UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

“Impacto de las sustancias húmicas, especies reactivas y la radiación solar sobre las propiedades físicas y químicas de nanomateriales y su interacción con biofilms”

Tesista:

Rodríguez Sartori, Damián Ezequiel

Directora:

González, Mónica Cristina

Codirectora:

Fernández Lorenzo, Mónica Alicia

Año:

2020

“Impacto de la sustancias húmicas, especies reactivas y la radiación solar sobre las propiedades físicas y químicas de nanomateriales y su interacción con biofilms”

Lic. Damián Ezequiel Rodríguez Sartori

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas - (INIFTA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. Mónica C. González y de la Dra. Mónica A. Fernández Lorenzo

Resumen

El avance en el desarrollo de nuevos materiales en la escala nanométrica, con propiedades químicas y fisicoquímicas distintas a las de la fase masiva, ha impulsado los usos tecnológicos de estos nuevos productos posibilitaron. La nanotecnología se insertó en la sociedad como una herramienta para solucionar inconvenientes en rubros tan disímiles como medicina, cosmética, indumentaria, lubricación, catálisis, pinturas, construcción, agricultura, transporte, informática y electrónica, entre otros. Como consecuencia, la producción industrial de nanomateriales (NMs) ha crecido exponencialmente en los últimos años y, junto con ello, su descarte. Lamentablemente, se desconoce el impacto ambiental de este nuevo tipo de desechos. Por este motivo es necesario estudiar las modificaciones que tienen lugar en los NMs cuando se produce su liberación en el medio ambiente. Entre las posibles alteraciones podemos destacar: cambios en la capacidad de adsorción de materia orgánica, modificaciones en la carga superficial y producción de especies reactivas. Estos cambios en las propiedades físicas y químicas de los NMs son factores determinantes a la hora de analizar su toxicidad.

A lo largo de este trabajo de tesis, se trabajó con distintos NMs comerciales cuyas ventajosas propiedades permitió el desarrollo de nuevos e innovadores productos industriales. La producción industrial en gran escala de estos NMs en los últimos años y el limitado conocimiento de su impacto ambiental nos llevó a plantearnos como objetivo principal de este trabajo la evaluación del daño y las modificaciones que éstos podrían ocasionar en el medio una vez que alcanzan el entorno natural. Se trabajó con nanopartículas de óxidos de metales (NP-OMe), en particular, nanopartículas de óxido de cinc (NP-ZnO) y de óxido de aluminio (NP-Al₂O₃) y nanotubos de carbono multicapa comerciales (MWCNT).

En una primera instancia se evaluó la interacción de los NMs con medios acuosos salinos de composición similar a algunos efluentes naturales, con el objetivo de observar cambios en la capacidad de aglomeración, propiedades hidrodinámicas y carga superficial, entre otros, inducidos por la matriz inorgánica de las aguas naturales sobre los NMs desechados. También se evaluó la interacción con la materia orgánica disuelta (MOD), estudiando los procesos de adsorción de ácidos húmicos (AH) que se llevan a cabo en la superficie del nanomaterial. Por otra parte, la irradiación con distintas fuentes de luz monocromáticas, con lámparas solares y/o la radiación solar, nos permitió obtener un panorama completo de los cambios fisicoquímicos que sufren los NMs cuando se encuentran suspendidos en solución y reciben la radiación solar.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la toxicidad, tanto de los materiales prístinos como los modificados por las condiciones ambientales como las anteriormente nombradas, se realizaron estudios utilizando el microorganismo modelo *Pseudomonas aeruginosa*, tanto en estadio de libre

flotación como formando biopelículas. En el caso de los MWCNT, dada la complejidad de la muestra, se estudiaron todas las modificaciones llevadas a cabo por interacción con la MOD y fuentes lumínicas de distinto tipo, lo que permitió conocer en mayor detalle los procesos que dan lugar a los diversos cambios que se generan en el NM e impactan en un entorno medioambiental.

Todos los resultados indican que existe una modificación muy importante cuando se descartan NMs al medio ambiente. Estas modificaciones dependen de la presencia o ausencia de MOD, de la fuerza iónica y del tipo de irradiación a la que está sujeto el sistema. Además, los resultados en cultivos bacterianos son dependientes de las modificaciones descritas anteriormente, así como de la forma de vida del microorganismo. Se observaron modificaciones en la viabilidad, en el tamaño las bacterias y en su proceso de adhesión, incluyendo la producción de material polimérico extracelular, que dependieron del NM ensayado.

Los ensayos realizados indican que el impacto ambiental de un NM es un proceso complejo resultante de las distintas combinaciones de las variantes que pueden darse en el medioambiente y que impactan directa o indirectamente en el ecosistema.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción General	10
1.1. La nanotecnología como punto de partida	10
1.2. Nanotecnología y medio ambiente	11
1.3. Nanopartículas de óxidos de metales	14
1.3.1. Nanopartículas de óxido de aluminio (NP-Al ₂ O ₃)	14
1.3.2. Nanopartículas de óxido de cinc (NP-ZnO)	16
1.4. Nanotubos de carbono (NTC)	17
1.4.1. Nanotubos de carbono en el medio ambiente	20
1.5. Estudios de procesos ambientales	21
1.5.1. Empleo de soluciones modelo	21
1.5.2. Ajuste de la materia orgánica disuelta (MOD)	22
1.5.3. Interacción con fuentes de luz: el efecto de la radiación solar	22
1.5.4. Microbiota bacteriana	25
1.5.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : microorganismo modelo ambiental	27
1.6. Objetivos	29
1.7. Referencias	30
Capítulo 2: Materiales y métodos experimentales	36
2.1. Solventes, reactivos, soluciones y medios de cultivo	36
2.2. Material común de laboratorio	37
2.3. Técnicas y equipamiento fisicoquímico	38
2.3.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis	38
2.3.2. Espectroscopía vibracional: FT-IR y Raman	38
2.3.3. Difracción de rayos X	40
2.3.4. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	42
2.3.5. Dispersión dinámica de luz (DLS)	43
2.3.6. Fuentes de irradiación utilizada y tratamientos	44
2.3.6.1. Lámparas de emisión monocromática	44
2.3.6.3. Luz solar	45
2.3.6.4. Solar box	46
2.3.7. Microscopías	46
2.3.7.1. Microscopía de epifluorescencia	46
2.3.7.2. Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (TEM)	46
2.3.7.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	47
2.3.8. Detección de especies reactivas	47
2.3.8.1. Láser flash fotólisis	47
2.3.8.2. Detección de anión radical superóxido	50
2.3.8.3. Resonancia paramagnética electrónica	52
2.3.9. Medidas de susceptibilidad magnética	53
2.3.10. Cálculo del área superficial específica	54
2.3.11. Análisis elemental por acoplamiento de plasma inductivo: ICP-MS	54
2.3.12. Determinación de carbono orgánico total (TOC)	55
2.3.13. Demanda Química de Oxígeno (DQO)	56
2.3.14. Voltamperometría cíclica	56

2.3.15. Termogravimetría analítica (TGA)	57
2.4. Ensayos microbiológicos	58
2.4.1. Ensayos de inhibición del crecimiento en función de la concentración	58
2.4.2. Ensayos en estado planctónico	59
2.4.3. Ensayos con biofilms bacterianos	59
2.4.4. Respirimetría de fangos activos	60
2.5. Referencias	63
Capítulo 3. Nanopartículas de óxidos de metales: caracterización e interacción con medios acuosos con y sin actividad biológica	67
3.1. Introducción	67
3.2. Nanopartículas de Óxido de Zinc (NP-ZnO)	67
3.2.1. Caracterización	69
3.2.1.1. Espectroscopia UV-Vis	69
3.2.1.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	70
3.2.1.3. Difracción de rayos X	70
3.2.2. Interacción de NP-ZnO con medio acuoso salino y MOD	71
3.2.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)	71
3.2.2.2. Termogravimetría analítica (TGA)	72
3.2.2.3. Espectroscopia IR por atenuancia total reflectada (ATR)	75
3.2.2.4. Ensayos de adsorción de moléculas orgánicas y liberación de iones Zn	76
3.2.3. Ensayos microbiológicos	79
3.2.3.1. Ensayos realizados sobre <i>P. aeruginosa</i> en estado planctónico y utilizando fuentes de irradiación visible	80
3.2.3.2. Ensayos realizados sobre <i>P. aeruginosa</i> en estado planctónico irradiadas con luz ultravioleta	81
3.2.3.3. Ensayos realizados sobre <i>P. aeruginosa</i> formando biofilms	82
3.2.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	83
3.2.4. Conclusiones	85
3.3. Nanopartículas de óxido de aluminio (NP-Al₂O₃)	86
3.3.1 Caracterización	87
3.3.1.1 Espectroscopia UV-Vis	87
3.3.1.2. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)	87
3.3.1.3. Difracción de rayos X	88
3.3.2. Interacción de NP-Al ₂ O ₃ con medio acuoso salino y MOD	89
3.3.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)	89
3.3.2.2. Termogravimetría analítica	90
3.3.2.3. Espectroscopia IR por atenuancia total reflectada (ATR)	91
3.3.2.4. Ensayos de adsorción	91
3.3.3. Ensayos microbiológicos	94
3.3.3.1. Ensayos realizados sobre <i>P. aeruginosa</i> en estado planctónico y fuentes de irradiación visible	95
3.3.3.2. Ensayos realizados sobre <i>P. aeruginosa</i> en estado planctónico y bajo irradiación ultravioleta	96
3.3.3.3. Ensayos realizados sobre <i>P. aeruginosa</i> formando biofilms	97
3.3.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	98

3.3.4. Conclusiones	102
3.4. Conclusiones parciales (NP-ZnO Y NP-Al₂O₃)	103
3.5. Referencias	105
Capítulo 4: Nanotubos de carbono multicapa comerciales: caracterización e interacción con fuentes lumínicas	112
4.1. Introducción	112
4.2. Estrategias de estudio	113
4.3 Resultados	113
4.3.1. Análisis dispersivo de rayos X y por acoplamiento de plasma inductivo: ICP-MS	113
4.3.2. Susceptibilidad magnética	114
4.4. Interacción de nanotubos de carbono con fuentes de emisión monocromática	115
4.4.1. Ensayos con luz monocromática con máximo de emisión a 350 nm	115
4.4.1.1. Difracción de rayos X	116
4.4.1.2. Espectroscopía Raman	116
4.4.1.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	117
4.4.1.4. Termogravimetría analítica (TGA)	118
4.4.1.5. Curvas de adsorción de nitrógeno	120
4.4.1.6. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)	121
4.4.1.7. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)	122
4.4.1.8. Espectroscopía UV-Vis	125
4.4.1.9. Espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR)	126
4.4.1.10. Experimentos resueltos en el tiempo: laser flash fotólisis	127
4.4.1.11. Conclusiones	133
4.4.2. Ensayos con luz monocromática con máximo de emisión a 575 nm	134
4.4.2.1. Difracción de rayos X (DRX)	134
4.4.2.2. Espectroscopía Raman	135
4.4.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	136
4.4.2.4. Termogravimetría analítica (TGA)	137
4.4.2.5. Adsorción UV-Vis	139
4.4.2.6 Experimentos resueltos en el tiempo: laser flash fotólisis	140
4.4.2.7. Conclusiones	142
4.5. Referencias	144
Capítulo 5: interacción de nanotubos de carbono con medios acuosos con y sin actividad biológica	152
5.1. Introducción	152
5.2. Ensayos de adsorción	153
5.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)	154
5.4. Irradiación con luz solar natural	154
5.4.1. Demanda química de oxígeno (DQO)	155
5.4.2. Dispersión dinámica de luz (DLS) en MWCNT irradiados	156
5.4.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)	156
5.4.4. Voltametría Cíclica	159

5.4.5 Modificación de los residuos metálicos por efecto de la luz solar	160
5.5. Ensayos microbiológicos	165
5.5.1. Ensayos en <i>P. aeruginosa</i> en estado planctónico	165
5.5.1.1. Irradiación Visible	165
5.5.1.2. Irradiación UV	167
5.5.2. Ensayos con biofilms de <i>P. aeruginosa</i>	168
5.5.3. Respirometría de fangos activos	172
5.7. Conclusiones	173
5.8. Referencias	176
Capítulo 6: Conclusiones generales	179
6.1. Nanopartículas de óxidos de metales (NP-OMe)	179
6.1.1 Nanopartículas de óxido de cinc (NP-ZnO)	179
6.1.2. Nanopartículas de óxido de aluminio (NP-Al ₂ O ₃)	181
6.1.3. Nanotubos de carbono multicapa comerciales (MWCNT)	183
6.2. Conclusiones generales	185
6.3. Referencias	187
Anexo: prospectivas de reutilización	189
Introducción	189
Utilización de nanotubos múltiple capa comerciales para la inducción de fotopolimerización catiónica de resinas de epóxido	190
Utilización de nanotubos múltiple capa comerciales inmovilizados en fibras sintéticas para el empleo en tratamientos de contaminantes en agua	195
Referencias	208
Publicaciones aceptadas durante el período comprendido en la presente tesis	210
Publicaciones realizadas en colaboración aceptadas durante el período comprendido en la presente tesis	210
Artículos enviados durante el período comprendido en la presente tesis	210
Artículos enviados en colaboración durante el período comprendido en la presente tesis	211
Artículos en redacción	211
Presentaciones a congresos	211
Estadías en el exterior	213
Agradecimientos	214

Abreviaciones de uso común

- •OH: radical hidroxilo.
- $^1\text{O}_2$: oxígeno singlete.
- 350I-MWCNT: nanotubos de carbono multicapa irradiados con lámparas de emisión monocromática de longitud de onda 350 nm.
- 575I-MWCNT: nanotubos de carbono multicapa irradiados con lámparas de emisión monocromática de longitud de onda 575 nm.
- AH: Ácidos Húmicos.
- AH-MWCNT: nanotubos de carbono multicapa con ácidos húmicos adsorbidos en su superficie.
- CVD: deposición química de vapor.
- DLS: dispersión dinámica de luz.
- EM: electromagnetismo.
- EPR: resonancia paramagnética electrónica.
- EPS: exopolisacárido.
- FMWCNT-Irr: solución resultante de filtrar una suspensión 10ppm de MWCNT previamente irradiada con luz solar.
- FpMWCNT: solución resultante de filtrar una suspensión 10ppm de MWCNT.
- FT-IR: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier.
- HCl-MWCNT: nanotubos de carbono multicapa tratados con ácido clorhídrico.
- ICP-MS: análisis de plasma por acoplamiento inductivo, con detección por espectroscopía de masas.
- MOD: Materia orgánica disuelta.
- MWCNT: nanotubos de carbono de múltiples capas.
- MWCNT: nanotubos de carbono doble capa.
- NM: nanomaterial.
- NP- Al_2O_3 : nanopartículas de óxido de aluminio.
- NP-OMe: nanopartículas de óxidos de metales.
- NP-OMe: nanopartículas de óxidos de metales.
- NP-ZnO: nanopartículas de óxido de Zinc.
- NTC: nanotubos de carbono.
- $\text{O}_2^{\bullet-}$: radical anión superóxido.
- pMWCNT: nanotubos de carbono multicapa prístinos, sin ninguna modificación.
- RX: rayos X.
- SI-AH-MWCNT: nanotubos de carbono multicapa irradiados con luz solar natural en presencia de AH.
- SI-MWCNT: nanotubos de carbono multicapa irradiados con luz solar natural.
- SWCNT: nanotubos de carbono simple capa.
- TOC: carbono orgánico total.
- UAV: ultra alto vacío.
- XPS: espectroscopia fotoelectrónica de rayos X.

