dedicado sus investigaciones a profundizar en las aplicaciones biomédicas de NP metálicas, y diseñar, especialmente AuNP funcionalizadas con proteínas y polipéptidos con fines médicos.

³² X. OMING et al., *Society for Applied Spectroscopy*. (1999), Vol. 53(11), p. 1440-1441

³³ S.K BASIRUDDIN et al., *J. Phys. Chem. C*. (2010) Vol. 114, p. 11009-11017

³⁴ A. GUERRERO., Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Santiago, Chile 2008.

³⁵ M. KOGAN et al., *Nano Lett.* (2006), Vol. 6(1), p. 110–115

La aparición constante de publicaciones en lo concerniente a este tema, y en especial dos investigaciones divulgadas el año pasado, las cuales son citadas a continuación, han confirmado la vigencia que tiene la funcionalización de NP de metales nobles. La primera de ellas, realizada por *Estevez-Hernandez et al*, basado en el estudio de la conjugación de AuNP con *benzoil-mercatoacetil-triglicina*, que es un precursor de *Thecnetium 99*, un fármaco que tiene efecto sobre la función tubular renal, el cual fue conjugado con AuNP para obtener una imagen diagnóstico de esta función renal; y por otra parte, la conjugación con *metilester-L-cisteína*, un derivado de la L-cisteína, como modelo en el estudio del comportamiento del grupo tiol y su absorción sobre la superficie de AuNP; los análisis por ultravioleta visible, espectroscopia Raman y por espectroscopía infrarroja revelaron la existencia de fuertes interacciones a determinados valores de pH³⁶.

Y por último, la investigación realizada por *A. Majzik et al*, también en el mismo año, que consistió en la funcionalización de AuNP con L-cisteína y con fragmentos de péptidos *β-amiloides*, asociados en algunos caso a la enfermedad de Alzheimer³⁷.

³⁶ O. ESTEVEZ-HERNANDEZ et al., *Journal of Colloid and Interface Science*. (2010), Vol. 350, p. 161–167

³⁷ A. MAJZIK et al., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (2010), p. 235–241

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La metodología seguida para la realización del presente trabajo de investigación se encuentra ilustrada en el siguiente esquema. (Figura 3).

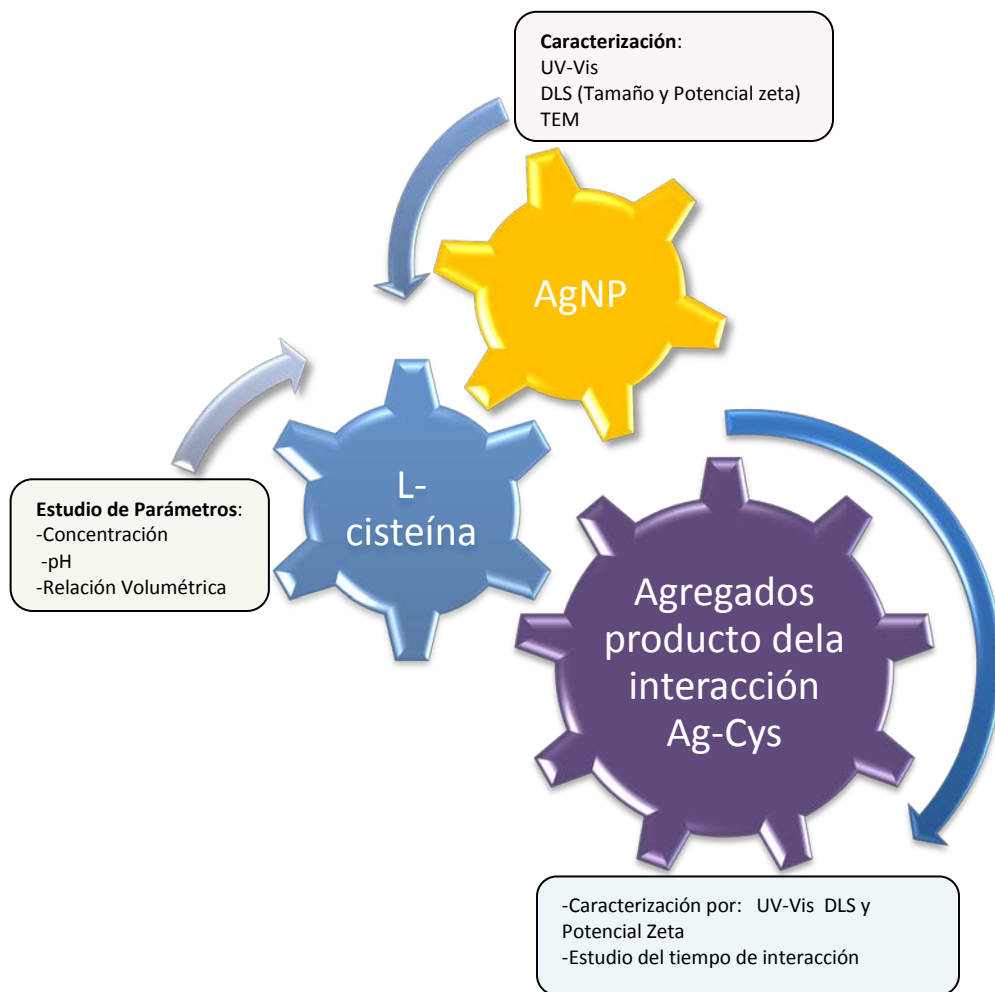


Figura 3. Esquema de metodología implementada en la Funcionalización de AgNP con L-cisteína.

3.1 PREPARACIÓN DE AgNP

Las AgNP fueron preparadas por reducción química de una solución 1mM de AgNO_3 usando como agente reductor, NaBH_4 , preparado en solución acuosa en una concentración de 1mM. La solución reductora se dispuso en un erlenmeyer de 250 mL en un baño de hielo, registrando una temperatura aproximada a 8°C . Seguidamente se adicionó la solución de AgNO_3 gota a gota desde una bureta, como se ilustra en la figura 4. La relación volumétrica entre los reactivos fue de $[\text{Reductor}]/[\text{Oxidante}]$ igual a 3 (J.A Creighton *et al.*, 1978). La reacción se llevo a cabo bajo agitación magnética, con velocidad de agitación aproximadamente de 1268 rpm. Concluida la adición del AgNO_3 , la agitación fue suspendida. El coloide formado se dejó durante 30 minutos en el baño del hielo y fue diluido en una relación 1:1.

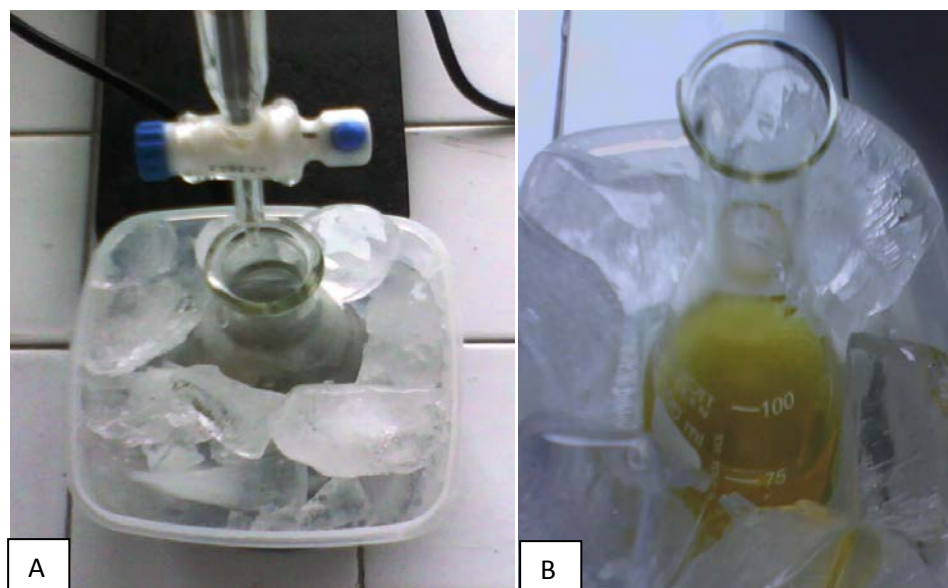


Figura 4. A) Montaje de síntesis. B) Coloide de plata formado.

Todas las soluciones requeridas en el desarrollo de este trabajo fueron preparadas con agua desionizada tipo I, con resistividad eléctrica de 18.2mΩ, procesada en un equipo MilliQ; suministrada por el Laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander.

3.2 CARACTERIZACIÓN DE AgNP

3.2.1 Espectroscopía ultravioleta visible

Se dispuso de 3 mL de coloide de plata formado, en una cubeta cuadrada de poliestireno (*Ref:DTS0012, por Malvern Instrument*). El análisis fue realizado en un espectrofotómetro ultravioleta visible, marca SHIMADZU modelo UV-2401 PC, con lámpara de deuterio y un fotomultiplicador R-928; operado en un rango entre 300-900 nm con ancho de banda espectral de 1.0 *slit*. El espectro UV-Vis de las AgNP permitió conocer la longitud de máxima resonancia del plasmón y de esta manera tener indicios previos de la morfología y distribución aproximada de tamaños de partícula presentes en el coloide.

3.2.2. Dispersión dinámica de la luz

TAMAÑO DE PARTÍCULA

Se colocaron 1.5 mL del coloide de plata obtenido, en una cubeta cuadrada de poliestireno (*Ref DTS0012, by Malvern Instrument*) como se muestra en la figura 5. Las medidas de tamaño de partícula se realizaron en un equipo Zetasizer Nano Series marca MALVERN INSTRUMENT. De acuerdo con los parámetros establecidos en la tabla 1.

POTENCIAL ZETA

Se introdujo el coloide de plata preparado en una celda capilar para potencial zeta (Ref: DTS1061 por Malvern Instrument), como se ilustra en la figura 5. La medida fue tomada en un equipo Zetasizer Nano Series marca MALVERN INSTRUMENT, bajo las condiciones presentadas en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de medida de tamaño de partícula y potencial zeta

Número de mediciones	1/1
Número de Corridas	Mínimo 50; Máximo 100
Temperatura	25°C
Dispersante	Agua
Índice Refracción Dispersante	1,333



Figura 5. A) Celda capilar para medición de potencial zeta. B) Celda para medición de tamaño de partícula

3.3 FUNCIONALIZACIÓN DE AgNP CON L-CISTEÍNA

La funcionalización se realizó de acuerdo al esquema presentado en la figura 6. Se estudiaron los parámetros: concentración de aminoácido, relación volumétrica Ag:Cys, pH del aminoácido y finalmente tiempo de duración de la interacción.

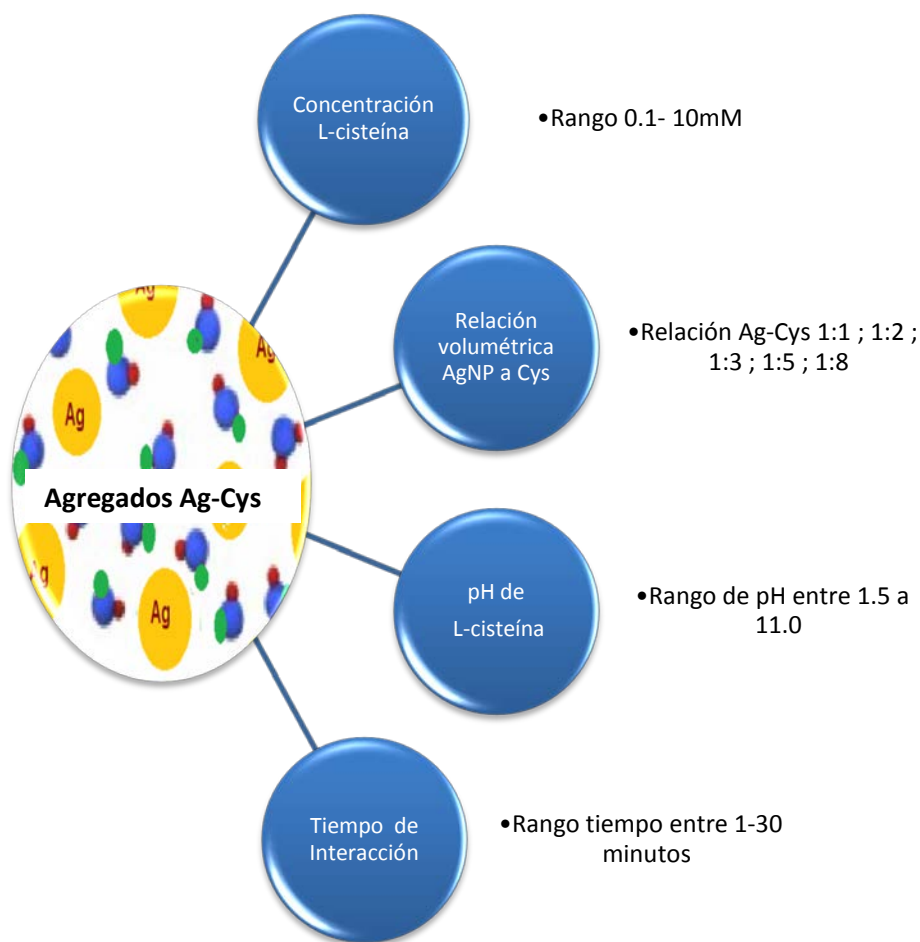


Figura 6. Parámetros estudiados en la funcionalización Ag-Cys

3.3.1 Estudio del efecto de la concentración de L-cisteína

Se preparó una solución de L-cisteína de concentración 10 mM, para lo cual se pesó en la balanza analítica la cantidad en gramos requerida del aminoácido y se adicionó un volumen de agua determinado. De ésta

solución de partida se obtuvieron por dilución las siguientes concentraciones: 0,5 mM; 1mM; 3mM; 5mM.