*“A las pequeñas simples cosas,
de la vida terrenal”*

Capítulo 1:

Introducción General

*“Doblo a la esquina, y siento esa brisa que me anima a ser
ese barco de papel que siempre quiso ser un Jet”*

Capítulo 1: Introducción General

1.1. La nanotecnología como punto de partida

En la actualidad, el término “nanotecnología” ha ganado renombre en distintos ámbitos que van desde la ciencia básica hasta la producción industrial. Podríamos definir la nanotecnología como el conjunto de estrategias tecnológicas dedicadas al diseño y manipulación de la materia a nivel de átomos y moléculas, con fines de diversa naturaleza, tales como industriales, médicos, agrícolas, etc. Más precisamente podemos decir que la nanotecnología se centra en estudiar sistemas que se encuentren, al menos en una de sus dimensiones, en la escala del nanómetro (hasta 100 nm, es decir, hasta una diez millonésima parte de un metro) y llamamos nanomateriales (NMs) a aquéllos que cumplen con estas condiciones. De esta forma, si las tres dimensiones de un material están en la nanoescala hablamos de nanopartículas; si dos de sus dimensiones lo están, tenemos lo que se conoce como nanocables, nanotubos o nanovarillas, y si solo una de las dimensiones pertenece a esa escala, tenemos nanofilms o películas delgadas.

Los adelantos en la nanotecnología son posibles debido principalmente a los avances en la comprensión de las interacciones que suceden a nivel atómico combinados con la reciente capacidad de observar y aplicar cambios en la materia nanoestructurada. Actualmente se pueden diseñar y producir NMs con propiedades y aplicaciones específicas dentro de las cuales podemos nombrar: el diseño de nanopartículas para la descontaminación de sistemas ambientales, NMs útiles en medicina, para aplicaciones tales como el transporte específico de drogas o terapias alternativas contra alguna enfermedad. Numerosas industrias hoy en día utilizan la nanotecnología como un trampolín para mejorar o generar nuevos productos por lo que representa un papel muy importante en la sociedad contemporánea.

Pero surge la siguiente pregunta: ¿qué es lo que hace que la nanotecnología haya cobrado tal importancia en los últimos años?. Debido a su pequeño tamaño, con una alta relación superficie/volumen, los materiales que se encuentran en la escala de los nanómetros exhiben comportamientos y propiedades muy distintos a sus análogos en fase masiva, lo que los hace óptimos para diversas aplicaciones en ámbitos tales como medicina, electrónica, energía, plásticos, pinturas, cosmética, etc.

La implementación de nuevas tecnologías que involucran NMs en la industria impulsó, debido a sus innumerables ventajas, un aumento considerable en la producción en gran escala de NMs. Esta creciente producción comercial genera un impacto al medio ambiente por ahora desconocido, ya que las mismas propiedades que hacen a estos nanomateriales “especiales” pueden provocar daños ambientales severos. Para estudiar el impacto que un NM genera en el medio ambiente es necesario evaluar las modificaciones que las condiciones ambientales generan en la forma, tamaño, hidratación, oxidación, carga, capacidad de adsorción, aglomeración, movilidad, capacidad de formar suspensiones estables y de interaccionar con los sistemas biológicos. El conjunto de todas las modificaciones físicas y químicas de los nanomateriales son determinantes de su grado de toxicidad.

1.2. Nanotecnología y medio ambiente

Como mencionamos anteriormente, la materia nanoparticulada presenta propiedades que la hacen muy especial en el desarrollo de nuevos productos con propiedades mejoradas. Una de las principales características de los NMs es que, al estar conformado por una cantidad de átomos o moléculas limitado, su relación superficie/volumen es extremadamente alta. Dependiendo de los usos buscados, esto puede resultar una ventaja para realizar posteriores modificaciones químicas como la funcionalización con moléculas específicas que cumplan un determinado propósito.

Cada vez se tiene más consciencia sobre la capacidad de la nanotecnología de potenciar las tecnologías más tradicionales; además es muy prometedora en cuanto a la reducción en el volumen de desechos, la disminución de la cantidad de residuos contaminantes y en la mejora en el uso y provisión de energía. Como contraparte, el crecimiento en la producción industrial a gran escala, junto con la comercialización y el uso de NMs, inevitablemente dará lugar a su descarga en la atmósfera, el suelo y los sistemas acuáticos con consecuencias impredecibles. Por ello, resulta crucial el desarrollo de estudios sobre el destino, el comportamiento y la toxicidad de los NMs en los sistemas naturales. De esta forma se podrá determinar su impacto en el medio ambiente y establecer gestiones y protocolos que minimicen el impacto de la descarga de NMs al entorno, asegurando la sustentabilidad de la industria nanotecnológica y sus beneficios asociados.

Al igual que la mayoría de los contaminantes, los NMs sintéticos generan impactos ambientales desde que se producen hasta su desecho, con la diferencia de que se desconocen los efectos que estos puedan causar una vez insertados en el medio ambiente. Se estima que la descarga de estos NMs tendrá lugar primero en los sistemas de desagües y

plantas de tratamiento de aguas contaminadas, rellenos de tierra y suelos, para finalmente alcanzar los sistemas acuáticos. En estos últimos, los impactos que generarán dependerán fuertemente de las interacciones con los componentes del medio (fuerza iónica, materia orgánica disuelta e interacción con el sistema biológico), transformaciones físicas y químicas que pueda sufrir el material (por ejemplo por la acción de radiación solar) y de las políticas de gestión ambiental establecidas para la reducción de riesgos¹.

Actualmente se acepta el término “nanotoxicología” para designar al estudio de la toxicidad de los de los NMs. Debido a los efectos cuánticos del pequeño tamaño y la gran superficie en relación al volumen, los nanomateriales tienen propiedades únicas en comparación con las propiedades de su análogo en fase masiva². Por ejemplo, materiales de elementos inertes como el oro pueden volverse muy activos cuando se encuentran en dimensiones nanométricas. Los estudios nanotoxicológicos se centran en evaluar el impacto de los NMs en el medio ambiente y en los seres humanos³.

Para poder evaluar el efecto que tiene un material en el medio ambiente, es necesario conocer, en una primera instancia, las características intrínsecas del material en cuestión para posteriormente investigar las modificaciones que podrían llevarse a cabo una vez insertado en el entorno ambiental. Si bien la falta de metodologías y técnicas que permitan detectar y cuantificar NMs en los sistemas naturales constituyen una restricción muy importante⁴, la mayor fuente de incertidumbre reside en el desconocimiento de factores tales como la magnitud de los efectos ambientales capaces de alterar a los NMs, la durabilidad de los mismos y las consecuencias en los procesos de transporte y toxicidad, en relación con la naturaleza prístina del material^{5,6}.

Hay que tener en cuenta que la matriz acuosa ambiental tiene una composición muy compleja y con alto grado de variabilidad dependiendo de la naturaleza de las moléculas que la componen, que pueden ser de naturaleza orgánica o mineral. La presencia de materia orgánica aporta complejidad al entorno, al estar compuesta por moléculas muy reactivas químicamente con capacidad de adsorberse y de transportar contaminantes. La materia orgánica natural está compuesta por una amplia variedad de polielectrolitos, estructuralmente complejos, derivados de la degradación química y biológica de plantas y animales. Dependiendo del tamaño de sus partículas, la materia orgánica puede clasificarse en soluble (MOD de “*materia orgánica disuelta*”) para partículas menores a 45 micrones y coloidal para valores superiores. Las sustancias húmicas, dentro de los cuales podemos encontrar ácidos húmicos (AH) y fúlvicos, son moléculas compuestas por mezclas complejas que contienen estructuras aromáticas y alifáticas, con grupos fenólicos y carboxílicos, generalmente presentando una carga formal negativa. Se estima que entre

el 40 y el 70% de la MOD está formada por este tipo de moléculas, mientras que el resto la componen proteínas, aminoácidos y carbohidratos⁷.

Dado que las sustancias húmicas contienen una gran variedad de grupos funcionales oxidables a distintos potenciales redox y capaces de participar en reacciones de transferencia de electrones, resultan ser moléculas muy activas en procesos de óxido-reducción. Además, estas moléculas actúan como surfactantes naturales, aumentando así la estabilidad en suspensión y la movilidad de los NMs⁸.

Además de la MOD, las aguas naturales tienen un alto contenido de sales que oscilan entre los pocos mg/L hasta los 100.000 mg/L donde los principales aniones que se encuentran son Cl^- , SO_4^- y CO_3^- , y Na^+ , Mg^+ y Ca^{2+} los cationes en mayor proporción. Tanto las variantes en la fuerza iónica como el pH de la solución (en el caso de las aguas naturales este oscila entre 5.5 y 8.5) inducen cambios muy marcados en la carga superficial y el potencial Z, afectando así la formación de agregados de NMs y su capacidad de adsorción de MOD⁹.

Dentro de los parámetros que debemos evaluar para determinar el impacto que un NM tiene en el medio ambiente podemos nombrar la distribución de tamaño, forma, composición química, funcionalización y carga superficial, capacidad de absorción y adsorción, solubilidad, estabilidad y química superficial¹⁰. Es de esperar que una vez descargados en el ambiente, los nanomateriales se vean modificados debido a las interacciones con los sistemas biológicos y los componentes de las aguas naturales. Tanto el tipo de interacciones como su magnitud, sumado a las propiedades intrínsecas del NM, determinarán el impacto ambiental generado por la descarga desmedida al medio ambiente. De la lista de los procesos que puedan llevarse a cabo en la modificación del NM por el entorno natural se destacan: la adsorción de MOD y otras moléculas más pequeñas, la oxidación química superficial, la disolución parcial, los procesos fotoquímicos inducidos por la absorción de la luz solar, la formación de agregados por efecto salino y la degradación biológica. La ocurrencia de estos procesos afectará la toxicidad y transporte de los NMs, y con ello su impacto ambiental^{11,12}.

Entre los NMs de uso comercial frecuente, los nanotubos de carbono (NTC) y las nanopartículas de óxidos de metales (NP-OMe) poseen un impacto sobre la salud humana y el ambiente sobre los que poco se conoce. Estos NMs resultan de particular importancia ya que se sabe que sus propiedades son afectadas por procesos de oxidación, presencia de sales y adsorción de compuestos orgánicos sobre su superficie. Si bien hay otro grupo muy importante de NMs de uso frecuente, el de nanopartículas metálicas, su estudio no fue incluido en esta tesis debido a la importante cantidad de información que existe sobre el tema en cuestión.

1.3. Nanopartículas de óxidos de metales

Las nanopartículas (NPs) son NMs que tienen sus tres dimensiones menores a 100 nm. Entre sus propiedades especiales destacan su alta relación entre el área superficial y el volumen que produce propiedades ópticas a veces inesperadas debido al confinamiento de los electrones¹³. Las NPs poseen interacciones muy particulares con la luz, siendo muy útiles para procesos que requieran captación de fotones, como por ejemplo la generación de celdas solares, entre otras aplicaciones¹⁴. Entre otros efectos causales del tamaño pueden nombrarse el confinamiento cuántico de NP de semiconductores, la resonancia del plasmón en partículas metálicas y el superparamagnetismo en materiales magnéticos¹³.

Entre otras implementaciones de las NPs pueden citarse, además de sus aplicaciones en medicina, remediación ambiental y agrícolas, las que utilizan industrialmente con distintos fines específicos tales como NPs inmersas en polímeros para generar materiales más resistentes, o NPs anexadas a fibras textiles para generar ropa funcional, como por ejemplo que sean “anti manchas” o tengan algún “nano” agente antimicrobiano inmerso que neutralice el olor del sudor en ropas deportivas¹⁵.

En particular, las nanopartículas de óxidos de metales son bien conocidas por ser muy versátiles, tener propiedades muy interesantes, una síntesis relativamente sencilla y poseer una marcada actividad antimicrobiana. Sin embargo, a pesar de que hoy en día tienen un amplio uso en la generación de nuevos materiales, los estudios de evaluación ambiental y toxicidad aún se encuentran en estadíos muy tempranos. A pesar de que hay una creciente cantidad de NPs de óxidos de metales utilizados en la industria no se conoce con certeza su impacto ambiental. Entre ellas cabe mencionar las de óxido de cinc (NP-ZnO), de óxido de aluminio (NP-Al₂O₃) y de dióxido de titanio (TiO₂), por su gran producción, uso y desecho. Sin embargo, éstas últimas han sido muy estudiadas en los últimos años por lo que en la presente tesis nos centraremos en las NP-Al₂O₃ y NP-ZnO .