A un volumen definido de cada solución se adicionó un volumen de AgNP en una relación volumétrica 1:1. Cada una de ellas, fue agitada en un agitador magnético a una velocidad aproximada de 1078 rpm durante 10 minutos. Cada uno de los agregados, Ag-Cy, fueron analizados por espectroscopía ultravioleta visible con el fin de detectar algún cambio en la banda de resonancia plasmónica del coloide por efecto de la presencia de L-cisteína a diferentes concentraciones.

3.3.2 Estudio del efecto de relación volumétrica

Se mantuvo fija la concentración de aminoácido en un valor de 10mM; la cual mostró fuertes interacciones con el coloide, dando lugar a la aparición de una segunda banda de absorción a mayores longitudes de onda en el espectro UV-Vis.

Las relaciones volumétricas que se estudiaron fueron 1:1; 1:2; 1:3; 1:5 y 1:8.

A un volumen fijo de solución de L-cisteína se adicionó otro volumen establecido de AgNP que cumpliera con cada una de las relaciones mencionadas. Los agregados formados, Ag-Cys, fueron analizados por UV-Vis. Debe considerarse que en todos los ensayos se observó interacción, siendo la relación 1:2 la escogida, ya que mostró un espectro con mayor definición en los picos, el espectro UV-Vis presentó claramente la longitud de onda correspondiente a los agregados producto de la funcionalización.

3.3.3 Estudio del efecto del pH

Ya establecidas, la concentración de aminoácido y la relación volumétrica Ag:Cys. Se estudio el efecto del pH, para tal fin fueron preparadas

soluciones de L-cisteína de concentración 10mM a las que se ajusto el pH con HCl concentrado y NaOH al 99% p/p. Los valores de pH estudiados fueron (Sección de anexos, figura A1. Formas iónicas de la L-cisteína en función del pH):

- pH igual a 1,5; que es un valor inferior al pK_{a1} de la L-cys, al cual el grupo α -carboxilo aún se encontrará protonado.
- pH igual a 3,0; que es un valor por encima del pK_{a1} , a este valor el grupo α -carboxilo se encontrará desprotonado.
- pH igual a 6,0; que es 0,5 unidades por encima del punto isoeléctrico del aminoácido, el cual se encontrará con carga neta igual a cero. Prevalecerá la forma zwitteriónica.
- pH igual a 7,5; que es un valor cercano al pH fisiológico en sangre.
- pH igual a 8,6; valor por alrededor del pK_{a3} , al que ocurre la desprotonación del grupo lateral sulfhídrido.
- Y finalmente un pH igual a 11,0; cercano al pK_{a2} , al cual el grupo α -amino sufre la desprotonación.

Estos ensayos se realizaron bajo agitación magnética a una velocidad de agitación aproximada a 1078 rpm. La funcionalización se realizó durante 10 minutos a una temperatura de 18 °C. Los agregados producto del acoplamiento Ag-Cys fueron caracterizados por UV-Vis, así como por DLS para medir el tamaño de las partículas y conocer el valor de potencial zeta para cada uno de los sistemas formados.

3.3.4 Estudio del tiempo de interacción Ag-Cys

Los agregados de Ag-Cys formados a los valores de pH establecidos anteriormente, fueron analizados por ultravioleta visible. Se recolectaron espectros UV-Vis durante un tiempo de 30 minutos para cada uno de los ensayos, con el fin de establecer la susceptibilidad e inestabilidad de la interacción Ag-Cys en estos sistemas.

4. RESULTADOS Y ANALISIS RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DE AgNP

El espectro UV-Vis obtenido del coloide de plata cuya coloración característica fue amarillo intenso, es presentado en la figura 7. En él puede observarse la longitud de onda de máxima absorción de plasmón a 396 nm característica para partículas esféricas con una distribución de tamaños inferiores a 50 nm, la intensidad de la absorción fue de 1,46 unidades.

El pico presenta una forma bien definida, con alta simetría y una línea base bastante ceñida al límite inferior con denominación cero, esto indica una distribución estrecha de tamaños de partículas. Para asegurar esto se realizaron los análisis correspondientes a TEM y DLS, las microfografías corroboraron la presencia de partículas de morfología esférica (figura 8) con una distribución estrecha de tamaños inferiores a 20 nm. Los análisis por DLS mostraron radios hidrodinámicos comprendidos entre $r_{Ag} = 1,6$ nm (6,7%) y $r_{Ag} = 13,5$ nm (93,7%).

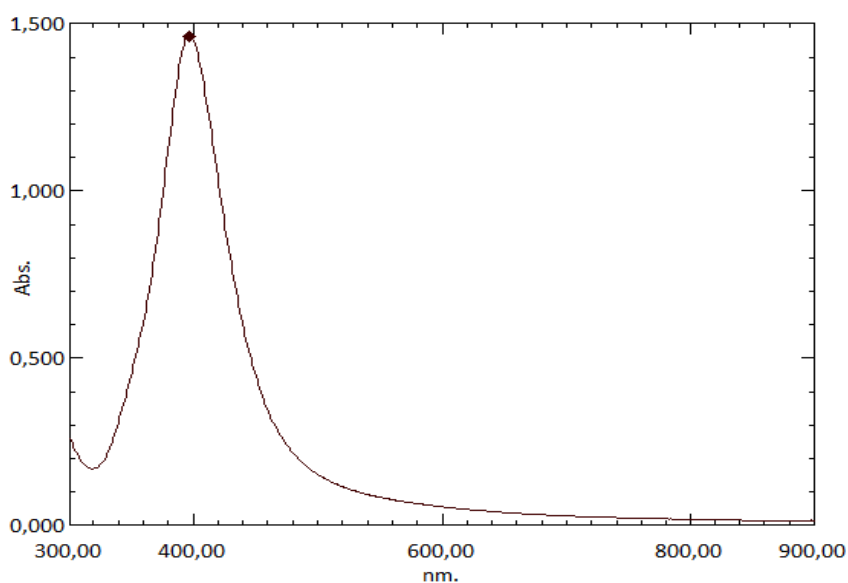


Figura 7. Espectro UV-Vis de Coloide de plata sintetizado

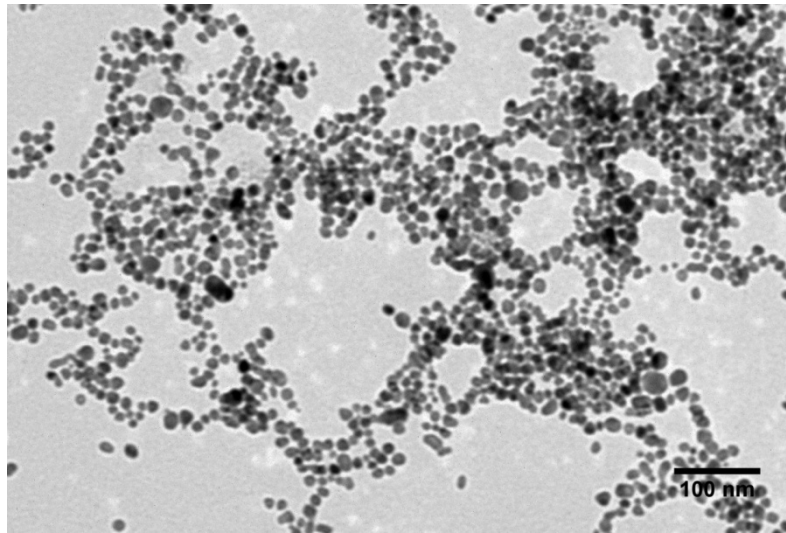


Figura 8. Microfotografía TEM de AgNP sintetizadas

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -36,4	Peak 1: -36,4	100,0	6,23
Zeta Deviation (mV): 6,23	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0549	Peak 3: 0,00	0,0	0,00
Result quality: Good			

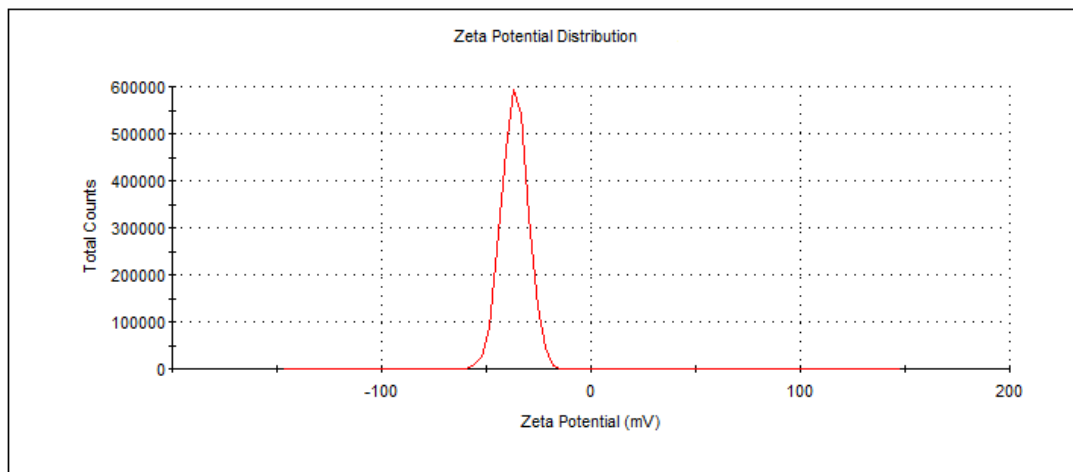


Figura 9. Potencial zeta del coloide de plata sintetizado

	Size (r.nm):	% Intensity	Width (r.nm):
Z-Average (r.nm): 16,19	Peak 1: 13,49	93,3	5,526
Pd: 0,139	Peak 2: 1,605	6,7	0,3768
Intercept: 0,857	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

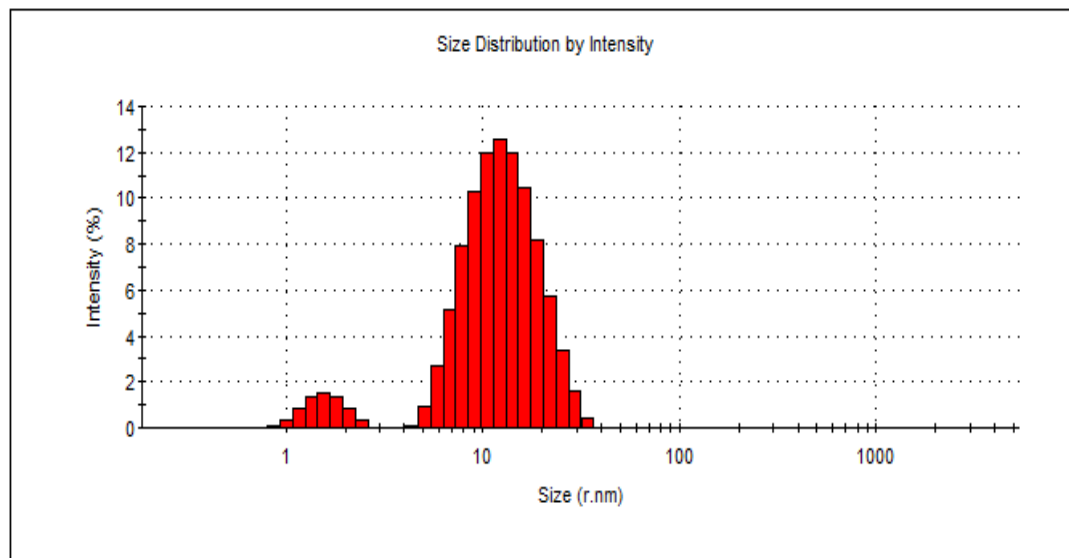


Figura 10. Tamaño de partícula del coloide de plata sintetizado

Adicionalmente, el sistema coloidal registro un potencial zeta de -36 mV como puede ser observado en la figura 9. Esta medida indica que la suspensión es termodinámicamente estable, en un lapso de tiempo considerable, ya que las fuerzas de repulsión electrostáticas que deben vencer las partículas para acercarse y aglomerarse son significativamente altas, dentro de un rango específico de $\zeta < -30 \text{ mV}$ y $\zeta > 30 \text{ mV}$ ¹⁶.

4.2 FUNCIONALIZACIÓN

4.2.1 Análisis UV-Vis del efecto de concentración

Los resultados obtenidos han sido condensados en las figuras A2-A6 en la sección de anexos. Se incluyen los espectros UV-Vis para las concentraciones de L-cisteína de 0.5mM, 1mM, 3mM, 5mM y 10mM funcionalizadas con AgNP a diferentes relaciones volumétricas.

Los resultados obtenidos mostraron que existe interacción en cada uno de los ensayos realizados, en algunos caso se manifiesta como el desplazamiento de la longitud de onda desde los 396 nm que fue la registrada para el coloide de plata inicialmente, hacia longitudes de onda que van hasta los 415 nm. Este efecto batocrómico indica el crecimiento y agregación de las nanopartículas bajo las condiciones trabajadas. En otros casos puede apreciarse la aparición de un hombro al lado derecho del pico, también dirigido hacia longitudes de onda mayores.

Por observación de los comportamientos presentados en los espectros UV-Vis se escogió la concentración de L-cisteína 10mM, ya que se lograron resultados más evidentes de la interacción, por los efectos batocrómicos observados, lo cual coincide con lo reportado por otros autores³¹.

4.2.2 Análisis UV-Vis del efecto de la relación volumétrica y el pH

En la fotografía mostrada en la figura 11 puede observarse los cambios de coloración registrados a estos valores de pH.

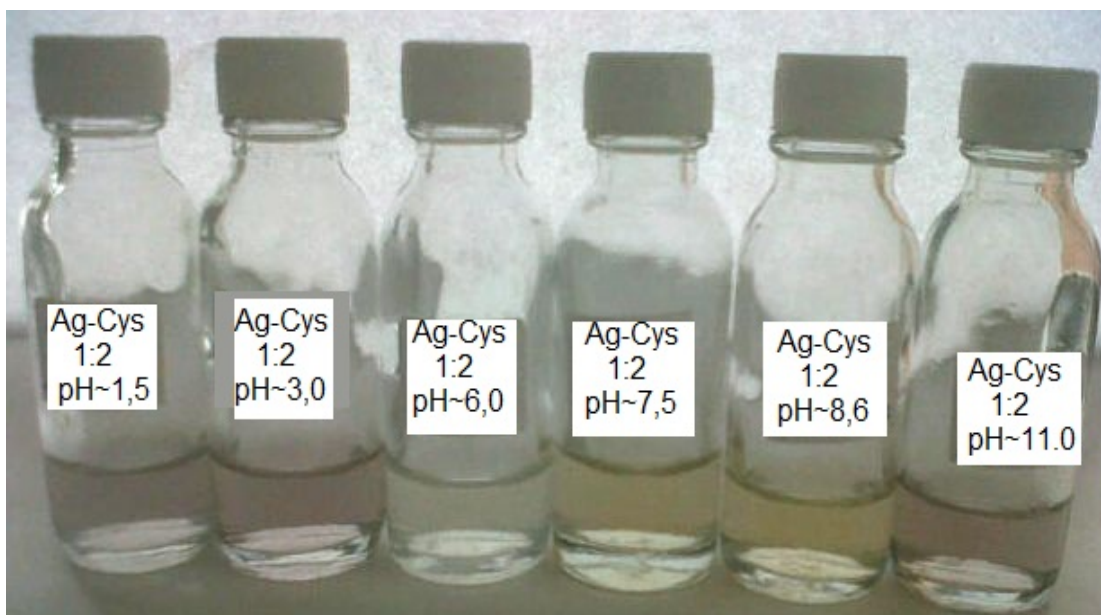


Figura 11. Cambio de coloración del coloide en la funcionalización con L-Cys 10mM en relación 1:2 a diferentes valores de pH

A continuación se presentan los espectros UV-Vis de la funcionalización de L-cys 10mM a los diferentes valores de pH estudiados, variando la relación volumétrica anteriormente descrita, también se muestra la información en forma de tablas para las longitudes de onda con su respectiva absorbancia y los valores de potencial zeta y tamaño de partícula medido para cada uno de los nuevos sistemas estos últimos incluidos en la sección de anexos. Los análisis por DLS y UV-Vis se realizaron simultáneamente, después de transcurridos 10 minutos de agitación magnética a una velocidad aproximada de 1078 rpm para cada ensayo.

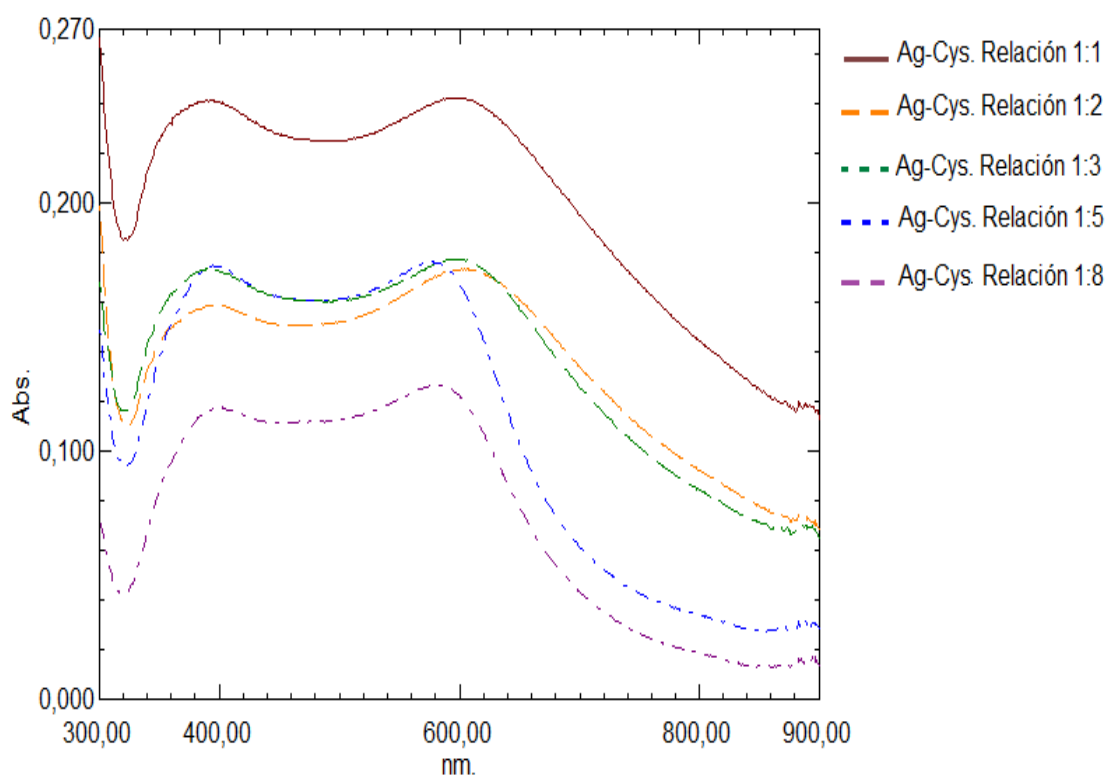


Figura 12. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 1,5 y diferentes relaciones volumétricas a pH aproximadamente neutro

Tabla 2. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cis [10mM] a pH 1,5 y diferentes relaciones volumétricas

ENSAYO	λ_1(nm)	Abs(uni)	λ_2 (nm)	Abs(uni)
*AgNP	396	1,476	-	-
Ag-Cys. Relación 1:1	390	0,247	596	0,242
Ag-Cys. Relación 1:2	323	0,111	607	0,111
Ag-Cys. Relación 1:3	393	0,173	598	0,177
Ag-Cys. Relación 1:5	401	0,117	582	0,126
Ag-Cys. Relación 1:8	397	0,174	577	0,174

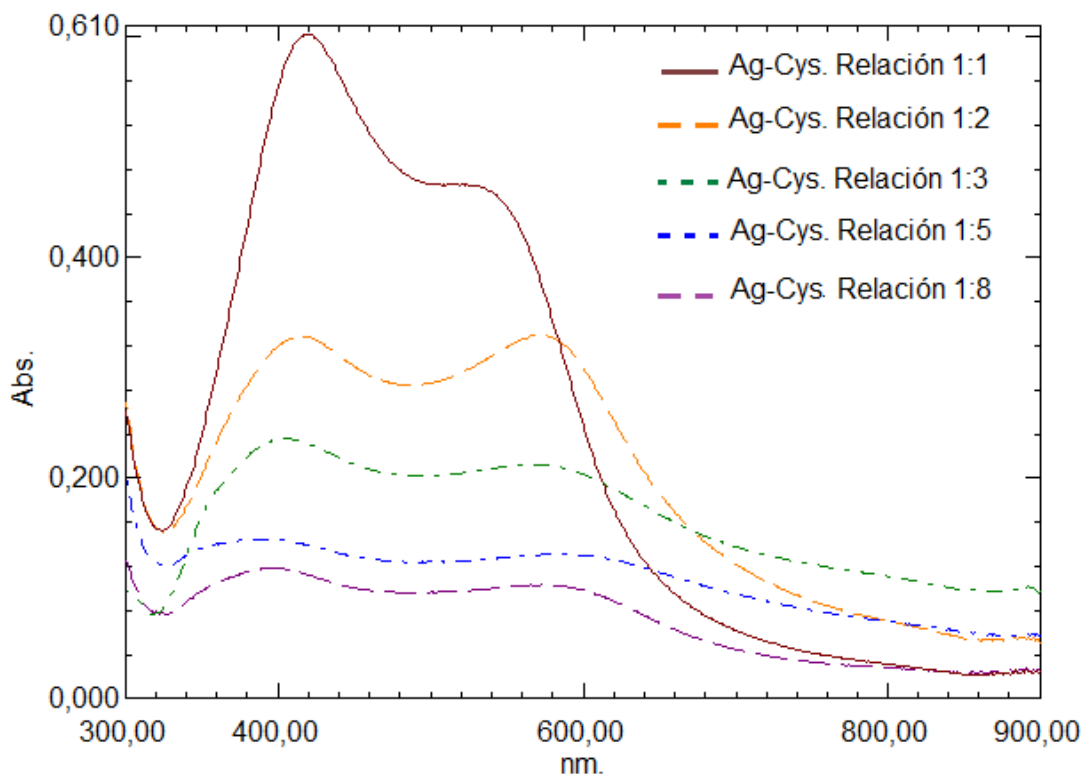


Figura 13. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 3,0 y diferentes relaciones volumétricas

Tabla 3. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cis [10mM] a pH 3,0 y diferentes relaciones volumétricas

ENSAYO	$\lambda_1(nm)$	Abs(uni)	$\lambda_2 (nm)$	Abs(uni)
*AgNP	396	1,476	-	-
Ag-Cys. Relación 1:1	419	0,602	-	-
Ag-Cys. Relación 1:2	415	0,328	572	0,329
Ag-Cys. Relación 1:3	405	0,235	565	0,212
Ag-Cys. Relación 1:5	391	0,144	587	0,130
Ag-Cys. Relación 1:8	394	0,118	574	0,102