1.3.1. Nanopartículas de óxido de aluminio (NP-Al₂O₃)

Las NP-Al₂O₃ son vastamente utilizadas en la industria con fines muy diversos¹⁶ (figura 1.1). Las propiedades químicas que ofrecen estos materiales permiten que sean utilizados en la industria de la cerámica¹⁷ debido a la capacidad de generar estructuras más robustas, resistentes al fuego y con propiedades anti-fricción. Su naturaleza inerte y sus propiedades dieléctricas y anti abrasivas las hace potencialmente útiles como materiales para recubrimientos de superficies. Entre otros usos, cabe citar su empleo como adsorbentes, desecantes y dispersantes de alimentos. Debido a sus propiedades antitranspirantes se las usa para suplementar desodorantes y otros productos de higiene personal. Por su

gran dureza y resistencia, es utilizado en odontología para la elaboración de piezas dentales y otros materiales de restauración.

Todas estas propiedades hacen que las NP- Al_2O_3 sean extremadamente útiles en la generación de productos comerciales de uso cotidiano, por lo que, actualmente, la industria del aluminio se encuentra muy desarrollada a nivel mundial para aplicaciones nanotecnológicas. Según los últimos registros del grupo de análisis de las perspectivas del desarrollo (Banco mundial), se produjeron en 2008 en todo el mundo, 39.425 toneladas mientras que el consumo llegó a 37.796 toneladas, y se espera superar los 100.000 toneladas en el 2020, ubicando a esta industria entre la más desarrollada a nivel global.

Figura 1.1. Demanda de NMs basados en Aluminio, por rubro¹⁶.

Si bien hay muchos métodos empleados para la síntesis de NP- Al_2O_3 , el más empleado es el que utiliza la hidrólisis de óxidos y alcóxidos de aluminio seguidos de una calcinación en presencia de agentes estabilizantes a altas temperaturas¹⁸. Esta síntesis ofrece la ventaja de regular el tamaño de las NPs además de realizar múltiples variables dependiendo el producto que se desee sintetizar (temperatura de calcinación, precursores, agentes estabilizantes, etc.).

Frente a estos datos es relevante tener en cuenta el impacto que generan las NP- Al_2O_3 cuando se descargan al medio ambiente, su interacción con la matriz medioambiental y con la flora microbiana. Los estudios publicados revelan resultados en cierto sentido contradictorios o

incompletos. Investigaciones anteriores demuestran que si bien la presencia de NP-Al₂O₃ disminuye los contenidos de nitrógeno y fósforo de los efluentes naturales¹⁹, este efecto no parecería tener consecuencias negativas en la viabilidad bacteriana a corto o largo plazo, al menos en fangos activos. Estudios realizados en *E. coli*, detallan que la toxicidad sobre las bacterias solo ocurre a concentraciones muy elevadas, mayores a 1000 µg/mL, y que dada su naturaleza inerte, incluso podrían funcionar como protectores de las células al desactivar las especies reactivas generadas por fuentes externas²⁰. Sin embargo, hay evidencias de que cuando estos NMs están inmersos en una matriz medioambiental, las NP-Al₂O₃ exhiben propiedades antimicrobianas en aislados de bacterias²¹.

Si bien existe mucha información acerca de evaluaciones de la toxicidad en sistemas bacterianos, todos se refieren a sistemas aislados y a bacterias en estado planctónico o de libre flotación, lo cual brinda una información incompleta de lo que ocurre globalmente en el medio ambiente.

1.3.2 Nanopartículas de óxido de cinc (NP-ZnO)

El óxido de cinc, de fórmula química ZnO, es uno de los materiales semiconductores más importantes y con mayores aplicaciones en la industria, debido a que posee un ancho de banda de 3.37 eV a temperatura ambiente²². Actualmente es muy utilizado en la industria del caucho, cerámica, lentes ópticos, pinturas, cosméticos, cremas para bebé y pantallas solares, entre otras aplicaciones. Junto al TiO₂, estos materiales ofrecen una química prometedora como fotocatalizadores, con potenciales aplicaciones en la remoción de contaminantes, con resistencia a la fotocorrosión, de baja toxicidad y de muy bajo costo.

El ZnO nanoparticulado (NP-ZnO) ofrece propiedades que en algunos casos son similares a su análogo en fase masiva y se cree que tanto el tamaño, área superficial, fase cristalina y la capacidad de absorber luz juegan un rol muy importante en su actividad fotocatalítica.

Con respecto a la síntesis de NP-ZnO, hay numerosos métodos como el hidrotermal, solvotermal, sol-gel, reacción en estado sólido y descomposición termal, aunque son las primeras dos las más utilizadas²³. Generalmente la síntesis de NP-ZnO se lleva a cabo a temperaturas de 90°C, en una solución acuosa equimolar de nitrato de zinc Zn(NO₃)₂ y hexamina, el último reactivo proporciona el entorno básico, aunque también se han presentado variantes relativamente rápidas y sencillas, ambientalmente amigables, que son adaptaciones de la síntesis hidrotermal^{24,25}.

Como mencionamos anteriormente, las NP-ZnO tienen propiedades que las hacen muy útiles a la hora de generar materiales con efectos fotocatalíticos. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) bajo irradiación, genera estrés oxidativo en células, inhibiendo el crecimiento bacteriano^{26,27}. Esto podría generar un problema cuando se descartan estas partículas al medioambiente, ya que la presencia de luz ambiental

podría lograr excitar las NPs, generando especies reactivas y afectando por un lado la microbiota bacteriana y por otro, generando reacciones indeseables con moléculas del medio circundante.

Para evaluar el efecto que tienen las NP-ZnO comerciales, es necesario observar primeramente la agregación en función del pH, fuerza iónica y presencia de MOD, para luego realizar estudios detallados con la microbiota ambiental, tanto en su forma planctónica como formando biofilms, en presencia como en ausencia de luz. Estudios preliminares sugieren que la estabilidad de las NP-ZnO en solución se ve fuertemente afectada por el incremento de la concentración salina y el pH. También se reportó que los ácidos húmicos forman complejos cuando interactúan con las NP-ZnO manteniéndolas en solución por tiempos más prolongados²⁸.

1.4. Nanotubos de carbono (NTC)

Los NTC son estructuras tubulares compuestas por átomos de carbono formando una red muy similar al grafeno, con un diámetro dentro del orden del nanómetro y unos varios micrómetros de longitud. Estos NMs se caracterizan por poseer extraordinarias propiedades: tiene una resistencia mecánica mayor que la del acero, con una conductividad térmica y dureza mayor que la del diamante y con una conductividad eléctrica mucho más elevada que la del cobre.

Los NTC pueden ser “semiconductores” o “metálicos” dependiendo de cómo es la orientación de la red del grafeno con respecto al eje tubular. Dependiendo de la cantidad de capas que conforman el NTC, podemos encontrar nanotubos de carbono monocapa (SWCNT, por sus siglas en inglés “*single-wall carbon nanotube*”), nanotubos de carbono doble capa (DWCNT, *double-wall carbon nanotube*) y nanotubos de carbono de múltiples capas (MWCNT, *multi-wall carbon nanotubes*)²⁹. Considerando solo el área transversal de los NTC, se han medido módulos elásticos cercanos a 1 TPa y una resistencia a la tensión de 100 GPa en MWCNT individuales³⁰. Estas fuerzas son al menos diez veces más fuertes que cualquier fibra industrial. Generalmente, los MWCNT tienen comportamiento metálico y son capaces de transportar corrientes de hasta 10^9 A/cm² ²⁹. La producción de los SWCNT y DWCNT resulta un poco más compleja para realizarla a gran escala por lo que actualmente la gran mayoría de los procesos industriales que requieran NTC emplean los MWCNT.

El método que más se utiliza para producir MWCNT a gran escala es la deposición química de vapor (CVD, por sus siglas en inglés: *Chemical Vapor Deposition*). Este proceso se basa en la descomposición termal de vapores que contienen carbono, en presencia de un catalizador metálico³¹. Si bien hay otros métodos también utilizados para la síntesis de NTC como la ablación láser o mediante descargas voltaicas, el CVD ofrece la ventaja de poder escalar la producción con costos económicos, rendimientos elevados y baja producción de desechos³². Además, ofrece la posibilidad de

trabajar con temperaturas más bajas y presiones normales, pudiendo utilizar fuentes de carbono tanto en estado sólido, líquido o gaseoso. Sin embargo, la producción en masa genera contaminantes que podrían intervenir con las propiedades intrínsecas de los MWCNT, introduciendo, por ejemplo, defectos estructurales o acortando su longitud.

La figura 1.2 muestra un esquema simplificado de un equipo de síntesis de MWCNT por CVD. El proceso comienza cuando un vapor hidrocarbonado pasa por un reactor tubular en donde se encuentra el catalizador metálico. La temperatura debe ser lo suficientemente alta como para descomponer la fuente de carbono, generalmente entre 600 y 1200 °C. Los nanotubos crecen por encima del catalizador metálico y luego son colectados cuando el sistema se enfría a temperatura ambiente. A pesar de que no hay un mecanismo aceptado que describa el crecimiento de los MWCNT, el que lo detalla más completamente plantea que cuando la muestra de vapor hidrocarbonado toma contacto con las nanopartículas metálicas del catalizador, primero se descompone en carbono e hidrógeno. El hidrógeno se volatiliza y el carbono queda disuelto en el metal. Una vez alcanzado el límite de solubilidad del carbono en el metal a esa temperatura, dicho carbono comienza a cristalizar en forma de una red cilíndrica energéticamente estable. Se cree que esta descomposición térmica de la fuente de carbono libera energía en forma de calor al metal expuesto, que luego es reutilizada para generar la cristalización del carbono en el nanotubo. Este gradiente térmico es el que logra que el proceso se mantenga por un tiempo lo suficientemente largo para generar los MWCNT.

Figura 1.2. Esquema de la síntesis de MWCNT.

Normalmente se utiliza metano, etileno, acetileno, benceno, xileno y monóxido de carbono como precursores en la síntesis de nanotubos de carbono, en donde se utilizan nanopartículas de óxido de hierro como catalizador³³. Sin embargo también se han utilizado nanopartículas de molibdeno y cobalto con los mismos resultados, así como también superficies cubiertas con silicio o aluminio^{34,35}.

Tal como se describió previamente, para sintetizar los MWCNT se requieren catalizadores nanoparticulados que permitan la descomposición térmica de la fuente de carbono a temperaturas menores que la descomposición espontánea³⁶. Generalmente se utilizan metales como Fe, Co y Ni por dos razones: 1) Alta solubilidad del carbono y 2) alto coeficiente de difusión del carbono en estos metales. Además, estos metales ofrecen una mejor adherencia de los nanotubos y son más eficientes para generar nanotubos de bajo diámetro y alta curvatura como por ejemplo SWCNT. Sin embargo, si bien los metales anteriormente nombrados son los más utilizados, se ha reportado que metales como el Cu, Au, Ag, Pt, Pd también son capaces de generar el crecimiento de nanotubos de carbono³⁷.

La misma reacción de síntesis funciona en diferentes materiales “soporte”. Usualmente en CVD se utilizan superficies de grafito, cuarzo, silicio, carburo de silicio, sílica, alúmina y aluminosilicatos, así como también carbonato de calcio y óxido de magnesio. Por ejemplo, materiales que contienen alúmina tienen una alta eficiencia en la catálisis debido a la fuerte interacción entre el metal y el soporte, lo que permiten una alta densidad de sitios catalíticos³⁵.

Es evidente que la síntesis de nanotubos de carbono se debe principalmente a factores como las altas temperaturas y la presencia de metales catalíticos, tanto en forma de NPs como en superficies soportes. Por ese motivo, la presencia de NPs de diversos metales dentro de la muestra de nanotubos es frecuente y resulta difícil lograr obtener estos materiales con un grado de pureza elevado ya que, si tenemos en cuenta los mecanismos de síntesis, es normal que las NPs formen parte de la estructura del nanotubo y se alojen dentro del mismo. También se pueden encontrar materiales nanoparticulados adsorbidos en la superficie del nanotubo, provenientes de los soportes anteriormente nombrados utilizados para aumentar la eficiencia de catálisis. Hay muchos métodos que se emplean actualmente para intentar remover, luego de la síntesis, los restos de catalizadores nanoparticulados remanentes de los MWCNT. El método más convencional es tratarlo con HNO_3 a reflujo³⁸ en un tratamiento que resulta muy oxidativo. Con el objetivo de obtener el menor daño de los nanotubos, se han propuesto otros métodos de purificación de SWCNTs como la combinación de oxidaciones empleando aire a alta temperatura con tratamientos con microondas en medio ácido³⁹. Para los MWCNT, los tratamientos a altas temperaturas en atmósfera inerte han demostrado ser muy eficientes para remover los defectos estructurales que

se generan en la síntesis (anillos de mayor o menor número de carbonos) además de remover las impurezas metálicas.

Todas las propiedades especiales descritas, colocan a los NTC dentro de los NMs con más interés tanto en el ámbito de la investigación como en la industria y, actualmente, la producción de NTC está creciendo a pasos agigantados. Hoy en día, son muchos los productos comerciales con NTC entre sus componentes, como por ejemplo en sistemas de filtración de agua, partes de aviones y de automóviles (en mangueras antiestáticas de combustible). Debido a su baja densidad y su alta dureza, la industria del deporte incorpora NTC en los marcos de bicicletas de carrera, raquetas de tenis, palos de golf y flechas de última generación.

1.4.1 Nanotubos de carbono en el medio ambiente

Los NTC son lipofílicos, no biodegradables, insolubles en agua, por lo que se esperaría que se depositen o precipiten rápidamente. Sin embargo, estos materiales podrían formar suspensiones estables si se adsorben sobre su superficie proteínas, polisacáridos y detergentes y/o se oxidan. Este comportamiento genera una alerta acerca del posible impacto ambiental de los mismos debido a la producción masiva y descarte de estos materiales. Además, la presencia de los restos de catalizadores metálicos podría agregar mayor complejidad al sistema aumentando su toxicidad.

Los NTC resultan ser un factor de riesgo ambiental tanto por su propia naturaleza como por las sustancias tóxicas que pueden adsorber. Los NTC son capaces de adsorber toda clase de moléculas orgánicas con alta eficiencia y, en un entorno ambiental, pueden adsorber las sustancias húmicas formando suspensiones más estables y manteniendo al NM suspendido por más tiempo en los efluentes naturales⁴⁰. La evaluación del impacto ambiental es compleja ya que estudios anteriores plantean que la interacción de los SWCNT con la MOD reduce en un 50% la adhesión de las bacterias a los agregados de NTC, pero no mitiga la toxicidad de aquellos NMs que se han adherido a las bacterias⁴⁰. Por otro lado, se observa una reducción en la toxicidad de los NTC en soluciones de alta fuerza iónica, atribuible a un aumento de la agregación del NM en ambientes salinos⁵. Ensayos biológicos del ciclo de vida de copépodos *Amphiascustenuiremis* mostraron que la mortalidad, reproducción y desarrollo de estos crustáceos marinos no resultó afectada por MWCNT purificados mediante técnicas electroforéticas, pero sí resultaron muy afectados por los MWCNT sin purificación previa⁴¹. Por otro lado, la capacidad de los NTC de adsorber contaminantes orgánicos hidrofóbicos (por ejemplo hidrocarburos poliaromáticos) se ve significativamente reducida por la oxidación de su superficie⁴².

1.5. Estudios de procesos ambientales

Todas las propiedades y características de los NMs anteriormente descritos hacen que, como mencionamos anteriormente, sean materiales muy prometedores que cumplen nuevas funciones y resuelven problemas de los que no se hallaba solución. Si bien el avance de la nanotecnología ha impulsado el desarrollo de ciencias como la medicina, informática, arquitectura, etc., también el impulso del marketing ha hecho que se utilice la nanotecnología como estrategia para aumentar el número de ventas de un producto. Un ejemplo claro es el de la empresa Nanosupermarket, que vende numerosos productos innovadores desde el punto de vista que utilizan la nanotecnología como slogan para aumentar sus ventas: desde pintalabios con nanopartículas de oro hasta dispositivos con nanopartículas que inhiben las enzimas que causan putrefacción en los vegetales (figura 1.3).

Figura 1.3. Dispositivo que emplea la nanotecnología como inhibidor de la putrefacción en vegetales⁴³.

Considerando que los estudios de nanotoxicidad aún son incipientes, el agregado de las nanopartículas a alimentos, cosméticos, etc. es preocupante, ya que no existe un contralor efectivo de su impacto en el ser humano y en el ambiente.

1.5.1. Empleo de soluciones modelo

Es evidente que incluir NMs en productos conlleva consigo un potencial riesgo, ya que no podemos asegurar que existan efectos adversos cuando los NMs sean liberados al medioambiente. Debido a su alta interacción con el medio, es necesario obtener información detallada de los efluentes naturales para evaluar los posibles procesos que sufrirán los NMs una vez descartados. El empleo de “soluciones modelos” resulta una buena opción como estrategia para realizar este tipo de estudios. En el presente trabajo se han utilizado “soluciones modelo” que contienen sales de HCO_3^- , Cl^- ,

NO_3^- y SO_4^{2-} en las proporciones contenidas en los reservorios acuosos naturales y/o en líquidos cloacales en las que también se respeta el contenido de Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ . En esta tesis, se utilizó como referencia la composición del agua del conocido acuífero Puelche, ubicado en la de la Pcia. de Bs. As., Argentina⁴⁴ (figura 1.4). Este acuífero es una de las reservas más grandes de agua potable del mundo, que alberga más de 300 billones de litros de agua.

Figura 1.4. Ubicación geográfica del Acuífero Puelche.

1.5.2. Ajuste de la materia orgánica disuelta (MOD)

Con respecto a la MOD, es conveniente utilizar sustancias húmicas de composición conocida para minimizar las variables de estudio y obtener información reproducible y escalable de lo que sucede en el medio ambiente. Con este objetivo se utilizaron sales sódicas de ácidos húmicos (AH) comerciales (Sigma Aldrich) para realizar los experimentos.

La concentración de la MOD es un factor importante a tener en cuenta, lo mismo que el carbono orgánico total (TOC), de modo que en los ensayos se mantendrá la relación $\text{TOC}/(\text{masa de AH})$ en valores cercanos a 0.45 TOC/g , característico de la MOD⁴⁵.

1.5.3. Interacción con fuentes de luz: el efecto de la radiación solar

Además de la compleja composición de la matriz medioambiental, la presencia de la radiación solar le agrega al problema en estudio una dificultad adicional, ya que sabemos que la materia a escala nanométrica interacciona con la luz de una manera particular. La radiación solar ofrece un espectro electromagnético con un registro muy amplio que oscila desde

los 150 nm hasta los 4 μ m y, aunque una gran porción de la luz es filtrada por la atmósfera, una gran proporción de luz infrarroja, visible y ultravioleta llega a la superficie terrestre.

La radiación en el sol sobre la superficie terrestre es de 63.450.720 W/m². La energía que llega al exterior de la atmósfera terrestre sobre una superficie perpendicular a los rayos solares es una cantidad fija, llamada constante solar (1353 W/m² según la NASA⁴⁶) variable durante el año un $\pm$ 3 % a causa de la elipticidad de la órbita terrestre. Esta energía es una mezcla de radiaciones de longitudes de onda entre 200 nm y 4000 nm, en ella se distinguen la radiación ultravioleta, luz visible e infrarroja.

La radiación de menor longitud de onda es la ultravioleta, caracterizada por ser muy peligrosa para los sistemas vivos porque es capaz de interactuar con las moléculas de ADN. El espectro de radiación ultravioleta puede dividirse en tres:

- Región ultravioleta C (UVC): entre 100 y 280 nm.
- Región ultravioleta B (UVB): entre 280 y 315 nm. Prácticamente es absorbida en su totalidad por la atmósfera y junto con la radiación UVC son las responsables de las reacciones fotoquímicas que conllevan a la producción de la capa de ozono.
- Región ultravioleta A(UVA): entre los 315 a 400nm, tradicionalmente considerada menos tóxica que las radiaciones UVC y UVB.

Entre los 400 y 700 nm se encuentra la radiación visible, que es la que tiene mayor intensidad en el espectro solar.

La radiación de más de 760 nm, la infrarroja, aumenta la energía cinética de las moléculas y provoca aumento de la temperatura. El dióxido de carbono, el vapor de agua y las pequeñas gotas que forman las nubes absorben con mucha intensidad este tipo de radiación.

En la figura 1.5 puede observarse una representación del espectro de la luz solar antes y después de llegar a la superficie terrestre.

Figura 1.5. Espectro electromagnético de la luz solar (curva roja: espectro fuera de la atmósfera y espectro azul: espectro que llega a la superficie terrestre).

Un NM insertado en el medioambiente estará sujeto a interacciones con la porción de luz solar que logre atravesar la atmósfera y, dependiendo de la longitud de onda, será el efecto que genere en el NM.

La luz solar podría tener diversos efectos dependiendo del NM con que interactúe. Por ejemplo, podría desencadenar reacciones químicas que afecten las propiedades del NM, la oxidación superficial, la liberación de iones metálicos o la generación de especies reactivas. Estas modificaciones son particularmente importantes porque todas conllevan un potencial aumento de la toxicidad una vez inmersos en sistemas naturales. Por ejemplo, la oxidación superficial podría generar variaciones en el potencial de superficie del NM cambiando los estados de aglomeración y las interacciones con el medio circundante. La liberación de iones metálicos podría generar respuestas negativas en los sistemas biológicos del medio, debido a la capacidad de intervenir con la actividad de enzimas involucradas en el ciclo vital. Por último, pero no menos importante, los fenómenos del confinamiento cuántico hacen que la materia se comporte de manera particular en la nanoescala y, frente a una fuente de energía (térmica, lumínica, química) los electrones de un nivel energético inferior pueden ser promovidos a uno de mayor energía. Las vías de desactivación son dependientes de la diferencia de energía de ambos estados y podrían conllevar a producción de especies reactivas al reaccionar con moléculas que se encuentran cercanas al NM. Si bien hay muchas moléculas que son capaces de reaccionar, en un ambiente aeróbico, el oxígeno molecular (O_2) es un aceptor de electrones muy común, dando lugar a la producción de especies reactivas (ER) de oxígeno, dentro de las cuales podemos nombrar el oxígeno singulete (1O_2), el radical hidroxilo ($\bullet OH$) y el radical

anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y su forma ácida, el radical hidroperóxido ($HO_2^{\bullet}$). Estas especies se caracterizan por ser extremadamente reactivas y tener un tiempo de vida muy corto, además de que pueden reaccionar con un gran número de moléculas. La producción de estas especies son una consecuencia directa de la interacción de los NM con la luz solar y podrían tener un impacto negativo ya que podrían reaccionar con moléculas del medio circundante generando moléculas más tóxicas o con sistemas vivos desestabilizando la membrana plasmática, pared celular y/o desnaturalizando proteínas vitales.

Si bien el oxígeno molecular tiene un efecto muy marcado, los NM pueden reaccionar además con otras moléculas como CO_2 , SO_4^{2-} y sustancias húmicas, generando otro tipo de ERs.

Todos los puntos anteriormente nombrados hacen que, para estudiar el impacto que tiene un NM en el medio ambiente, la evaluación de las interacciones con la radiación solar sea de suma importancia.

1.5.4. Microbiota bacteriana

La microbiota bacteriana juega un papel fundamental en los entornos ambientales ya que las bacterias se encargan de contribuir al metabolismo de todo tipo de compuestos, con consecuencias importantes en el funcionamiento y en el mantenimiento de los ecosistemas.

Los microorganismos suelen estar presentes de dos formas: en su estado planctónico (o de libre flotación) o formando estructuras más organizadas de numerosas bacterias, denominadas biofilms o biopelículas. Se estima que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, y tan sólo 1% vive en estado planctónico⁴⁷.

La figura 1.6 muestra en detalle las etapas de formación de biofilm: adhesión reversible, adhesión irreversible, y desprendimiento que se detallan a continuación (figura 1.6).

Adhesión reversible:

En una primer etapa ((1) figura 1.6) ocurren procesos de transporte y adhesión reversible, donde las bacterias en estado planctónico se acercan a la superficie por movilidad propia o por fuerzas de tipo Van der Waals y luego se adhieren reversiblemente. Esta adhesión está condicionada por diversos factores entre los que se encuentran:

- Factores físicos: como la tensión de corte, temperatura, rugosidad, topografía y carga superficial. Estos factores influyen en el transporte, los fenómenos interfaciales y el desprendimiento de la bacteria.
- Factores químicos: la composición de la superficie del sustrato, el medio en el que se desarrolla el biofilm, el pH, el oxígeno disuelto, y etc. La presencia de MOD genera una cobertura llamada “película acondicionante”, que cambia las propiedades químicas y físicas de la

interfase favoreciendo la adhesión bacteriana en la que participan mediante proteínas (adhesinas) bacterianas superficiales⁴⁸.

La adhesión reversible puede darse por dos tipos de mecanismos:

- Mecanismos activos: dependiente de órganos especializados como flagelos y fimbrias que permiten alcanzar la superficie a colonizar y desplazarse sobre ella en forma individual o colectiva.
- Mecanismos pasivos: adhesión mediada por fuerzas gravitatorias o mecanismos de difusión o precipitación.

Adhesión irreversible:

Posteriormente se genera un enlace permanente entre las bacterias y la superficie mediada por cambios fisiológicos importantes en las células⁴⁹. A esta 2da etapa se la conoce como adhesión irreversible ((2) en la figura 1.6) y se caracteriza por la especificidad de unión entre las adhesinas bacterianas y un receptor del sustrato. En este caso los factores ambientales (pH, electrolitos y temperatura) afectan en menor medida dichos procesos.

Maduración:

El crecimiento del biofilm involucra la replicación y muerte de bacterias, la secreción de moléculas específicas y material polimérico extracelular (EPS) y el aumento gradual de la interacción química con el medio. Estos procesos llevan a un aumento de la densidad del biofilm y en conjunto se conocen como etapa de maduración ((3) en la figura 1.6).

Desprendimiento:

Por último, tiene lugar el proceso de desprendimiento ((4) en la figura 1.6). En esta etapa las células bacterianas son liberadas en forma individual o en agregados, cumpliendo así un ciclo ya que estas células intentaran colonizar una nueva superficie.

La formación del biofilm confiere ventajas adaptativas con relación al estado planctónico. Los biofilms poseen estructuras más robustas y resistentes a moléculas que podrían resultar tóxicas cuando las bacterias están en libre flotación. Es evidente que, dadas las diferentes características del modo de vida planctónico y en biofilms, para estudiar el impacto ambiental de un NM es necesario saber cómo afecta a la microbiota ambiental y realizar estudios tanto con bacterias en su estado planctónico como formando biofilms.

Figura 1.6. Esquema del ciclo vital de bacterias formadoras de biofilm

1.5.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*: microorganismo modelo ambiental

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) es un bacilo ambiental Gram negativo, aeróbico, con movilidad unipolar y patógeno para los humanos y algunos tipos de plantas. Dependiendo de la cepa y/o de las condiciones nutricionales, pueden desarrollarse distintos fenotipos del biofilm⁵⁰. Como mencionamos anteriormente, el proceso comienza con una adhesión reversible de bacterias en estado planctónico en una superficie. En este proceso son los orgánulos motrices (pili tipo IV y flagelos) los encargados de mediar el primer contacto con la superficie para comenzar la etapa de adhesión irreversible. Una vez formadas las microcolonias en la matriz de EPS, el biofilm temprano comienza a confluir hacia un fenotipo tridimensional más estructurado. Por último, ocurre el desprendimiento de bacterias que reingresan al fenotipo planctónico para colonizar otras superficies^{51,52}. *P. aeruginosa* produce al menos tres tipos de polisacáridos (alginato, Pel y Psl) que son determinantes para la estabilidad de la estructura del biofilm^{53,54}. El alginato contribuye a la estabilidad estructural y la protección del biofilm así como también a la retención de agua y nutrientes⁵⁵, mientras que los polisacáridos Pel y Psl sirven como un andamio para el desarrollo del biofilm y están involucrados en las primeras etapas de la formación del biofilm^{56,57,58}.