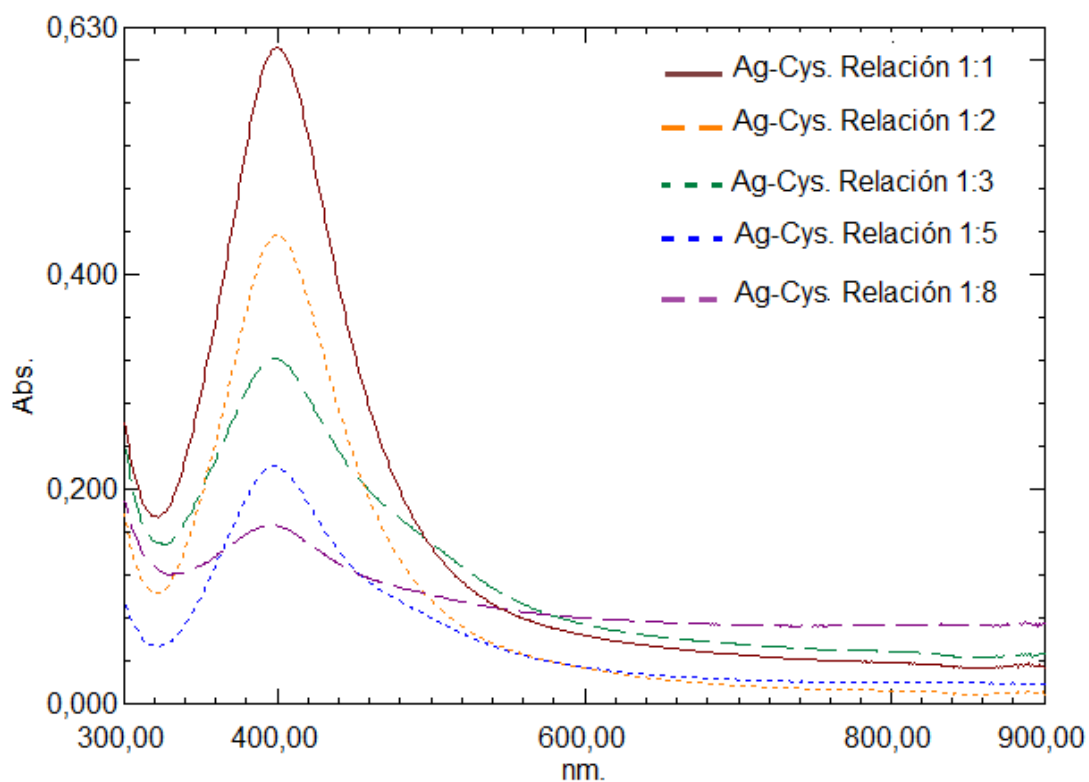


Figura 14. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 6,0 y diferentes relaciones volumétricas

Tabla 4. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cis [10mM] a pH 6,0 y diferentes relaciones volumétricas

ENSAYO	$\lambda_1(nm)$	Abs(uni)	$\lambda_2 (nm)$	Abs(uni)
*AgNP	396	1,476	-	-
Ag-Cys. Relación 1:1	400	0,610	-	-
Ag-Cys. Relación 1:2	400	0,437	-	-
Ag-Cys. Relación 1:3	398	0,321	-	-
Ag-Cys. Relación 1:5	398	0,221	-	-
Ag-Cys. Relación 1:8	395	0,166	-	-

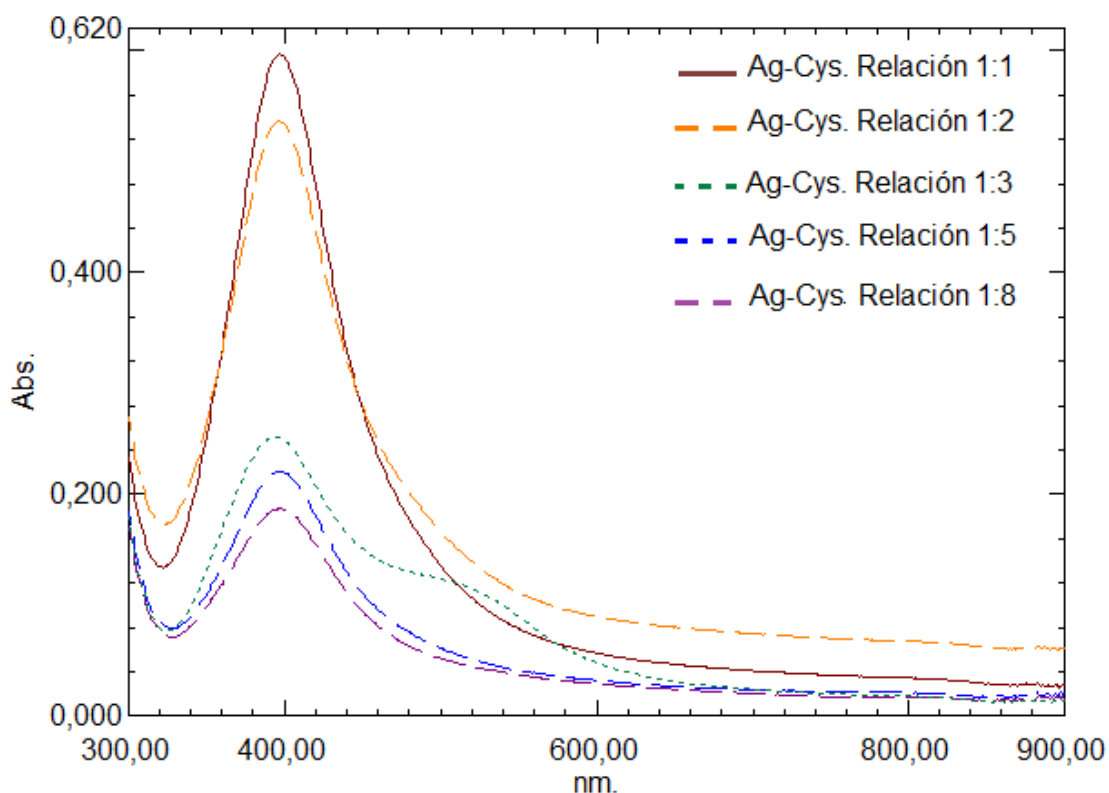


Figura 15. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 7,5 y diferentes relaciones volumétricas.

Tabla 5. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cis [10mM] a pH 7,5 y diferentes relaciones volumétricas

ENSAYO	λ_1 (nm)	Abs(uni)	λ_2 (nm)	Abs(uni)
*AgNP	396	1,476	-	-
Ag-Cys. Relación 1:1	397	0,595	-	-
Ag-Cys. Relación 1:2	396	0,535	-	-
Ag-Cys. Relación 1:3	394	0,251	-	-
Ag-Cys. Relación 1:5	397	0,220	-	-
Ag-Cys. Relación 1:8	397	0,186	-	-

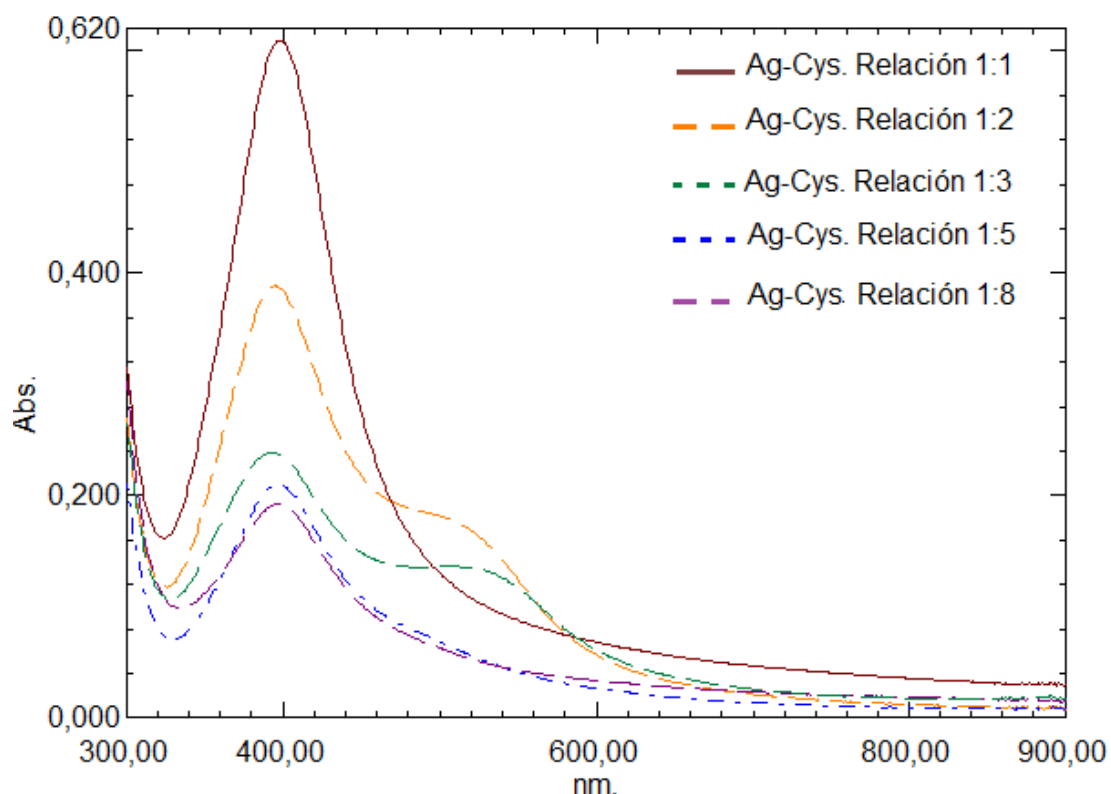


Figura 16. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 8,6 y diferentes relaciones volumétricas

Tabla 6. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cis [10mM] a pH 8,6 y diferentes relaciones volumétricas

ENSAYO	$\lambda_1(nm)$	Abs(uni)	$\lambda_2 (nm)$	Abs(uni)
*AgNP	396	1,476	-	-
Ag-Cys. Relación 1:1	398	0,608	-	-
Ag-Cys. Relación 1:2	395	0,387	-	-
Ag-Cys. Relación 1:3	393	0,238	-	-
Ag-Cys. Relación 1:5	397	0,209	-	-
Ag-Cys. Relación 1:8	396	0,191	-	-

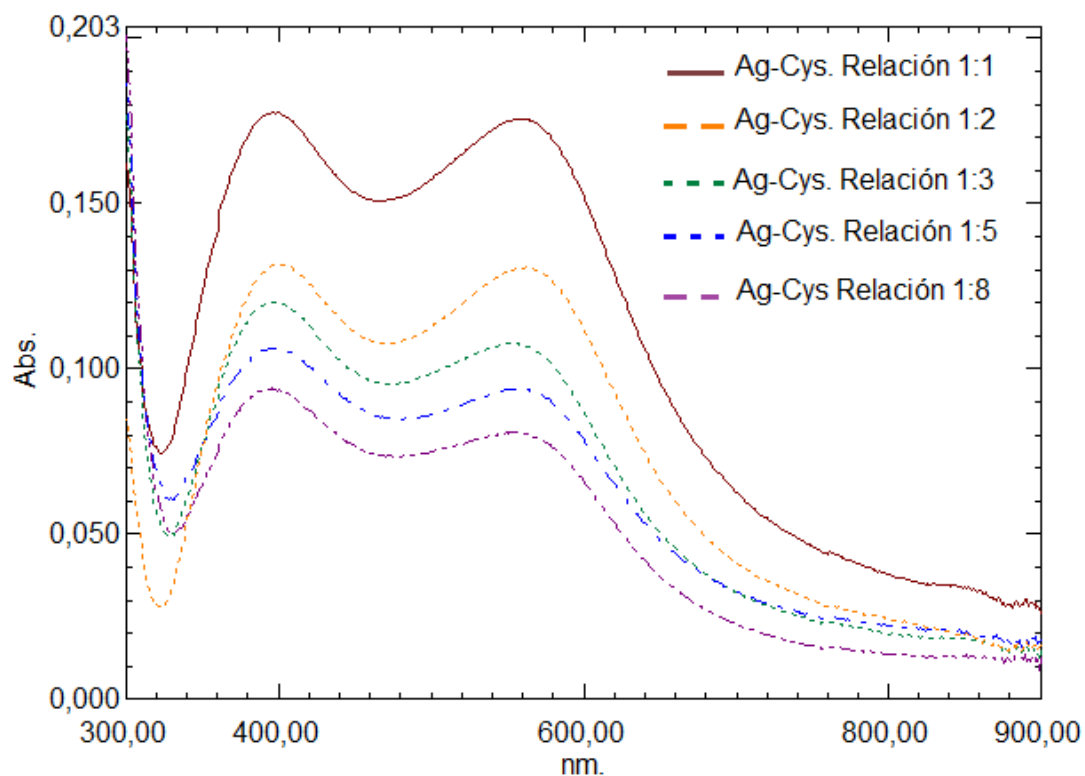


Figura 17. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 11,0 y diferentes relaciones volumétricas

Tabla 7. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cis [10mM] a pH 11,0 y diferentes relaciones volumétricas

ENSAYO	$\lambda_1(\text{nm})$	Abs(uni)	$\lambda_2(\text{nm})$	Abs(uni)
*AgNP	396	1,476	-	-
Ag-Cys. Relación 1:1	399	0,131	563	0,130
Ag-Cys. Relación 1:2	396	0,175	557	0,177
Ag-Cys. Relación 1:3	396	0,120	553	0,107
Ag-Cys. Relación 1:5	396	0,106	556	0,094
Ag-Cys. Relación 1:8	394	0,094	554	0,080

* Datos obtenidos para el coloide de plata sintetizado inicialmente.