Además del rol en la motilidad, los apéndices extracelulares presentes en *P. aeruginosa* (pili tipo IV, flagelos y fimbrias, (figuras 1.7 y 1.8) son considerados componentes de gran implicancia en las interacciones célula-célula y célula-superficie, así como también en la formación de microcolonias de un biofilm temprano. De hecho, ensayos con mutantes

defectuosos en flagelos y pili tipo IV, demostrarían que no son capaces de desarrollar microcolonias en comparación con la cepa salvaje^{59,60}. Una vez establecido el contacto mediado en una primera instancia por el flagelo y los pili tipo IV, se desencadena la producción de proteínas específicas y segundos mensajeros implicados en el desarrollo del biofilm⁶¹. Si el ambiente lo permite, estas señales en cascada son capaces de introducir cambios en el fenotipo de la bacteria entre los que se destacan la retracción de los órganos motrices y la estimulación de la producción de proteínas Pel, Pls y alginato presentes en el EPS, formando las primeras microcolonias de un biofilm temprano⁶².

Figura 1.7. Ilustración de *P. aeruginosa* con los respectivos nombres de los orgánulos.

Además de generar biofilms, este microorganismo tiene la capacidad de adaptarse fácilmente a distintas condiciones ambientales por lo que los ensayos empleando *P. aeruginosa* se encuentran entre los más utilizados en estudios de toxicidad relacionados con el medio ambiente.

La microbiota ambiental es muy compleja, ya que los procariontes, protozoos, hongos, algas, etc, que habitan en ella muchas veces interactúan con bacterias de distintas especies constituyendo biofilms mixtos⁶³ de alta complejidad, de difícil reproducción en el laboratorio. Sin embargo, la utilización de fangos activos sobre los que se evalúa el cambio de la tasa de respiración inducida por la liberación de un contaminante⁶⁴ resulta una aproximación muy útil ya que en estos lodos, los microorganismos son propios del medio ambiente, no sufren una modificación previa y se encuentran formando las asociaciones anteriormente nombradas.

Figura 1.8. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de un biofilm de *P. aeruginosa* crecido sobre sustrato de vidrio. Se señalan con flechas blancas los pili tipo IV y con flecha amarilla la presencia de EPS.

1.6. Objetivos

En este trabajo de tesis se plantea estudiar el efectosobre algunos NMs comerciales de los procesos abióticos: interacción con MOD y efecto de la radiación solar y su impacto sobre los sistemas microbiológicos. Se plantea como hipótesis de trabajo: “La adsorción de materia orgánica disuelta y la irradiación solar son capaces de alterar sustancialmente las propiedades de nanopartículas sintéticas de diversa naturaleza y éstas a su vez pueden impactar sobre el sistema microbiológico y del medio acuoso circundante”.

Para probar la hipótesis planteada deben desarrollarse los siguientes objetivos específicos:

- (1) Caracterizar NMs representativos de producción industrial y de diferente composición como: MWCNT, NP-ZnO y NP-Al₂O₃.
- (2) Investigar la modificación de las propiedades físicas y químicas de los NMs inmersos en soluciones acuosas modelo en presencia de (a) MOD y (b) irradiación con luz solar en presencia y ausencia de MOD.
- (3) Investigar la interacción de los NMs prístinos y aquéllos expuestos a las condiciones desarrolladas en (2) con microorganismos.
- (4) Correlacionar los efectos observados en los puntos anteriores (2)-(3) con las propiedades de los NMs prístinos. Plantear posibles soluciones tendientes a minimizar los posibles efectos adversos resultantes del desecho de estos NMs en las aguas naturales.

1.7. Referencias

1. Eckelman, M. J., Mauter, M. S., Isaacs, J. A. & Elimelech, M. New perspectives on nanomaterial aquatic ecotoxicity: Production impacts exceed direct exposure impacts for carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 2902–2910 (2012).
2. Hobson, D. W. & Guy, R. C. Nanotoxicology. *Encycl. Toxicol. Third Ed.* 434–436 (2014) doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.01045-9.
3. Buzea, C., Pacheco, I. I. & Robbie, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* **2**, MR17-71 (2007).
4. von der Kammer, F. *et al.* Analysis of engineered nanomaterials in complex matrices (environment and biota): General considerations and conceptual case studies. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 32–49 (2012).
5. Nowack, B. *et al.* Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 50–59 (2012).
6. Klaine, S. J. *et al.* Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. *Environ. Toxicol. Chem.* **31**, 3–14 (2012).
7. Owen, D. M. *et al.* NOM characterization and treatability. *J. / Am. Water Work. Assoc.* **87**, 46–63 (1995).
8. Liu, X., Chen, G. & Su, C. Influence of collector surface composition and water chemistry on the deposition of cerium dioxide nanoparticles: QCM-D and column experiment approaches. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 6681–6688 (2012).
9. Summers, R. S. & Roberts, P. V. Activated carbon adsorption of humic substances. II. Size exclusion and electrostatic interactions. *J. Colloid Interface Sci.* **122**, 382–397 (1988).
10. Helland, A. *et al.* Risk assessment of engineered nanomaterials: A survey of industrial approaches. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 640–646 (2008).
11. Aiken, G. R., Hsu-Kim, H. & Ryan, J. N. Influence of dissolved organic matter on the environmental fate of metals, nanoparticles, and colloids. *Environ. Sci. Technol.* **45**, 3196–3201 (2011).
12. Petosa, A. R., Jaisi, D. P., Quevedo, I. R., Elimelech, M. & Tufenkji, N. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical interactions. *Environ. Sci. Technol.* **44**, 6532–6549 (2010).
13. Hewakuruppu, Y. L. *et al.* Plasmonic ‘pump-probe’ method to study semi-transparent nanofluids. *Appl. Opt.* **52**, 6041–6050 (2013).
14. Taylor, R. A., Phelan, P. E., Otanicar, T. P., Adrian, R. & Prasher, R. Nanofluid optical property characterization: towards efficient direct absorption solar collectors. *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 1–11 (2011).
15. El-Rafie, M. H., Mohamed, A. A., Shaheen, T. I. & Hebeish, A.

- Antimicrobial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on cotton fabrics. *Carbohydr. Polym.* **80**, 779–782 (2010).
16. ALUMINIUM OXIDE NANOPARTICLES 2013.
<http://www.nanotechmag.com/wp-content/uploads/2014/09/ALUMINIUM-OXIDE-NANOPARTICLES-2013-.pdf>.
 17. Neste, A. Van. Structural transformations of alumina by high energy ball milling. *J. Mater. Res.* **8**, 2985–2992 (1993).
 18. Park, Y. K., Tadd, E. H., Zubris, M. & Tannenbaum, R. Size-controlled synthesis of alumina nanoparticles from aluminum alkoxides. *Mater. Res. Bull.* **40**, 1506–1512 (2005).
 19. Chen, Y., Su, Y., Zheng, X., Chen, H. & Yang, H. Alumina nanoparticles-induced effects on wastewater nitrogen and phosphorus removal after short-term and long-term exposure. *Water Res.* **46**, 4379–4386 (2012).
 20. Sadiq, I. M., Chowdhury, B., Chandrasekaran, N. & Mukherjee, A. Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **5**, 282–286 (2009).
 21. Zhao, D. & Lu, G. Q. (Max). Editorial. *J. Colloid Interface Sci.* **427**, 1 (2014).
 22. Strehlow, W. H. & Cook, E. L. Compilation of Energy Band Gaps in Elemental and Binary Compound Semiconductors and Insulators. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **2**, 163–200 (1973).
 23. Wang, F. *et al.* Hydrothermal synthesis of dumbbell-shaped ZnO microstructures. *Ceram. Int.* **39**, 8969–8973 (2013).
 24. Liu, J., Hui, A., Ma, J., Chen, Z. & Peng, Y. Fabrication and application of hollow ZnO nanospheres in antimicrobial casein-based coatings. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **14**, 128–134 (2017).
 25. Dougan, L., Tych, K. M. & Hughes, M. L. ARTICLE TYPE A single molecule approach to investigate the role of hydrogen bond strength on protein mechanical compliance and unfolding history. 8–10 (2016) doi:10.1039/b000000x.
 26. Benedetti, M. F. *et al.* Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium. *Nano Lett.* **6**, 866–870 (2006).
 27. Shi, X., Irwin, P. L., Jin, T., He, Y. & Xie, Y. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against Campylobacter jejuni. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2325–2331 (2011).
 28. Bian, S. W., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T. & Grassian, V. H. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: Influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir* **27**, 6059–6068 (2011).
 29. De Volder, M. F. L., Tawfick, S. H., Baughman, R. H. & Hart, A. J. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science (80-.)*. **339**, 535–539 (2013).

30. Peng, B. *et al.* Measurements of near-ultimate strength for multiwalled carbon nanotubes and irradiation-induced crosslinking improvements. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 626–631 (2008).
31. Endo, M., Hayashi, T. & Kim, Y.-A. Large-scale production of carbon nanotubes and their applications. *Pure Appl. Chem.* **78**, 1703–1713 (2006).
32. Zhang, Q., Huang, J. Q., Zhao, M. Q., Qian, W. Z. & Wei, F. Carbon nanotube mass production: Principles and processes. *ChemSusChem* **4**, 864–889 (2011).
33. Kumar, M. & Ando, Y. Chemical Vapor Deposition of Carbon Nanotubes: A Review on Growth Mechanism and Mass Production. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **10**, 3739–3758 (2010).
34. Cheung, C. L., Kurtz, A., Park, H. & Lieber, C. M. Diameter-controlled synthesis of carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B* **106**, 2429–2433 (2002).
35. Mattevi, C. *et al.* In-situ X-ray photoelectron spectroscopy study of catalyst-support interactions and growth of carbon nanotube forests. *J. Phys. Chem. C* **112**, 12207–12213 (2008).
36. Bolton, K. *et al.* The Importance of Strong Carbon–Metal Adhesion for Catalytic Nucleation of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Nano Lett.* **8**, 463–468 (2007).
37. Platinum Metals Review. *Nature* **179**, 292–292 (2006).
38. Liu, J. *et al.* Fullerene pipes. *Science* (80-.). **280**, 1253–1256 (1998).
39. Karzazi, Y. PHANTOMS NEWSLETTER Scientific Review articles Nanostructure Self- Assembly from monolayer protected clusters (MPCs) of gold Microwave Single Walled Carbon Nanotubes Purification(2002).
40. Yang, K. & Xing, B. Adsorption of fulvic acid by carbon nanotubes from water. *Environ. Pollut.* **157**, 1095–1100 (2009).
41. Templeton, R. C., Ferguson, P. L., Washburn, K. M., Scrivens, W. A. & Chandler, G. T. Life-cycle effects of single-walled carbon nanotubes (SWNTs) on an estuarine meiobenthic copepod. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 7387–7393 (2006).
42. Wu, W., Chen, W., Lin, D. & Yang, K. Influence of surface oxidation of multiwalled carbon nanotubes on the adsorption affinity and capacity of polar and nonpolar organic compounds in aqueous phase. *Environ. Sci. Technol.* **46**, 5446–5454 (2012).
43. <https://www.nanosupermarket.org/>.
44. Manzano, M. & Zabala, M. E. El fondo químico natural del sistema acuífero de la cuenca del Río Matanza – Riachuelo. 222 (2012).
45. Thurman, E. M. Amount of organic carbon in natural waters. in *Organic geochemistry of natural waters* 7–65 (Springer, 1985).
46. NASA. <https://nssdc.gsfc.nasa.gov/planetary/factsheet/sunfact.html>.
47. Focus, N. Forging a Link Between Biofilms and Disease. **283**, (1837).
48. Herrmann, M. *et al.* Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as

- mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J. Infect. Dis.* **158**, 693–701 (1988).
49. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**, 187–209 (2002).
 50. Shrout, J. D. *et al.* The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol. Microbiol.* **62**, 1264–1277 (2006).
 51. Karatan, E. & Watnick, P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 310–347 (2009).
 52. Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **185**, 1027–1036 (2003).
 53. Ryder, C., Byrd, M. & Wozniak, D. J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**, 644–648 (2007).
 54. Ghafoor, A., Hay, I. D. & Rehm, B. H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 5238–5246 (2011).
 55. Ertesvåg, H. & Valla, S. Biosynthesis and applications of alginates. *Polym. Degrad. Stab.* **59**, 85–91 (1998).
 56. Ma, L. *et al.* Synthesis of multiple *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix exopolysaccharides is post-transcriptionally regulated. *Environ. Microbiol.* **14**, 1995–2005 (2012).
 57. Colvin, K. M. *et al.* The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* **7**, e1001264 (2011).
 58. Vasseur, P., Vallet-Gely, I., Soscia, C., Genin, S. & Filloux, A. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved at early and late stages of biofilm formation. *Microbiology* **151**, 985–997 (2005).
 59. O'Toole, G. A. & Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **30**, 295–304 (1998).
 60. Ruer, S., Stender, S., Filloux, A. & de Bentzmann, S. Assembly of fimbrial structures in *Pseudomonas aeruginosa*: functionality and specificity of chaperone-usher machineries. *J. Bacteriol.* **189**, 3547–3555 (2007).
 61. Sivadon, P., Barnier, C., Urios, L. & Grimaud, R. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. *Environ. Microbiol. Rep.* **00**, (2019).
 62. Rossi, E., Paroni, M. & Landini, P. Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 1587–1602 (2018).
 63. Elias, S. & Banin, E. Multi-species biofilms: Living with friendly

- neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 990–1004 (2012).
64. Sanz, A. A., Payá, A. A., González, M. & Mártire, D. *Procesos químicos y fotoquímicos ambientalmente benignos para la degradación de efluentes acuosos industriales*. (2009).