Como puede observarse en los espectros UV-Vis registrados, el parámetro más influyente en la funcionalización es el pH del aminoácido.

A un pH igual 1,5; valor por debajo del pK_{a1} (1.9), es atribuida una carga positiva (+1) al aminoácido, producto del estado protonado del grupo α -amino ($-\text{NH}_3^+$); adicional a esto, el grupo α -carboxilo se encuentra aún en su forma iónica protonada. Dados estos parámetros, ha de esperarse que la interacción con estos dos grupo no sea favorecida significativamente, ya que las AgNP con superficie electropositiva tendrán mayor afinidad por grupos funcionales de naturaleza nucleofílica, de este modo será mucho más factible la absorción de las moléculas de L-cisteína a través su grupo lateral libre sulfhídrido ($-\text{SH}$), que pese a no encontrarse aún ionizado es un grupo altamente donador de electrones. La funcionalización bajo este pH se evidenció por un cambio de coloración en la solución, desde amarillo a morado y finalmente permaneció con una coloración rosada.

En el espectro UV-Vis (figura 12) se observa la disminución en la absorbancia correspondiente a la banda de resonancia plasmónica del coloide de plata, y también se hace evidente la aparición de una segunda banda de absorción entre 577-607 nm, de acuerdo con la relación volumétrica usada. Éste comportamiento en el espectro, indica la presencia de agregados Ag-Cys que bajo este valor de pH ha sido favorecida.

Por otra parte, sí aumentamos un poco el pH a un valor igual a 3,0; por encima del pK_{a1} , el grupo α -carboxilo se encontrará en su forma desprotonada, otorgando al aminoácido una carga neta igual a cero. El análisis UV-Vis mostró un comportamiento similar al alcanzado con un pH igual a 1,5. Sin embargo a este valor de pH igual a 3,0 la interacción de las moléculas del aminoácido es favorecida para dos grupos funcionales, tanto para el carboxilato (COO^-) como por el sulfhídrido ($-\text{SH}$). La funcionalización a este valor de pH, dio como resultado una solución de coloración rosada intensa que con el tiempo se fue debilitando y la aparición de una segunda

banda de absorción ubicada alrededor de 575-587 nm que se observa en el espectro UV-Vis (figura 13).

Al evaluar un pH igual a 11,0; valor por encima de los tres pKa; el aminoácido tendrá atribuida una carga neta (-2) producto de la desprotonación que sufren: el grupos α -amino, α -carboxilo y el sulfhídrido. Este comportamiento iónico de las moléculas de L-cisteína favorece tres posibles interacciones con las AgNP. Siendo la interacción con el grupo α -amino la menos favorecida por el impedimento estérico causado por los átomos de hidrogeno enlazados al nitrógeno, este último, quien sería el donador de electrones.

Los resultados obtenidos para los valores de pH iguales a 6,0 y 7,5, cercanos a la neutralidad, mostraron interacciones muy débiles, no se observó la presencia de otras bandas de absorbancia diferentes a las del coloide, sin embargo se dio lugar al ensanchamiento del pico y disminución de la absorbancia de éste, lo cual puede indicar el crecimiento de las nanopartículas y la formación de agregados. A los valores de pH mencionados se presenta en gran medida el comportamiento zwitteriónico del aminoácido, lo que dará lugar a fuertes interacciones intermoleculares de las moléculas de L-cisteína en solución.

Por tanto, la interacción que pueda existir entre moléculas de L-cys y AgNP es débil y favorecida en menor proporción comparada con otros valores de pH.

Al fijar el pH en 8,6; muy cercano al pKa₃, al cual el grupo sulfhídrido se encuentra en su forma desprotonada, dando al aminoácido una carga neta (-1). El análisis por ultravioleta visible mostró el ensanchamiento de los picos, lo cual está relacionado como ya se ha mencionado al crecimiento y agregación de las NP. Sin embargo se observó que para las relaciones volumétricas 1:2 y 1:3 aparece un hombro a lado derecho del pico, atribuido a la interacción Ag-Cys que puede tener lugar. Este pH en comparación con

valores ácidos, no mostró interacciones fuertes, posiblemente como resultado de la abundancia de iones OH^- que resultan ser más lábiles en la absorción de iones negativos sobre la superficie de AgNP.

4.2.3 Análisis DLS del efecto de la relación volumétrica y el pH

Los análisis por DLS confirmaron la formación de agregados, Ag-Cys, en los cuales se observó el crecimiento elevado de las partículas, ya que el coloide de plata de partida presentó diámetros de 1,6 nm en un 6,7% y 13,4 nm en un 93,3%. Como producto de la funcionalización se alcanzaron diámetros desde 210-300 nm para L-cys a pH 1,5; 180-685 nm para L-cys a pH 3,0; 266-414 nm para L-cys a pH 11,0. Los agregados presentes en los sistemas a pH 6,0; 7,5 y 8,6 presentaron distribuciones de tamaños muy amplias y polidispersión en las medidas, entre las cuales se observan diámetros aún alrededor de 6,5-169 nm para L-cys a pH 6,0; 1-300 nm para L-cys a pH 7,5; 2-212 nm para L-cys a pH 8,6. (Esta información se recopiló a manera de tablas en la sección de Anexos)

El efecto del pH fue altamente significativo sobre las fuerzas de repulsión electrostáticas, por las cuales se estabilizó el coloide de plata formado; la presencia de iones H^+ provenientes de las soluciones ácidas del aminoácido, extraen y equilibran muchos de los iones OH^- que en un principio fueron absorbidos por la superficie de las AgNP, este efecto crea una descompensación y por ende la inestabilidad del coloide; por otra parte, la presencia de más iones OH^- , aumenta la cantidad de iones absorbidos y por tanto el potencial zeta del sistema tomará valores más negativos. Este comportamiento es observado en las mediciones de potencial zeta para cada uno de los ensayos realizados, los cuales se presentan a manera de tablas en la sección de anexos.

4.2.4 Análisis UV-Vis de la estabilidad en el tiempo de la interacción Ag-Cys

El estudio cinético se inició 1 minuto después de haber introducido la muestra en el espectrofotómetro. La adquisición de espectros se realizó cada 5 minutos hasta alcanzar un tiempo total de 30 minutos, acumulando un total de 7 espectros. Para estos ensayos se considero la relación volumétrica 1:2. Se escogió los valores de pH iguales a 1,5; 3,0 y 11,0 respectivamente.

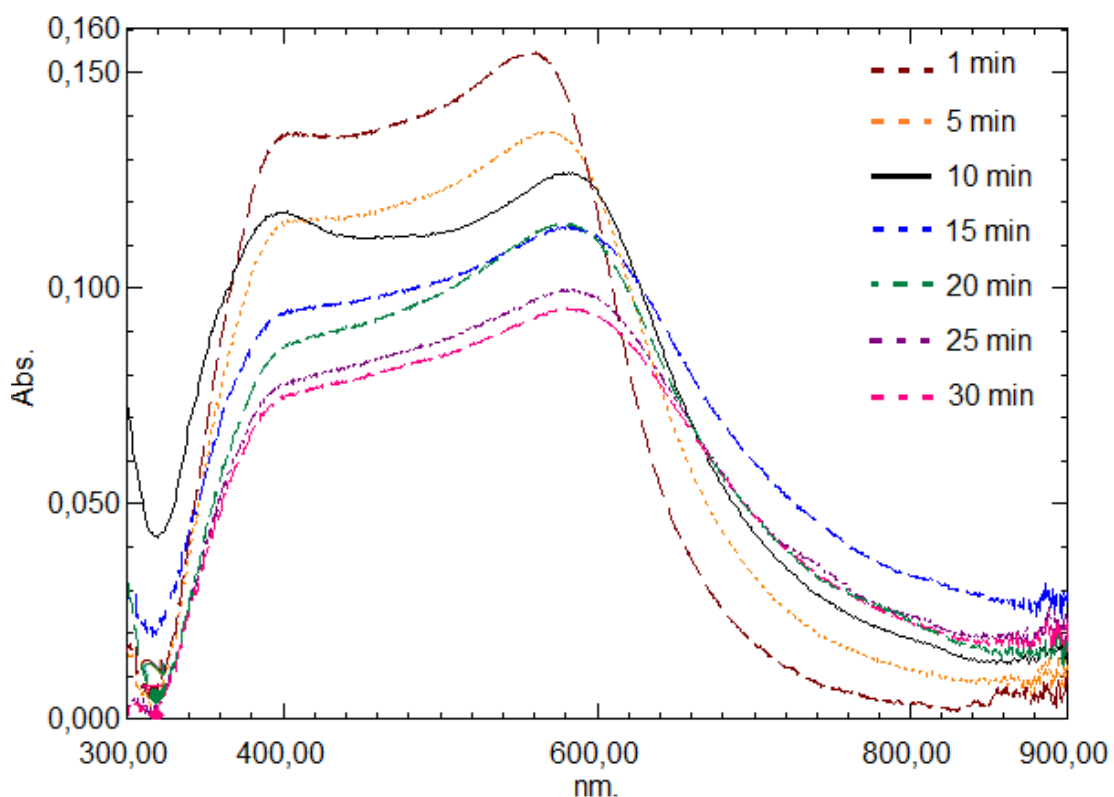


Figura 18. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 1,5 en relación volumétrica 1:2

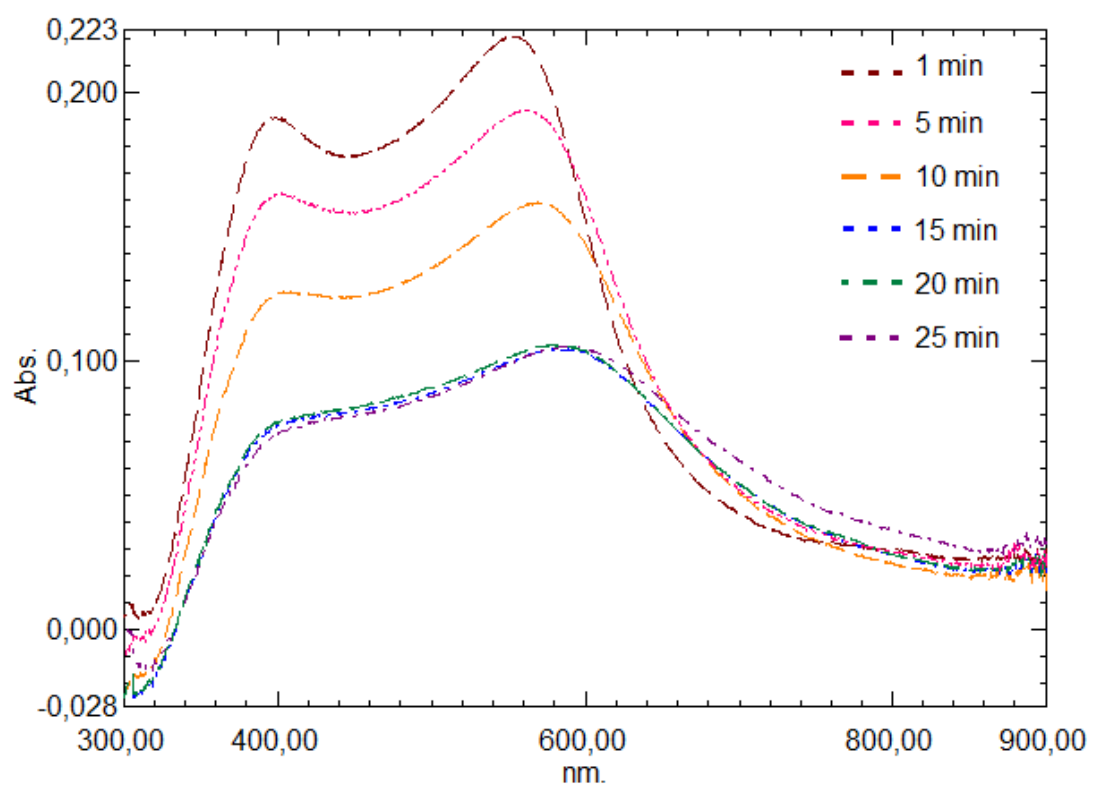


Figura 19. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 3,0 en relación volumétrica 1:2