Capítulo 2:

Materiales y métodos experimentales

*“Habiendo encontrado la pieza que me faltaba,
dejando de lado la muerte, la posverdad”*

Capítulo 2: Materiales y métodos experimentales

En el presente capítulo se detallan los materiales y equipamiento empleados y se describen los fundamentos de las diversas técnicas utilizadas en el desarrollo de este trabajo de tesis.

2.1. Solventes, reactivos, soluciones y medios de cultivo

En la tabla 2.1 se detallan los reactivos que se utilizaron en este trabajo, sin modificación posterior.

REACTIVO	PUREZA (%p/p)	MARCA
MgSO₄·7H₂O	99.5	Applichem
MgCl₂·6H₂O	99	Cicarelli
Na₂CO₃·H₂O	99	Timber
KCl	99	Biopack
NaNO₃	99	Biopack
CaCl₂	99	Anhedra
AcNa	99	Sigma Aldrich
Sales sódicas de Ácidos Húmicos	--	Sigma Aldrich
SDS	99	Sigma Aldrich
HCl	36,5-38	Cicarelli
HNO₃	69	Cicarelli
SDS	99	Sigma Aldrich
Al₂(SO₄)₃	99	Sigma Aldrich
ZnCl₂	98	Anhedra
NaOH	99	Anhedra

Tabla 2.1. Lista de reactivos empleados.

Para realizar los experimentos se utilizó agua ultrapura ($>18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$, $< 20 \text{ ppb}$ de carbono orgánico), obtenida con un equipo OSMOION.

Para este trabajo se utilizó una solución salina conteniendo las sales detalladas en la tabla 2.2, respetando las proporciones de sales presentes en el acuífero Puelche. Para evitar la precipitación de sales, luego de la formulación en el laboratorio se utilizó una solución de menor fuerza iónica que la publicada para el Acuífero Puelche. Esta solución se rotuló como *MIS* (acrónimo de matriz inorgánica simulada).

Componentes (ppm)	Concentración (ppm)
Cl⁻	679.8
SO₄²⁻	400
NO₃⁻	21.2
Na⁺	206.6
K⁺	37.8
Ca²⁺	555
Mg²⁺	716.6
pH	8.51
Fuerza iónica (I)	0.1128 M

Tabla 2.2. Composición de la solución salina empleada (MIS).

Los medios utilizados en los ensayos microbianos se detallan en las tablas 2.3 y 2.4.

Composición	Concentración (g/L)
Pluripeptona	5
Extracto de carne	3
NaCl	8
Agar	15

Tabla 2.3. Composición del Agar Nutritivo Britania.

Composición	Concentración (g/L)
Pluripeptona	5
Extracto de carne	2

Tabla 2.4. Composición del Caldo Nutritivo Merck.

2.2. Material común de laboratorio

Las pesadas se realizaron mediante una balanza electrónica marca A&D modelo ER-182A de $\pm 0,1\text{mg}$ de precisión. Se utilizó un equipo de ultrasonidos marca TESLAB S.R.L. modelo TB04TA con una potencia de 160W y una frecuencia de 40 kHz para asegurar la dispersión de los NMs en suspensión.

En los procesos de purificación se emplearon filtros de membrana hidrofílica con poros de 100 nm y de 45 μm , VVPP, Durapore®. Para realizar los estudios microbiológicos se empleó un flujo laminar horizontal marca FILTRAR y un autoclave eléctrico SanoClav.

2.3. Técnicas y equipamiento fisicoquímico

2.3.1 Espectroscopía de absorción UV-Vis

La absorción de radiación electromagnética es el proceso en el cual la materia toma energía por interacción con los fotones. Este fenómeno puede ser entendido a partir de variables macroscópicas por medio de la ley de Lambert-Beer, cuyas posibles expresiones se condensan en la ecuación (2.1):

$$A(\lambda_{\text{exc}}) = -\log T(\lambda_{\text{exc}}) = -\log [I_T(\lambda_{\text{exc}})/I_0(\lambda_{\text{exc}})] = \varepsilon(\lambda_{\text{exc}}).l.C \quad (2.1)$$

Donde A que depende de la longitud de onda de excitación λ_{exc} ($A(\lambda_{\text{exc}})$) es la absorbancia de la muestra, que se vincula de forma logarítmica con la transmitancia T. Esta se define como el cociente entre la intensidad transmitida por la muestra (I_T) y la intensidad incidente (I_0). A su vez, la absorbancia se define alternativamente como el producto entre el camino óptico (l), el coeficiente de absorción molar (ε) y la concentración molar (C) de la especie absorbente. Puede verse en la ecuación 2.1 que las variables T, I_T , I_0 , ε también dependen de λ_{exc} .

Las mediciones de atenuancia se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-1800, con ancho de banda entre 0,2 y 4,0 nm según el ancho de rendija seleccionado y velocidad de barrido de 300 nm/min. Las suspensiones de MWCNT (10ppm), NP-ZnO y NP-Al₂O₃ (50ppm) se colocaron en celdas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico y se tomó el espectro barriendo desde 800 a 200 nm.

2.3.2. Espectroscopía vibracional: FT-IR y Raman

La técnica FT-IR debe su nombre a que utiliza la fracción media del espectro infrarrojo entre (4000 - 400) cm⁻¹ y aprovecha el hecho que las moléculas o grupos funcionales dentro de ellas poseen frecuencias donde tienen vibraciones fundamentales. Las moléculas alcanzan estas frecuencias vibracionales al absorber energía de esta región del espectro electromagnético. Este método es típicamente utilizado para la identificación de grupos funcionales presentes en una muestra.

El método básico de funcionamiento de la técnica utiliza un haz de luz infrarroja dividido en dos fracciones, una utilizada como referencia y otra que atraviesa la muestra. Ambos haces son reflejados hacia un detector y a continuación se comparan los haces y se registran los cambios en la intensidad para cada longitud de onda ($\tilde{\nu} = 1/\lambda$) y así se registran los datos.

Teniendo en cuenta que las energías vibracionales de las moléculas se encuentran en la región infrarroja del espectro electromagnético, las técnicas de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

proporciona información útil para analizar la composición química de la muestra. Los espectros FT-IR se obtuvieron con un equipo Bruker IFS28 equipado con un detector DTGS, con 128 scans por min y una resolución de 4 cm^{-1} en el intervalo entre 4000 y 400 cm^{-1} . Para lograr el objetivo se utilizó una suspensión de MWCNTs o NP-OMe utilizando pastillas de KBr (Calidad FT-IR, Sigma Aldrich) de espesor delgado. Para el armado de la pastilla, la suspensión de MWCNT o NP-OMe se gotearon sobre KBr sólido, hasta ligera coloración de la muestra. Se secó en estufa de vacío a 80°C y el sólido remanente se colocó en una prensa para formar la pastilla utilizando $0,5\text{ gr}$ de la muestra y aplicando una presión de 5 toneladas. Como blanco se empleó una pastilla de KBr sin el agregado de muestra.

En ocasiones se utilizó un equipo FT-IR Agilent Cary 630 (figura 2.1) con un accesorio ATR Single Bounce que posee un cristal de diamante. Mientras que en el FT-IR se analiza la transmitancia de la muestra haciendo que un haz de luz la atraviese, el ATR usa la reflectancia de la muestra. En una medida típica se monitorean los cambios que ocurren en el haz de luz IR reflejado totalmente cuando se encuentra en contacto con la muestra. Para ello se utiliza un cristal ópticamente denso con un índice de refracción alto y se irradia a un ángulo conocido. Este cristal crea una onda evanescente con una penetración de entre 0.5 y $5\mu\text{m}$, permitiendo utilizar esta técnica para analizar la composición superficial de la muestra.

Este equipo no requiere la formación de pastillas para el análisis de la muestra. Se utilizó un intervalo de 4000 a 650 cm^{-1} , con 128 scans por minuto y 4 cm^{-1} de resolución.

Figura 2.1. Espectrómetro FTIR Agilent Cary 630 con accesorio ATR Single Bounce.

La espectroscopía Raman es una técnica fotónica de alta resolución que proporciona información química y estructural de casi cualquier muestra. El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son

característicos del material analizado e independientes de la frecuencia de la luz incidente. Se trata de una técnica de análisis que no requiere preparación especial de la muestra ni genera ninguna alteración de la superficie a la que se realiza el análisis, es decir, es no destructiva.

Los estudios Raman prerresonantes se realizaron como servicios a terceros utilizando un tubo capilar a temperatura ambiente para las muestras sólidas o en suspensión, en el rango entre 4000 y 100 cm^{-1} con un espectrómetro dispersivo Spex-Ramalog con doble monocromador provisto con un microprocesador Scamp usando una resolución de 5 cm^{-1} . Se empleó la excitación proveniente de un láser de Ar Spectra-Physics modelo 165 con líneas de excitación 514,5, 488,0 y 457,9 nm. Para las medidas se utilizó una geometría de 90° entre el haz incidente y la detección del haz dispersado y un scrambler entre la muestra y el monocromador. Para la calibración de los números de ondas se empleó la banda de 459 cm^{-1} del CCl_4 . Para las muestras sólidas se utilizó K_2SO_4 como estándar interno de intensidad y para las líquidas se normalizó la medida con una de las bandas de menor número de onda.

2.3.3. Difracción de rayos X

Los rayos X (RX) son una forma de radiación electromagnética con longitud de onda entre los 10 y 0.01 nm; apareciendo en el espectro electromagnético entre los rayos γ y el ultravioleta. Los RX utilizados en esta técnica son coherentes y monocromáticos producidos a través de la excitación de un elemento (comúnmente Cu°), al cual se le lleva a un estado excitado mediante irradiación RX policromática. Así se desprende un electrón de la capa más interna del material y como consecuencia, para disminuir la energía de la especie excitada formada, los electrones de energía más alta rellenan la vacancia emitiendo rayos X al bajar de nivel. En la figura 2.2 se esquematiza este proceso, donde un electrón de un orbital más externo (2p o 3p) pasa a ocupar la vacancia del nivel 1s, y la energía liberada en este proceso aparece como radiación X.

Figura 2.2. Esquema de generación de Rayos X¹.

Específicamente hablando del Cu, la transición entre los orbitales $2p \rightarrow 1s$ es conocido como $K\alpha$ y tiene una longitud de onda de $1.5418\text{\AA}$; entre los orbitales $3p \rightarrow 1s$ es llamado $K\beta$ y tiene un valor de $1.3922\text{\AA}$ ². La difracción de RX es un fenómeno físico que se produce al interaccionar un haz de RX coherente y monocromático con una longitud de onda similar al de la distancia interplanar de los átomos de un material cristalino, produciéndose una interferencia o dispersión coherente del haz producto de la interacción con los átomos del material cristalino. Cuando en una determinada dirección se observa la dispersión cooperativa procedente de varios átomos es porque entre las ondas que se emiten en esa dirección existe concordancia de fases^{2,3}.

Siendo así, en un material cristalino la difracción solo se da en determinados ángulos de acuerdo la ley de Bragg (2.2):

$$n\lambda = 2d_{hkl} \cdot \text{Sen}\theta \quad (2.2)$$

Donde λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, θ es el ángulo que forman el haz incidente y los planos cristalinos, n es un número entero y d_{hkl} es la distancia entre planos cristalinos, la figura 2.3 esquematiza lo anterior.

Del difractograma obtenido es posible calcular el tamaño cristalino de partícula siguiendo el modelo de Scherrer (2.3):

$$D_{DRX} = \frac{k\lambda}{B_c \cos\theta} \quad (2.3)$$

Siendo B_c la anchura del pico de mayor intensidad, λ es la longitud de onda de la fuente de rayos X, θ es el ángulo donde tiene lugar la difracción y k es una constante que depende de la estructura cristalina del material analizado.

El equipo utilizado en este trabajo fue un difractómetro de rayos X PW3040/60 X'Pert PRO MPD de PANalytical utilizado en geometría tipo Bragg-Brentano, equipado con un tubo cerámico PW3373/10 LFF que utiliza como fuente un cátodo de Cu^0 . El análisis cualitativo de las fases presentes en los materiales se realizó utilizando el software X'Pert PANalytical con la base de datos analítica ICDD-PDF-2. Se empleó la radiación $\text{K}\alpha$ del Cu^0 .

Figura 2.3. Esquema de difracción de rayos X.

2.3.4. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) es una técnica semicuantitativa y de baja resolución espacial que habitualmente se utiliza para estimar la estequiometría, estado químico y estructura electrónica de los elementos que existen en la superficie de un material (de 1 a 10 nm de profundidad). Los espectros XPS son obtenidos cuando se irradia una muestra con rayos X, al tiempo que se mide la energía cinética y el número de electrones que escapan de la superficie a analizar. Para una medida de XPS se requieren condiciones de ultra alto vacío (UAV), debido a que a presiones mayores la tasa de adsorción de contaminantes sobre la muestra puede ser del orden de varias monocapas atómicas, impidiendo el estudio de la superficie que realmente se quiere analizar. Los espectros XPS fueron obtenidos en UAV con un espectrómetro XR50 Specs GmbH con $\text{MgK}\alpha$ como fuente de excitación y un analizador de energía de media esfera PHOIBOS 100. Se calibró con $\text{Au } 4f_{7/2}$ y $\text{Cu } 2p_{3/2}$ con energías de enlace de 84,00 y 933,67 eV, respectivamente (figura 2.4). A su vez, debido a que la muestra puede adquirir una carga estática durante las medidas, se empleó como patrón interno la señal $\text{C } 1s$ con energía de enlace 284.6 eV.

Para la deconvolución de los espectros resultantes se empleó el software XPSpeak4.1, usando funciones gaussianas – lorentzianas, corroborando la calidad del ajuste empleando la prueba χ^2 . La preparación de las muestras se efectuó depositando lentamente gotas de dispersiones de las soluciones en algún solvente volátil sobre un sustrato de Si, previamente tratado con una solución 10% de HF en etanol.

Con el objetivo de remover finas capas de la muestra de MWCNT, se utilizó la técnica de bombardeo de iones y el posterior análisis anteriormente descrito. El proceso se basa en el bombardeo de la muestra por iones de un átomo inerte, usualmente Argón que tiene la capacidad de quitar las últimas capas atómicas del material. Por este medio es posible hacer el estudio de la composición de los materiales como función de la profundidad.

Se ensayaron ciclos de 3.5 y 7 min de bombardeo iónico con Ar^+ (MESSER 5.0) a una presión del orden de 10^{-7} mbar con un cañón SPECS modelo IQE 12/38 (voltaje de aceleración 5000 V, corriente sobre la muestra de 15 μA).

Figura 2.4. Esquema de la técnica XPS⁴.

2.3.5. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La dispersión dinámica de luz (DLS) es una técnica que permite la determinación del radio hidrodinámico de partículas hasta la región del nanómetro ($1 \times 10^{-9} \text{m}$). Para ello se utiliza un láser de luz monocromática y coherente y haciéndolo incidir sobre la muestra de estudio suspendida en un solvente adecuado, se observa así una fluctuación en la intensidad de luz dispersada dependiente del tiempo debido a los movimientos de tipo Brownianos de las partículas en la suspensión.

La velocidad del movimiento Browniano depende del coeficiente de difusión traslacional (D). El tamaño de las partículas se calcula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein (2.4):

$$d(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (2.4)$$

Donde $d(H)$ es el diámetro hidrodinámico; k la constante de Boltzmann; T la temperatura absoluta a la cual se realizó el experimento; D el coeficiente de difusión. El diámetro obtenido aplicando la técnica de DLS corresponde al diámetro de una esfera que posee el mismo coeficiente de difusión que las partículas.

Los ensayos de DLS fueron realizados a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$, a pH 7.0 utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments; UK). Las medidas de dispersión se realizaron monitoreando la intensidad de luz dispersada en un ángulo fijo de 90° y se hicieron mediciones por triplicado.

2.3.6. Fuentes de irradiación utilizada y tratamientos

2.3.6.1. Lámparas de emisión monocromática

Para aquellos experimentos en los cuales se requiere obtener información acerca del efecto que tiene la luz de una longitud de onda en particular, se utilizaron 8 lámparas de tubo con emisión monocromática colocados en un fotoreactor cilíndrico Rayonet® (figura 2.5). Para este trabajo de tesis se utilizaron lámparas con el máximo de emisión en 350 ± 5 nm y 575 ± 5 nm respectivamente.

El protocolo de irradiación utilizado es el siguiente: 200 ml de una suspensión 10ppm de MWNTC se colocaron en un tubo de cuarzo de capacidad 600ml. Todo el sistema se puso en el fotoreactor Rayonet® bajo agitación y manteniendo la temperatura constante mediante ventilación. El tiempo de irradiación de la suspensión fue de 24 h y luego de este tiempo, se filtró utilizando membranas de nylon de $45 \mu\text{m}$.

El sólido obtenido se secó en estufa a 60°C por 8 h. En el caso de irradiación en presencia de ácidos húmicos, el protocolo fue idéntico, pero colocando 10ppm de ácidos húmicos en el medio de reacción.

Los ensayos en *P. aeruginosa* en estado planctónico se realizaron con el mismo arreglo experimental, utilizando un tiempo de irradiación de 2h.

Figura 2.5. Reactor Rayonet®

2.3.6.3. Luz solar

Los ensayos con radiación solar natural brindan un panorama más real acerca de lo que ocurre en el medioambiente que los realizados con luz monocromática. Por ello se trabajó en colaboración con el Dr. Antonio Arquez de la Universidad Politécnica de Valencia (Alcoy, España) quien nos facilitó el uso de colectores cilíndricos parabólicos (CPC) utilizando como fuente de irradiación la luz solar.

Estos reactores de factor de concentración $FC=1$ pueden captar toda la radiación solar (tanto la directa como la difusa) y restringirla al interior del tubo por donde circula la muestra. Estos colectores, generalmente son estáticos y consiguen la máxima eficiencia de captación anual con un ángulo de inclinación del colector sobre la horizontal semejante a la latitud del lugar de emplazamiento.

Las ventajas de estos reactores frente a otros son las siguientes:

- Aprovechan la radiación directa y difusa.
- Se evita el sobrecalentamiento del agua a tratar.
- Presentan alta eficiencia óptica y cuántica.
- Bajo costo.
- Flujo turbulento que favorece la transferencia de materia.
- Evitan evaporación de compuestos volátiles.

A la hora de informar sobre los resultados del tratamiento descrito es necesario conocer la radiación acumulada. Debido a que las intensidades de iluminación son relativas a las condiciones meteorológicas, época del año y hora en la cual se realiza el experimento, los resultados se expresan en función del tiempo de iluminación normalizado, TW30. Para definirlo (ecuación 2.5), se asume que en un día perfectamente soleado durante dos horas alrededor del mediodía la radiación UV es aproximadamente 30 W/m^2 .

$$t_{w, n} = t_{w, n-1} + \Delta t_n (\text{UV} \cdot V_i - 30V_T); \Delta t_n = t_n - t_{n-1} \quad (2.5)$$

Donde t_n es el tiempo experimental para cada muestra, UV es la radiación ultravioleta media, medida por el radiómetro durante Δt_n , V_i es el volumen del reactor iluminado y V_T es el volumen total del fotoreactor.

Para irradiar suspensiones de nanotubos de carbono, se colocaron en el reactor 5L de una suspensión 10 ppm de MWCNT en solución salina

Figura 2.6. Reactor CPC.

modelo y se irradiaron distintos tiempos utilizando una bomba peristáltica para recircular la suspensión. Asimismo, se realizaron irradiaciones de las suspensiones de MWCNT, utilizando el mismo protocolo, pero en presencia de 10 ppm de AH.

2.3.6.4. Solar box

También se utilizó una Solar Box® para realizar los experimentos de resonancia paramagnética electrónica (EPR), ya que el dispositivo al contar con una lámpara de Xenón posee un espectro similar al solar. El protocolo de irradiación se detalló en la sección 2.3.8.3 de este capítulo. Estos estudios se desarrollaron en colaboración con la Dra. Paola Calza de la Universidad de Torino (Torino, Italia).

2.3.7. Microscopías

2.3.7.1. Microscopía de epifluorescencia

Las observaciones por microscopía de epifluorescencia se realizaron con un microscopio de epifluorescencia OlympusBX51 con filtros tipo #WB correspondientes a: espejo dicróico DM460, filtro de excitación BP350 y barrera de filtro BA400. *BP (band pass filter)*: filtros que dejan pasar una banda comprendida entre dos longitudes de onda, por ejemplo “BP460-580” significa que es opaco a longitudes de onda no comprendidas entre 460nm y 580nm.

En la figura 2.5 se presenta una fotografía del microscopio utilizado.

Figura 2.5. Microscopio de epifluorescencia Olympus BX51.

2.3.7.2. Microscopía de transmisión electrónica de alta resolución (TEM)

En el desarrollo experimental de este trabajo se utilizaron dos microscopios electrónicos de transmisión: un Microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (HR-TEM) JEOL JEM 3010UHR (300 kV)

con un filamento de LaB₆ y un microscopio TEM JEOL 100 CX II. Los NMs se suspendieron en agua, posteriormente se sembró la muestra gota a gota sobre soportes de Cu permitiendo la evaporación del solvente, antes de colocarlo en el portamuestras.

Las distribuciones de tamaño de partículas y los histogramas fueron obtenidos utilizando el software de análisis ImageJ.

2.3.7.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es uno de los instrumentos más versátiles para el examen y análisis de características microestructurales superficiales de objetos sólidos. Ello es debido a su alta resolución (de 20 a 50 Å) y a la apariencia tridimensional de las imágenes, producto de su gran profundidad de foco (aproximadamente entre 100 y 1000 veces mayor que la de un microscopio óptico a la misma magnificación).

Esta técnica fue utilizada con el objetivo de determinar la estructura de biopelículas que se desarrollaron en presencia de distintos NMs.

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido ambiental (ESEM), marca FEI, modelo Quanta 200 con EDX acoplado, para determinar la composición elemental de la muestra. Las muestras se fijaron con glutaraldehído (2%), seguido de deshidratación con soluciones de etanol de distinta concentración creciente hasta llegar a etanol absoluto (%100). Posteriormente se sometieron a deshidratación con CO₂ en punto crítico y posterior metalizado con Au°. El servicio fue provisto por el laboratorio de investigaciones de Metalurgia Física (LIMF)-Facultad de Ingeniería-UNLP.

2.3.8. Detección de especies reactivas

2.3.8.1. Láser flash fotólisis

La técnica de láser flash fotólisis es una herramienta ampliamente utilizada para el análisis cualitativo y cuantitativo de estados excitados e intermediarios que participan en procesos fotoquímicos con vida media corta⁵.

Para ello el sistema de estudio es irradiado con un pulso de luz con menor duración que el de los procesos de estudio y de alta intensidad, generando así grandes concentraciones de intermediarios en un tiempo muy corto (figura 2.6). La concentración de intermediarios se monitorea en función del tiempo por diferentes métodos de acuerdo con la naturaleza intrínseca del sistema de estudio, el más comúnmente utilizado es la espectrofotometría. Independientemente del método de detección seleccionado, el tiempo de resolución de la técnica está delimitado por la duración del pulso de excitación⁶. Debido a esto, en la actualidad se usan comúnmente láseres con tiempos característicos del pulso de excitación menores a 10⁻⁹ s, con alta intensidad y frecuencia de repetición y con un

rango angosto y preciso de longitudes de onda⁷. En el caso del sistema en estudio, se utilizó la espectroscopía UV/Vis debido a que los intermediarios de interés presentaban altos coeficientes de extinción molar y espectros de absorción conocidos.

El arreglo experimental puede observarse en la figura 2.6 y consta de una lámpara de análisis que se encuentra a 90° respecto al haz del láser. La radiación láser es absorbida por el sistema en estudio para producir especies reactivas, en general estados excitados o radicales libres, cuya absorción característica es detectada por el sistema de análisis consistente en un monocromador y un fotomultiplicador de respuesta rápida capaz de convertir la señal lumínica en una señal eléctrica. Esta última es recibida por un osciloscopio conectado a una computadora para finalmente convertir la señal eléctrica en absorbancia. La absorbancia de estos intermediarios reactivos disminuye en el tiempo de acuerdo con los procesos por los cuales el intermediario reacciona con otras moléculas. La figura 2.7 muestra un decaimiento típico obtenido en estos experimentos.

Figura 2.6. Esquema del arreglo experimental de un equipo de Láser Flash Fotólisis.

Análisis de los decaimientos de Laser Flash Fotólisis

Antes de realizar cualquier análisis matemático, se requiere convertir la señal de voltajes en función del tiempo (figura 2.7) a absorbancia en función del tiempo.

Para ello, en cada corrida experimental se realizan mediciones antes del pulso del láser. A este valor se asigna el 100% de transmitancia y se le asocia un mismo valor de voltaje para todas las longitudes de onda utilizando un comparador diferencial conectado al osciloscopio. La

respuesta “x” detectada por el osciloscopio es proporcional a la luz transmitida $I=kx$, donde la constante k depende de la sensibilidad del equipo. De acuerdo a la ley de Lambert-Beer (2.6) es posible la conversión de estos datos a absorción:

$$A_t = -\log (I_t/I_0) = -\log (x/x_0) = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot C_t \quad (2.6)$$

Donde A_t es el cambio de la absorbancia al tiempo “t” producido por el pulso de luz, ϵ_λ es el coeficiente de extinción molar de la especie transitoria, a la longitud de onda seleccionada, C_t es la concentración molar al tiempo “t” y “l” el camino óptico en centímetros. Para ajustar el valor de x_0 se toma el promedio de los valores medidos antes del disparo del flash.

Una vez obtenidos los perfiles de absorbancia de los transitorios medidos, los mismos se ajustaron por cinéticas de primer orden (ecuación 2.7), segundo orden (ecuación 2.8), o mixto (ecuación 2.9) a cada longitud de onda dada.

Para la cinética de primer orden:

$$A = A_0 e^{(-at + d_\lambda)} \quad (2.7)$$

Para la cinética de segundo orden:

$$A = A_0 + C_\lambda t \quad (2.8)$$

Para cinética de orden mixto:

$$A = a \cdot b_{(\lambda)} e^{(at - C(\lambda))} \quad (2.9)$$

Para todos los casos A_0 es la absorbancia a tiempo cero, a es la constante cinética de primer orden, $b_{(\lambda)} = (a / A_0) + C_{(\lambda)}$, a partir de $C_{(\lambda)} = 2k/\epsilon$ puede calcularse la componente de segundo orden ($2k/\epsilon$). $d_{(\lambda)}$ corresponde a la absorción de especies de vida larga que se forman después de la desaparición del transiente. Los análisis para la comprobación del menor número de especies presentes se realizaron mediante el software Glotaran®.

Figura 2.7. Decaimiento típico de un experimento de Flash Fotólisis.

El láser utilizado en este trabajo fue un Laser Litron Nd: YAG (2 ns de disparo y 6 mJ por pulso a 266 nm), la lámpara de análisis utilizada es de Xe a presión de 1 a 3 atmósferas con una potencia de 350 W, el haz de luz es enfocado mediante un sistema de lentes sobre un monocromador PTI 1695 y amplificado en un fotomultiplicador 1P28 PTM. La salida se conecta a un osciloscopio Tektronix 520A, 500MHz. Se recolectaron un promedio de 64 señales individuales.

2.3.8.2. Detección de anión radical superóxido

La generación de superóxido se determinó de forma indirecta mediante la detección de agua oxigenada (H_2O_2) producida a partir de la ecuación 2.10:

La concentración de H_2O_2 en las muestras de reacción se determinó mediante un método enzimático colorimétrico empleando un kit comercial (Wiener) para determinación de colesterol.