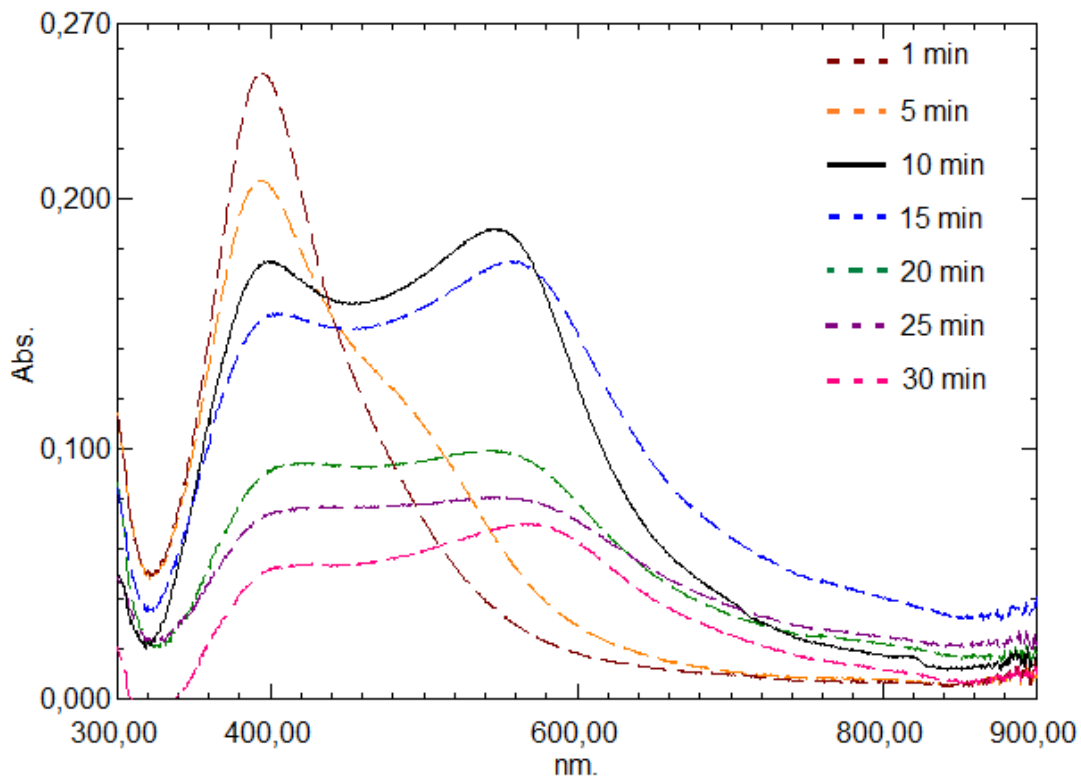


Figura 20. Espectro UV-Vis. Funcionalización AgNP con L-cys 10mM a pH 11,0 en relación volumétrica 1:2

En los análisis UV-Vis se observó la fuerte tendencia en la disminución de la absorbancia para los ensayos realizados en un lapso de tiempo de 30 minutos. Esta disminución es producto de la inestabilidad de las interacciones electrostáticas que tienen lugar en la funcionalización. La presencia de otros iones circundantes, tanto negativos como positivos generados en la síntesis de la AgNP, y los provenientes del proceso de funcionalización y los ajustes de pH con ácido y base, influyen drásticamente sobre la estabilidad del sistema ya que modifican las fuerzas electrostáticas que allí tienen lugar, beneficiando la agregación y sedimentación de las partículas en un corto periodo de tiempo.

5. CONCLUSIONES

La efectividad de los procesos de funcionalización de nanopartículas de plata con aminoácidos está directamente relacionada con el control estricto que se realice sobre los parámetros experimentales, como lo es, especialmente el pH. Ya que bajo ciertos valores será favorecida en gran medida o medianamente, la interacción entre la AgNP con alguno de los grupos funcionales presentes en la molécula, no solo por la forma iónica del aminoácido dependiente del pH, sino además por el efecto significativo que tiene este parámetro sobre los valores de potencial zeta del sistema. Las nanopartículas de plata absorbieron satisfactoriamente los grupos funcionales donadores de electrones como lo son la forma desprotonada del grupo α -carboxilo y el grupo sulfhídrido, sin embargo puede existir clara competencia entre ellos, o aún más, ambos grupos pueden estar siendo absorbidos simultáneamente, cuando el valor de pH del medio supera el pK_{a1} (1,9). La experimentación a valores de pH básicos, también favoreció el acoplamiento entre las moléculas del aminoácido y las NP.

Por medio de este trabajo se logró establecer un mínimo de concentración molar para la L-cisteína, que bajo las condiciones trabajadas arrojó resultados óptimos para la funcionalización, sin embargo debe considerarse que prácticamente para un rango entre 0,5-10mM se observó una respuesta positiva frente a la conjugación con AgNP, siendo la mayor concentración dentro de este rango, la que brindó apreciaciones más significativa de los fenómenos que tiene lugar en dicho proceso. En cuanto a la relación volumétrica se puede inferir que a medida que las se aumenta esta relación, las intensidades de absorbancia tanto para el coloide de plata, como para los conjugados formados disminuyen. Este comportamiento se relaciona directamente con el efecto que tienen la presencia de contra iones, H^+ circundantes, para el caso de valores de pH ácido, estos iones aumentan en la medida en que es adicionada más solución de L-cisteína, los cuales

equilibran los iones negativos presentes en lo que se conoce como la capa difusa de iones absorbidos, reduciendo la distancia de ésta, lo cual conlleva finalmente a la reducción de las fuerzas de repulsión electrostáticas y por ende la agregación y sedimentación.

Es imprescindible para estos estudio de funcionalización, hacer uso de las técnicas espectroscópicas como: ultravioleta visible, la cual permitió profundizar acerca de los efectos significativos sobre la longitud de absorbanca del plasmón que tiene lugar por cambios en de los parámetros de funcionalización; UV-Vis es una técnica rápida, no destructiva que fue utilizada en este trabajo para realizar un seguimiento continuo en cada uno de los experimentos realizados. El uso de técnicas microscópicas como: microscopia de transmisión electrónica y dispersión de luz dinámica, son de gran utilidad en el momento de caracterizar sistemas coloidales, permitiendo el análisis profundo de la estructura, tamaño y morfología de las partículas presentes en dichos sistemas. Adicionalmente, las medidas de potencial zeta son una herramienta eficaz para predecir la estabilidad termodinámica de las nanopartículas así como de los agregados funcionalizadas.

RECOMENDACIONES

- Es necesario estandarizar un método de síntesis de nanopartículas de plata por reducción con borohidruro de sodio, que permita ejercer el control estricto sobre las variables del proceso de reducción, para así obtener con precisión NP con tamaño y forma específicas.
- Para investigaciones futuras en el campo de la funcionalización de aminoácidos, si se desea orientar el acoplamiento de las NP con un sitio específico de la molécula, especialmente, la interacción con el grupo sulfhídrico, (SH), se recomienda usar derivados del aminoácido que tengan el grupo α -carboxilo metilado; esto evita significativamente la competencia de estos dos grupos donadores de electrones por ser absorbidos sobre la superficie de las nanopartículas.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

Á. B. SIFONTES et al., "Preparación de nanopartículas de plata en ausencia de polimeros estabilizantes". Quim. Nova, (2010), Vol. 33(6), p. 1266-1269.

A. L. GONZÁLEZ and C. NOGUEZ., "Influence of Morphology on the Optical Properties of Metal Nanoparticles". Journal of Computational and Theoretical Nanoscience. (2007), Vol. 4, Pag. 231–238.

A. MAJZIK et al., "Functionalization of gold nanoparticles with amino acid, B-amyloid peptides and fragment". Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. (2010), p. 235–241.

A. NAIK., "Fundamentos del microscopio electrónico y su aplicación en la investigación textil" (2009).

A. ROUCOUX et al., "Reduced transition metal colloids: a novel family of reusable catalysts". Chem. Rev. (2002), Vol. 102. Pag. 3757-3778.

A.R. GUERRERO., "Explorando la estructura de péptidos conjugados a nanopartículas metálicas". Universidad de Chile, Departamento de Química Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica Farmacológica y Toxicológica. Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Santiago, Chile 2008.

C. BAKER et al., "Synthesis and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticle". Journal of Nanoscience and Nanotechnology. (2005), Vol. 5(2), Pág. 244-249,

D. A. SKOOG and J.J. LEARY., "Análisis Instrumental". Ed. McGraw-Hill. Madrid.

D. VOET., "Fundamentos de Bioquímica. 2^{da} Edición. Editorial Panamericana

F. MAFUNÉ et al., “Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation”. *J. Fisical Chemistry B.* (2000), Vol. 104, (35). Pag. 8333–8337.

G. A. NARVAEZ et al., “Effects of morphology on phonons in nanoscopic silver grains”. *Phys. Rev. B.* (2005), Vol. 72, 15541.

G. MIE., “Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen”. *Ann. Phys.* (1908), Vol. 25(3), p. 377–445.

H. WEI et al., *Nanotechnology.* (2007), Vol. 18, p. 175610.

I. LEVINE., *Fisicoquímica: Química de superficies.* Vol. 2^a Edición, editorial McGraw-Hill. Madrid (1996), p. 379–405.

I. OLMEDO., “Obtención de conjugados de péptidos-nanopartículas metálicas con potenciales aplicaciones biomédicas”. Memoria para optar al título de Químico-Farmacéutico. Universidad de Chile. Santiago, Chile (2007).

J. ISRAELACHVILI., *Intermolecular and Surface Forces.* 2^a ed. San Diego (CA): Academic Press. (1992).

J.H. DUFFUS et al., “IUPAC: Glossary Of Terms Used In Toxicology, 2^a Edición. *Pure appl. Chem.* (2007) Vol. 79 (7), p. 1153–1344

J.S. KIM et al., “Antimicrobial effects of silver nanoparticles” *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.* (2007), Vol. 3(1), p. 95–101.

K. TAPAN and C.J. MURPHY., “Room Temperature, High-Yield Synthesis of Multiple Shapes of Gold Nanoparticles in Aqueous Solution”. *JACS Communication,* (2004).

L.A. CLEMENTI., Asociacion Argentina de Materiales. 2do Encuentro de Jóvenes Investigadores en Ciencia y Tecnología de Materiales – Posadas – Misiones, 16 - 17 Octubre 2008.

M. KOGAN et al., “Nanoparticle-mediated local and remote manipulation of protein aggregation”. *Nano Lett.* (2006), Vol. 6(1), p. 110–115.

M. REETZ, and W. HELBIG., “Size-selective synthesis of nanostructured transition metal clusters”. *J. Am. Chem. Soc.*,(1994), Vol. 116, pag. 7401-7402.

MALVERN INSTRUMENTS., Zeta Potential Theory. By: Malvern Instruments. Zetasizer Nano Series User Manual. Malvern, Worcestershire, Inglaterra. (2004).

O. ESTEVEZ-HERNANDEZ et al., “Gold nanoparticles conjugated to benzoylmercaptoacetyltriglycine and L-cysteine methylester”. *Journal of Colloid and Interface Science.* (2010), Vol. 350, p. 161–167.

O. V. DEMENTEVA et al., “Comparative Study of the Properties of Silver Hydrosols Prepared by “Citrate” and “Citrate–Sulfate” Procedures”. *Colloid Journal.* (2008), Vol. 70(5), p. 561–573.

P. C. LEE and D. MEISEL., “Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols”. *J. Phys. Chem.* (1982), Vol. 86, p. 3391-3395.

P. SOMASUNDARAN et al., “In Concentrated Dispersions” ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC. (2004).

Q.A. PANKHURST et al., “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine”. *J Phys D: Appl Phys.* (2003), Vol. 36(13), p. 167-181.

R. DERRICK et al., *Infrared Spectroscopy in conservation science*. p. 7-13.

R.F. AROCA., “The interaction of light with nanoscopic metal particles and molecules on smooth reflecting surfaces”. En: Surface-enhanced vibrational spectroscopy. John Wiley & Sons. (2006), p. 35-71.

S. GÜNTER., “Nanoparticles: From theory to application” Wiley-VCH, 2004.

S. BUENDIA ACEVES., “Síntesis de nanopartículas de hierro con propiedades magnéticas obtenidas vía precursores organometálicos”. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencia en Ingeniería Química. Instituto Politécnico Nacional, México. 2009.

S. JAISWALA et al. ” Enhancement of the antibacterial properties of silver nanoparticles using β -cyclodextrin as a capping agent”. International Journal of Antimicrobial Agents. (2010), Vol. 36 (3), p. 280-283.

S. KENNETH et al., ” Sonochemical Synthesis of Iron Colloids”. J. Am. Chem. Soc. (1996), Vol. 118, p. 11960-11961.

S. MARTÍNEZ et al. “Study of mixed sulfured and oxidized Mo and Ni nanoparticles supported on alumina obtained by thermal decomposition method”. Aci. (2011), Vol. 2(2), p. 47-57.

S.K. BASIRUDDIN et al. “Advances in Coating Chemistry in Deriving Soluble Functional Nanoparticle”. J. Phys. Chem. C. (2010) Vol. 114, p. 11009-11017.

X. OMING DOU et al. “Surface-Enhanced Raman Scattering of Biological Molecules on Metal Colloid II: Effects of Aggregation of Gold Colloid and Comparison of Effects of pH of Glycine Solutions between Gold and Silver Colloids”. Society for Applied Spectroscopy. (1999), Vol. 53(11), p. 1440-1441.

ANEXOS

FORMA IÓNICA DE LA L-CISTEÍNA EN FUNCIÓN DEL pH

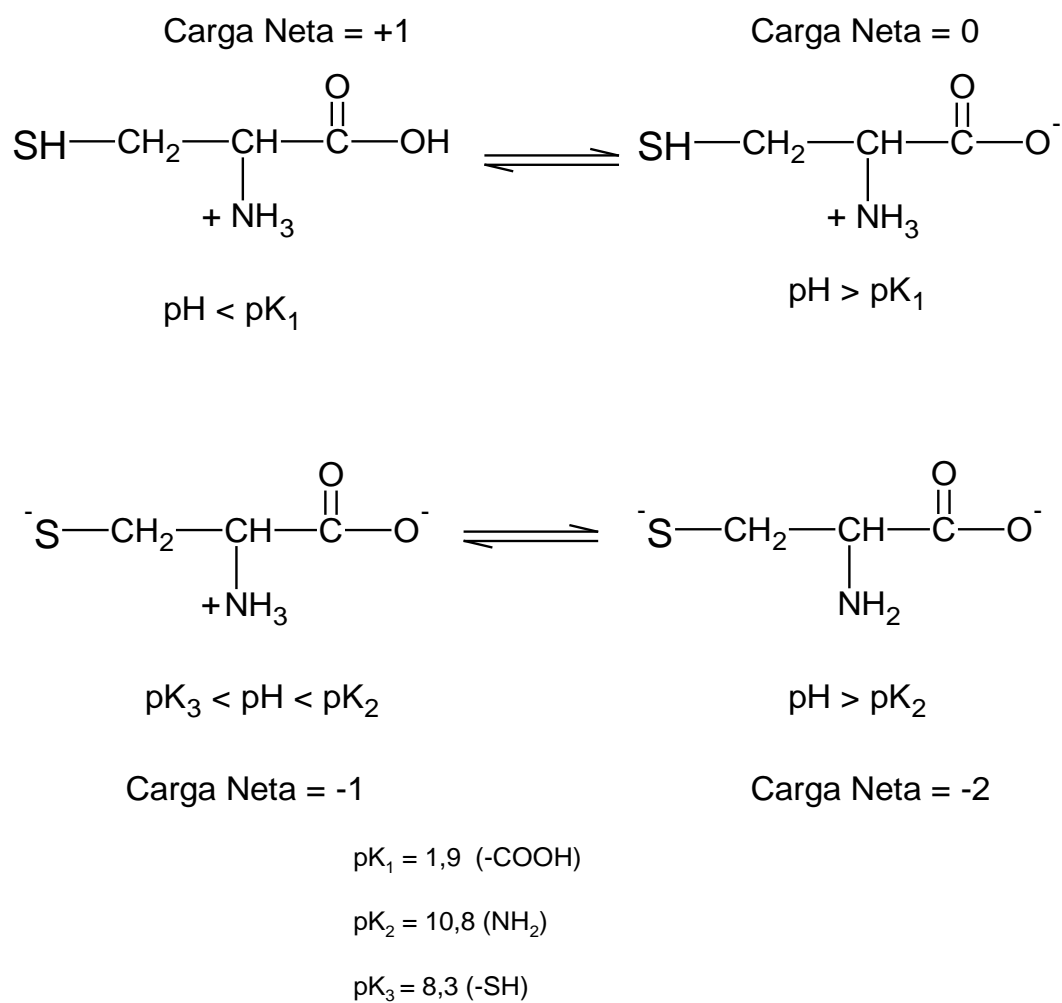


Figura 21. Esquema forma iónica de la L-cisteína en función del pH.

ESPECTROS UV-Vis PARA LA FUNCIONALIZACIÓN DE AgNP CON L-CISTEÍNA DE DIFERENTE CONCENTRACIÓN MOLAR.

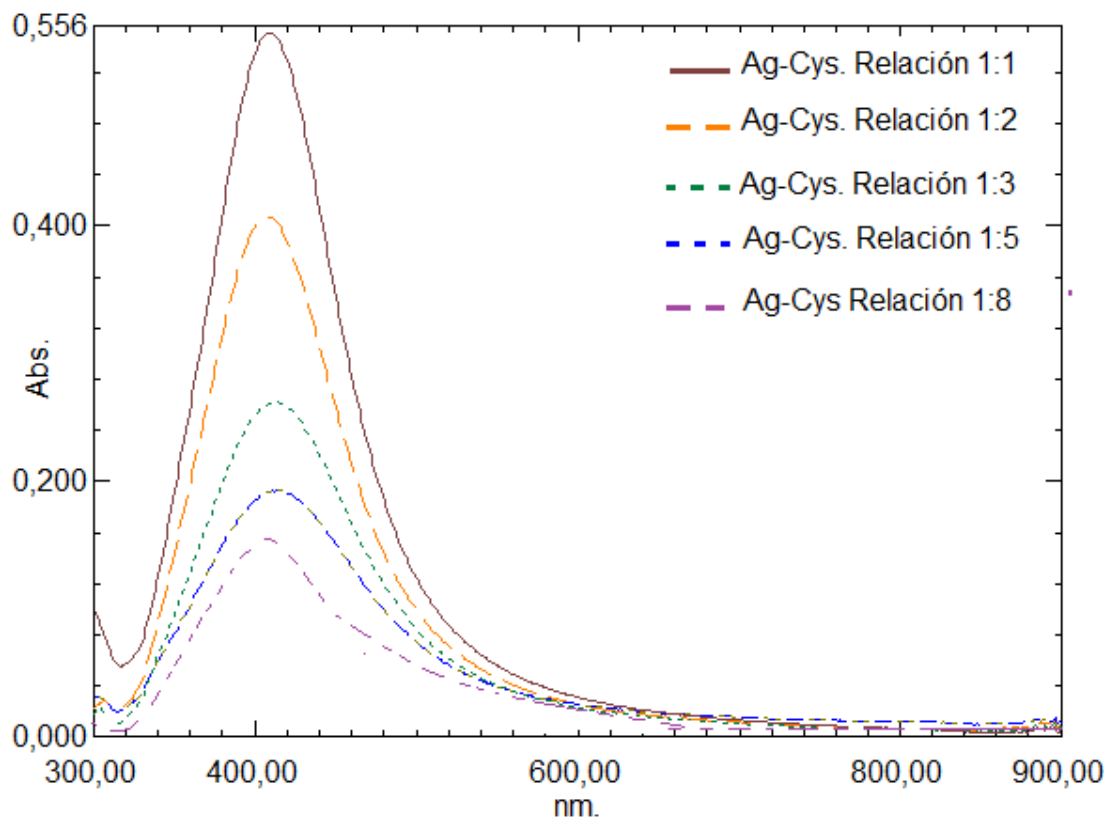


Figura 22. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [0.5mM] en diferentes relaciones volumétricas

Tabla 8. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [0,5mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

ENSAYO	$\lambda_{M\acute{a}x}$, (nm)	Abs, (unidades)
*AgNP	396	1,476
Ag-Cys. Relación 1:1	408	0,550
Ag-Cys. Relación 1:2	408	0,406
Ag-Cys. Relación 1:3	412	0,261
Ag-Cys. Relación 1:5	415	0,192
Ag-Cys. Relación 1:8	414	0,131

*Datos obtenidos para el coloide de plata sintetizado inicialmente.

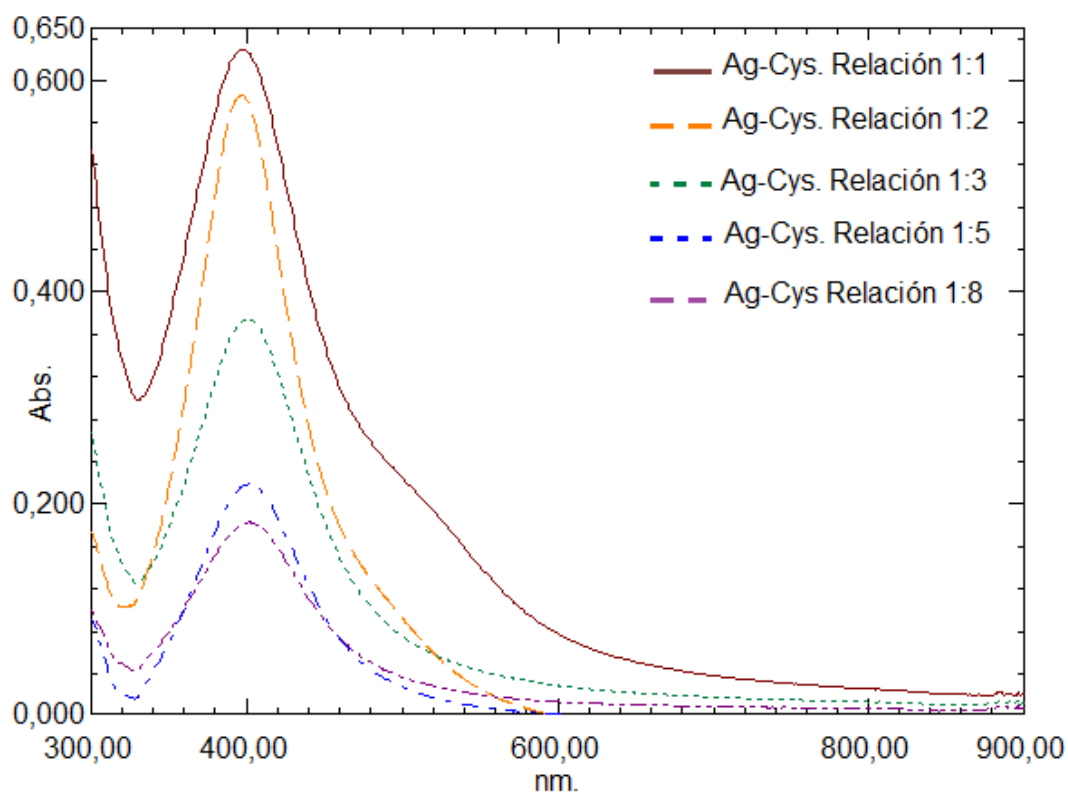


Figura 23. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [1mM] en diferentes relaciones volumétricas

Tabla 9. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [1mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

ENSAYO	$\lambda_{\text{Máx}}$, (nm)	Abs, (unidades)
*AgNP	396	1,476
Ag-Cys. Relación 1:1	397	0,630
Ag-Cys. Relación 1:2	397	0,586
Ag-Cys. Relación 1:3	401	0,374
Ag-Cys. Relación 1:5	402	0,218
Ag-Cys. Relación 1:8	402	0,182

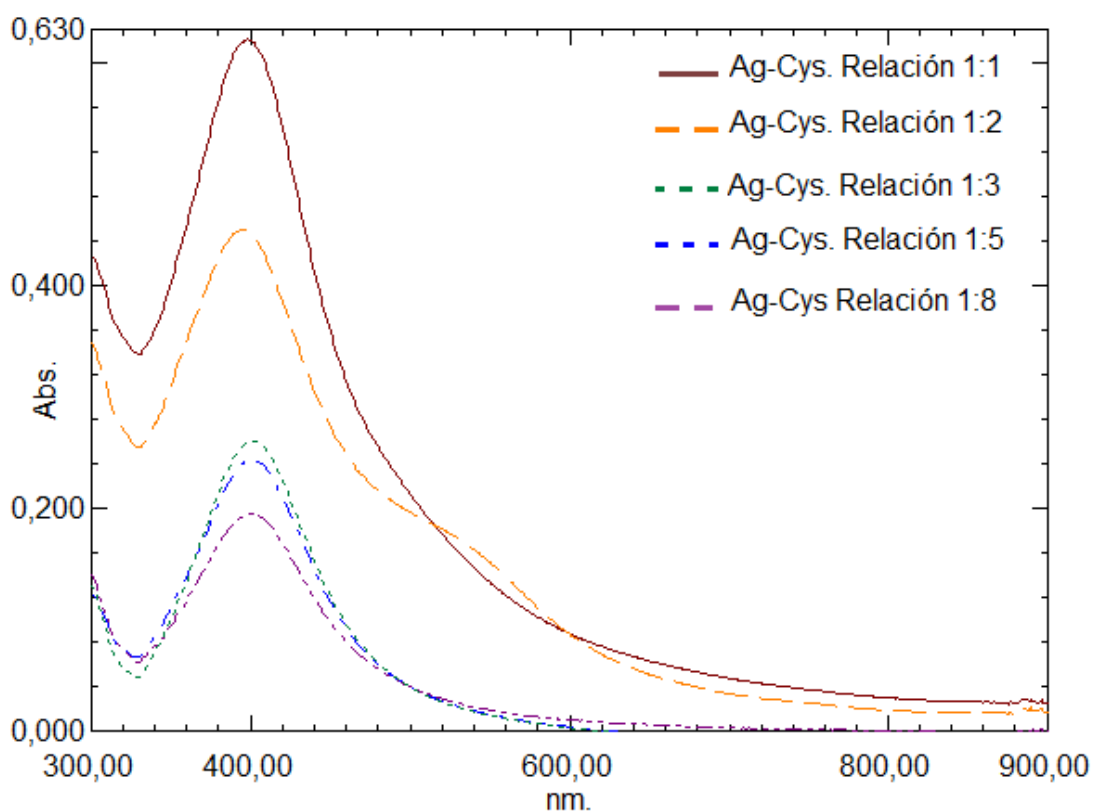


Figura 24. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [3mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

Tabla 10. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [3mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

ENSAYO	$\lambda_{\text{Máx}}$, (nm)	Abs, (unidades)
*AgNP	396	1,476
Ag-Cys. Relación 1:1	398	0,621
Ag-Cys. Relación 1:2	395	0,450
Ag-Cys. Relación 1:3	401	0,260
Ag-Cys. Relación 1:5	401	0,243
Ag-Cys. Relación 1:8	399	0,195

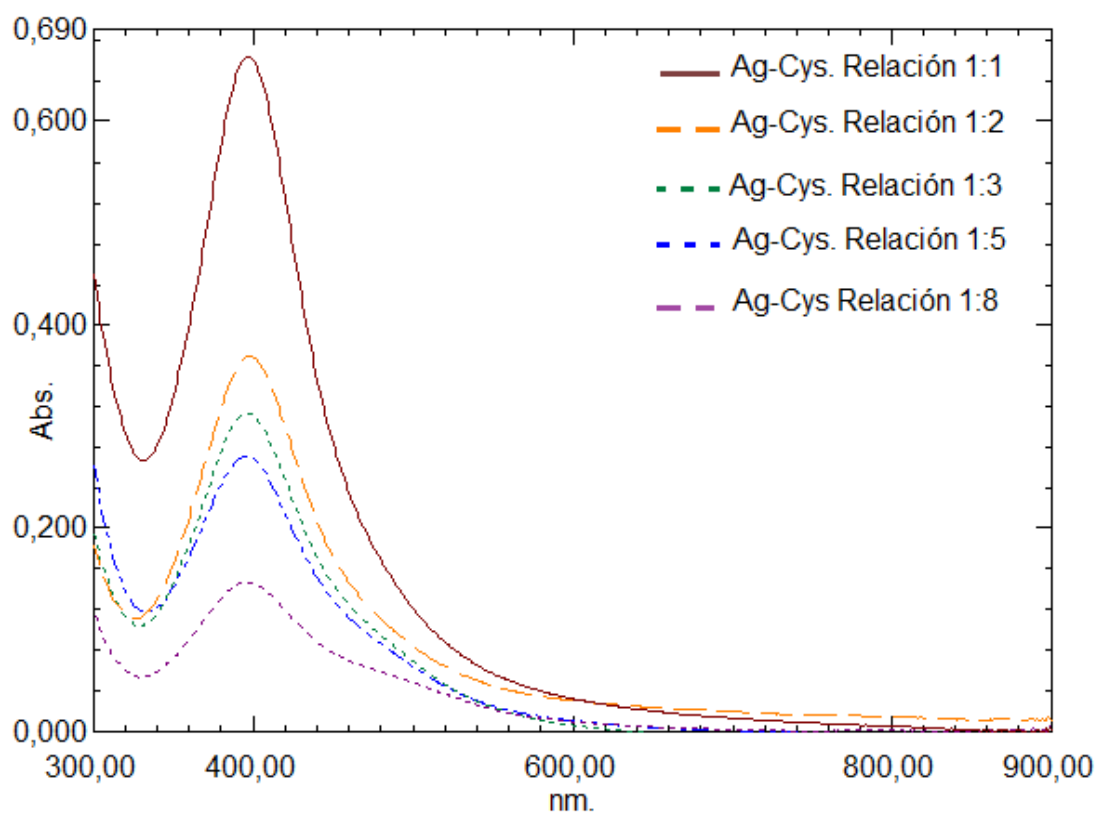


Figura 25. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [5mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

Tabla 11. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [5mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

ENSAYO	λ _{Máx.} (nm)	Abs, (unidades)
*AgNP	396	1,476
Ag-Cys. Relación 1:1	397	0,663
Ag-Cys. Relación 1:2	398	0,369
Ag-Cys. Relación 1:3	396	0,313
Ag-Cys. Relación 1:5	395	0,270
Ag-Cys. Relación 1:8	394	0,147

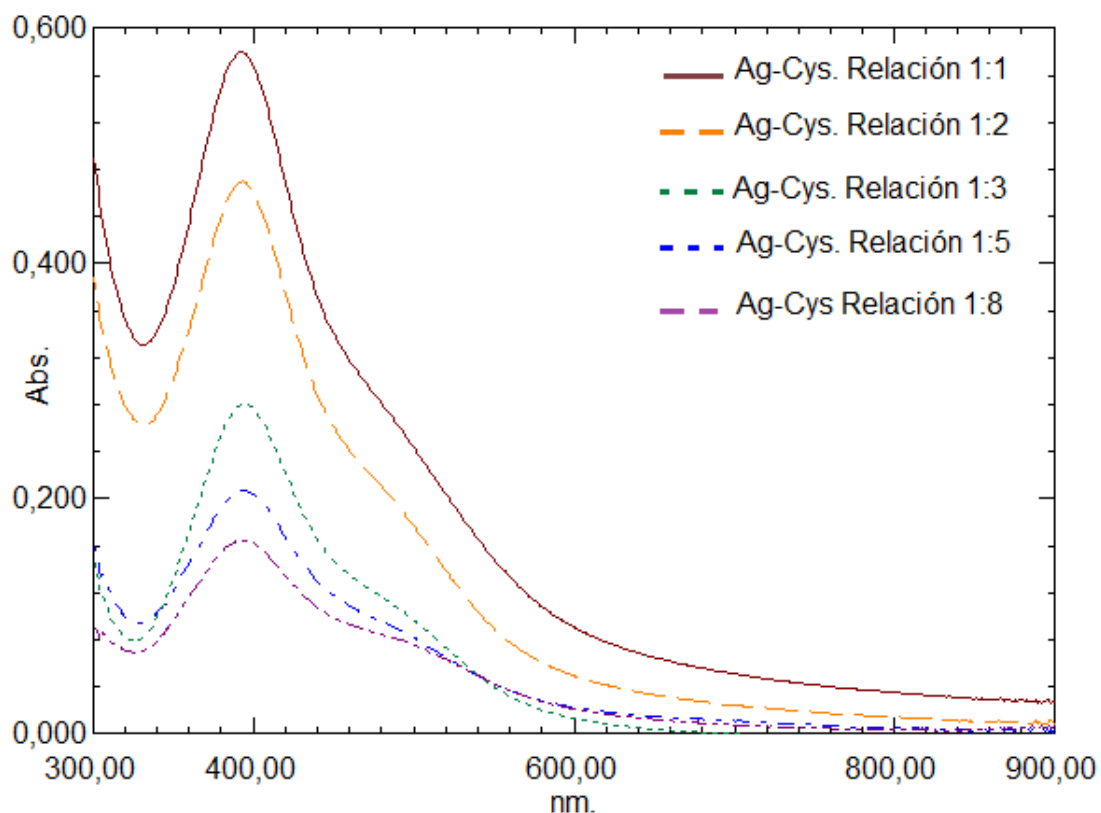


Figura 26. Espectro UV-Vis funcionalización Ag-Cys con L-Cys [10mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro.

Tabla 12. Análisis UV-Vis de funcionalización Ag-Cys con L-cys [10mM] en diferentes relaciones volumétricas a pH neutro

ENSAYO	$\lambda_{\text{Máx}}$, (nm)	Abs, (unidades)
*AgNP	396	1,476
Ag-Cys. Relación 1:1	397	0,663
Ag-Cys. Relación 1:2	398	0,369
Ag-Cys. Relación 1:3	396	0,313
Ag-Cys. Relación 1:5	395	0,270
Ag-Cys. Relación 1:8	394	0,147

TABLAS DE POTENCIAL ZETA Y TAMAÑO DE PARTICLULA MEDIDO A DIFERENTES VALORES DE pH Y A DIFERENTES RELACIONES VOLUMÉTRICAS DE AgNP A L-CYS

Tabla 13. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 1,5

<i>Ensayo</i>	<i>diámetro, (nm)</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
Ag-Cys. Relación 1:1	300 (100)*	-0,0043
Ag-Cys. Relación 1:2	254 (100%)*	-10,4
Ag-Cys. Relación 1:3	223 (100%)	12,4
Ag-Cys. Relación 1:5	210 (100%)	4,5
Ag-Cys. Relación 1:8	240 (100%)*	0,056

Tabla 14. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 3,0

<i>Ensayo</i>	<i>diámetro, (nm)</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
Ag-Cys. Relación 1:1	350 (93,2%); 73,7(6,8%) *	-0,106
Ag-Cys. Relación 1:2	685 (100%) *	-23,6
Ag-Cys. Relación 1:3	180 (100%)	0,0277
Ag-Cys. Relación 1:5	524 (100%)	16
Ag-Cys. Relación 1:8	467 (100%)	0.00456

Tabla 15. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 6,0

<i>Ensayo</i>	<i>diámetro, (nm)</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
Ag-Cys. Relación 1:1	16,9(47,2%); 46,9(27,7%) 56,5(24,8%);	-34,6

Ag-Cys. Relación 1:2	7,56(7,8%); 26,7(39,8%); 169,8(52,9%)	-0,812
Ag-Cys. Relación 1:3	63,6(100%)	-0,177
Ag-Cys. Relación 1:5	6,5(7,9%); 90,7(92,1%)	0,0148
Ag-Cys. Relación 1:8	110 (100%)	-35,8

Tabla 16. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 7,5

<i>Ensayo</i>	<i>diámetro, (nm)</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
Ag-Cys. Relación 1:1	1,1(5,4%); 11(80%); 48,2(64,5%)	-0,0194
Ag-Cys. Relación 1:2	21,6(2,22%); 376,6(77,8%)	-37
Ag-Cys. Relación 1:3	45,2(73,1%); 203,5(26,4%)	-29,9
Ag-Cys. Relación 1:5	26,6(28,7%); 404,1(71,3%)	0,118
Ag-Cys. Relación 1:8	20,79(17,3%); 300(82,7%)	-39

Tabla 17. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 8,6

<i>Ensayo</i>	<i>diámetro, (nm)</i>	<i>Potencial Zeta (mV)</i>
Ag-Cys. Relación 1:1	2,15(10,4%); 31,29(77,5%); 225,4(10,6%)	-25
Ag-Cys. Relación 1:2	66,4(100%)	-0,171
Ag-Cys. Relación 1:3	94,64(97,8%); 5115(2,2%) *	-24,8
Ag-Cys. Relación 1:5	28,4(70,4%); 164(29,6%)	-0,0798
Ag-Cys. Relación 1:8	28,3(56,2%); 212,3(43,8%)	-25,5

Tabla 18. Análisis por DLS y potencial zeta. Ag-Cys 10mM pH 11,0

Ensayo	diámetro, (nm)	Potencial Zeta (mV)
Ag-Cys. Relación 1:1	342(100%)	-23,3
Ag-Cys. Relación 1:2	266(53%); 953(47%)	-25
Ag-Cys. Relación 1:3	300(100%)*	-22,5
Ag-Cys. Relación 1:5	414(100%)	-0,0436
Ag-Cys. Relación 1:8	406,3(100%)	-19,5