El kit comercial provee los siguientes reactivos: una solución de 4-aminofenazona (4- AF), una solución de fenol y una mezcla de enzimas (peroxidasa (POD), lipasa fucional y colesterol oxidasa (CHOD)). El método se basa en la reacción del H_2O_2 con una mezcla de 4-AF y fenol para dar como producto la quinonaimina (4-(pbenzoquinona monoimino)-fenazona) que presenta un máximo de absorbancia a 505 nm ($\epsilon(505) = 5035 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

La reacción catalizada por la POD se muestra en la figura 2.8.

Figura 2.8. Reacción catalizada por la POD.

Las determinaciones de H_2O_2 en la mezcla de reacción se realizaron de la siguiente manera: se preparó el reactivo de trabajo mediante la mezcla de las soluciones provistas por el kit comercial. Las concentraciones finales de las diferentes especies en el reactivo de trabajo fueron las siguientes: [4-AF] = 1,5 mM; [fenol] = 2,75 mM; [POD] = 0,4 U·m/L; [Lipasa] = 6,0 U·m/L; [CHOD] = 0,06 U·m/L. Es importante aclarar que las enzimas Lipasa y CHOD intervienen solamente en la secuencia de reacciones que involucra la determinación del colesterol, no afectando la determinación de H_2O_2 .

Diseño experimental

Se preparan diluciones a partir H_2O_2 comercial dentro del rango de 100 y 600 μM de H_2O_2 . Volúmenes de 400 μl de las diferentes diluciones y de un blanco de agua destilada se mezclan con 1,8 ml del reactivo comercial. Las diferentes diluciones y el blanco se incuban durante 5 minutos a 37°C (o durante 30 minutos a temperatura ambiente). Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron los espectros de absorción entre 400 y 600 nm. Se grafica la curva de calibración (figura 2.9) y se procede luego a la determinación de las muestras. Las muestras se irradian saturadas en oxígeno durante 60 min con una lámpara de 350 nm. Luego se agrega un volumen de 400 μl de cada muestra irradiada sobre 1,8 ml del reactivo y se incuba durante 5 minutos a 37°C . Se realiza la lectura de absorbancia a 505 nm y de la curva de calibración se obtienen los valores de concentración de H_2O_2 . Se utilizaron suspensiones 10 ppm de las muestras de MWCNT y 50 ppm de las muestras de NP-ZnO y NP- Al_2O_3 para realizar los experimentos.

Figura 2.9. Curva de calibración C(mM) H₂O₂ vs Abs⁵⁰⁵.

2.3.8.3. Resonancia paramagnética electrónica

La resonancia paramagnética electrónica (EPR) es una técnica espectroscópica que permite detectar especies con electrones desapareados. Se trata de una técnica complementaria a otras técnicas analíticas que permite la detección directa de radicales libres. Los espectros EPR se midieron con un espectrómetro Bruker ESR 300E que opera en la banda X. Cuando la vida media de los radicales es muy corta para ser detectada por esta técnica, se utilizan agentes atrapantes capaces de reaccionar covalentemente con los productos radicalarios formando aductos con resonancia paramagnética estable, capaz de ser medida por EPR. Como agentes de captura se emplearon DMPO (5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido) 17 mM para el radical hidroxilo y TMP (2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona) 45 mM para el oxígeno singulete. Las muestras se colocaron en capilares de cuarzo y se midieron a temperatura ambiente. Los parámetros de EPR se fijaron en los siguientes valores:

- Frecuencia de microondas 9.78 GHz.
- Potencia de microondas 5 mW.
- Frecuencia de modulación 100 KHz.
- Tiempo constante 40 ms.
- Amplitud de modulación 0.4 Gauss.
- Ganancia 1×10^5 .

Los experimentos se realizaron colocando 5 ml de una suspensión 10ppm de MWCNT (prístinos o previamente irradiados) en una celda de vidrio de capacidad 25mL con cierre hermético. La celda se irradió con la SolarBox® durante 55 min. Una vez transcurrido el tiempo se agregó el agente capturador (DMPO), se irradió 3 min adicionales y se tomaron los espectros inmediatamente luego de finalizada la irradiación.

Para los ensayos con los filtrados de la muestra de MWCNTs, el esquema experimental fue similar solo que además se utilizó el agente atrapante TMP para determinar oxígeno singulete, irradiando durante 15 minutos más, luego de la primera irradiación.

2.3.9. Medidas de susceptibilidad magnética

Cuando se somete un material a la acción de un campo magnético, sus electrones generan dipolos magnéticos que se ordenan con el campo dando lugar a un momento magnético dentro de este. Los sólidos pueden clasificarse en función de su respuesta al aplicar un campo magnético. La figura 2.10 representa este comportamiento. Si el sólido solo posee átomos con electrones apareados es diamagnético, como es el caso del agua. Caso contrario, es el de los átomos con electrones desapareados y que las interacciones entre estos sean débiles, entonces el sólido es paramagnético. Al aplicar un campo magnético a un material paramagnético los dipolos magnéticos producidos a escalas atómicas tienden a alinearse con la dirección del campo global al que es sometido, sin embargo, al eliminar el efecto del campo externo, las fluctuaciones térmicas hacen que los momentos magnéticos se muevan al azar obteniéndose un momento magnético nulo. La ley de Curie representa el comportamiento antes mencionado (ecuación 2.11):

$$\mathbf{M} = \mathbf{C} \frac{\mathbf{H}}{\mathbf{T}} \quad (2.11)$$

Donde M es la magnetización, H es el campo externo aplicado, T es la temperatura absoluta a la que está sometida el sistema y C es la constante de Curie, típica de cada material. Un ejemplo de un material paramagnético es el Titanio.

Figura 2.10. Curvas típicas Magnetización vs. Campo Magnético de diferentes tipos de materiales.

En los experimentos comprendidos en este trabajo, los momentos magnéticos de los MWCNT fueron medidos en función de un campo magnético aplicado utilizando un magnetómetro de muestra vibrante (VSM) LakeShore 7304 en el rango de campo de $[-1.5 \times 10^5, 1.5 \times 10^5]$ A/m. La ventana de tiempo experimental para estas medidas es $\tau_{VSM} \approx 30$ s.

Para las medidas magnéticas, se encapsularon 20 mg de cada muestra en un cilindro delgado de PVC sellado al calor para evitar la pérdida de la muestra. Las cápsulas fueron introducidas dentro de un contenedor cilíndrico de plástico fijado en el final del VSM o del susceptómetro dependiendo del caso. En el caso del VSM, la muestra está sometida a una frecuencia de oscilación de 82 Hz durante 30 minutos antes del inicio de las medidas para promover la distribución uniforme de la muestra en el interior del volumen.

2.3.10. Cálculo del área superficial específica

El cálculo del área superficial específica de las muestras en estado sólido se realizó usando el modelo de adsorción de Brunauer–Emmett–Teller (BET)⁸ bajo el supuesto que el área superficial ocupada por una molécula de N_2 es de 0.1620 nm^2 . Para este fin se utilizó un equipo ASAP2020, las medidas se realizaron a 77 K. Previo a dicho análisis las muestras se deaerearon mediante calentamiento a 300°C por 12 hs y realizando vacío hasta una presión residual de 10^{-2} mbar para garantizar la eliminación de moléculas fisisorbidas sobre la superficie.

2.3.11. Análisis elemental por acoplamiento de plasma inductivo: ICP-MS

La determinación de elementos en solución acuosa se realizó mediante la técnica de espectroscopía óptica de emisión (ICP – AES) utilizando un equipo Perkin Elmer Optima Modelo 7000DV. Para el sistema de detección se utilizó una precámara de spray ciclónica, un nebulizador PTFE Mira

Mist y un monocromador Echelle. Las condiciones experimentales en las que se realizaron todos los test relacionados son: potencia de plasma 1.3 kW, velocidad de aspiración de muestra 1.2 mL/min, flujo de enfriamiento de argón 1.5 L/min, flujo de argón para muestreo 0.6 L/min. La relación Al: Co: Fe de los MWCNT se obtuvo realizando una disolución previa de una masa conocida en una digestión ácida (HCl: HNO₃ en proporción 1:3) seguido de un tratamiento de calentamiento empleando microondas. El quipo empleado se detalla en la figura 2.11.

Figura 2.11. Equipo Perkin Elmer Optima Modelo 7000DV.

2.3.12. Determinación de carbono orgánico total (TOC)

Para este fin se utilizó un equipo Shimadzu TOC-5000A que emplea un método experimental indirecto para la determinación del Carbono Orgánico Total. El método se basa en medir inicialmente el Carbono Total (TC) y el Carbono Inorgánico Total (TIC) y posteriormente por un balance másico de la masa Total de Carbono es posible calcular el TOC (ecuación 2.12):

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{TIC} \quad (2.12)$$

Para ello, este equipo posee dos canales de análisis, uno para el TC y otro para el TIC que son medidos directamente. Para la determinación del TC se requiere que todo el Carbono de la muestra sea oxidado a CO₂ mediante una conversión catalítica en un horno a 680 °C, para su posterior transporte hacia la cámara de detección. En el segundo canal, para la determinación del TIC se realiza una conversión selectiva a baja temperatura de los carbonatos y bicarbonatos a CO₂, mediante la acidificación de la muestra con ácido fosfórico.

Posterior a ello el CO₂ es transportado a un deshumidificador para la remoción del agua remanente y se lleva a la cámara de análisis.

En ambos casos la cámara de detección es la misma, basada en una fuente de irradiación infrarroja que se divide en dos haces, uno se hace pasar por la muestra y el segundo por la referencia. La celda de muestra recibe el flujo del canal seleccionado que consiste en gas portador que lleva consigo los productos de reacción de la muestra inyectada. La referencia es una celda que contiene N_2 , el que no absorbe en el IR. La radiación infrarroja es absorbida por el CO_2 en la celda de la muestra, y el porcentaje de la radiación absorbida es proporcional al valor de la concentración de CO_2 . Para la calibración del equipo se utilizaron soluciones patrones de biftalato de potasio de concentración conocida.

2.3.13. Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno es una buena opción para monitorear el estado de oxidación de compuestos orgánicos. En el caso particular de esta tesis, si los MWCNTs logran oxidarse por presencia de una fuente lumínica, la DQO descende proporcionalmente. El kit (Merk®) consiste en un oxidante fuerte como dicromato en presencia de ácido nítrico (Standard Methods 5220-D). Se coloca 1mL de la muestra a examinar en el vial con los reactivos y se somete a calentamiento a $148^\circ C$ por 2hs para acelerar la reacción, hasta que la muestra se halle completamente oxidada. Si hubo una oxidación considerable, la absorbancia del dicromato será menor. El kit incluye un equipo de detección spectroquant® que convierte la absorbancia medida en la cantidad de ppm de O_2 que se necesitan para oxidar completamente la muestra (DQO).

2.3.14. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es una técnica electroquímica efectiva y versátil para el estudio mecanístico de sistemas redox, proporcionando información sobre la reversibilidad o irreversibilidad de una reacción electroquímica, cuantifica concentraciones de especies presentes en solución, determina áreas de superficies metálicas y permite evaluar la respuesta electroquímica de materiales, entre otras.

La técnica consiste en cambiar de una manera cíclica el potencial de un electrodo estacionario o de trabajo inmerso en una solución en reposo y medir la corriente resultante. Los electrodos usados son generalmente sólidos, planos con áreas pequeñas. La señal de excitación es un barrido de potencial lineal con una onda de forma triangular. Las velocidades de barrido simétricas triangulares pueden variar desde unos cuantos milivolts por segundo hasta cientos de volts por segundo. Esta señal de excitación triangular de potencial barre el potencial del electrodo de trabajo en dirección de ida y vuelta entre dos límites de potencial, el catódico y el anódico. El voltamograma completo con las formas de las ondas catódica (reducción) y anódica (oxidación), se muestra en la figura 2.12.

Los parámetros importantes de un voltamograma cíclico son la magnitud de la corriente anódica del pico anódico, (i_{pa}); de la corriente catódica del pico catódico, (i_{pc}); del potencial del pico anódico, (E_{pa}); del potencial del pico catódico, (E_{pc}).

Figura 2.12. Voltamograma cíclico esquemático de una reacción redox.

Para realizar los ensayos de Voltametría se utilizó un potenciostato/galvanostato TEQ4 (NanoTeq, Argentina) y una celda electroquímica de vidrio Pyrex. Se utilizó un electrodo de trabajo y contra electrodo de Pt y un electrodo de calomel como referencia. Se suspendieron las muestras de MWCNT en MIS hasta llegar a una concentración de 10 ppm y se reguló el pH con pequeñas alícuotas de NaOH, hasta llegar a un valor de 7.4. La muestra se colocó en la celda electroquímica y antes de medir se dejó reposar por 3 hs para que todos los equilibrios de adsorción tuviesen lugar.

2.3.15. Termogravimetría analítica (TGA)

La termogravimetría analítica (TGA) se define como la técnica mediante la cual se mide el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras ésta se somete a un programa de temperatura controlado en una atmósfera específica. El programa de temperatura puede ser el de mantener la temperatura constante, calentamiento a velocidad constante (el más habitual), enfriamiento o cualquier combinación de ellos. Lo frecuente es que se produzca una pérdida en el peso total, pero también es posible que haya una ganancia de peso. La atmósfera puede ser estática o dinámica con un caudal determinado (también se emplean condiciones de presión reducida) y los gases más habituales son N_2 , aire, Ar y CO_2 . Una característica fundamental de la técnica es que sólo permite detectar procesos en los que se produce una variación de peso tales como

descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción, absorción, etc. Esta técnica tiene una gran variedad de aplicaciones que entre otras cabe destacar las siguientes:

- Estudios de composición.
- Estudios de descomposición y estabilidad térmica.
- Determinación de pureza.
- Determinación del contenido de humedad, material volátil, cenizas y carbono fijo.
- Estudios cinéticos.

Las determinaciones se realizaron en presencia de O₂ usando un equipo Rigaku Serie Thermo Plus Evo, usando un programa de temperatura inicial de 30°C con una rampa de temperatura de 10°C/min hasta 900°C.

En ocasiones fue necesario realizar comparaciones con los MWCNT sin las impurezas metálicas provenientes de la síntesis. Si bien dicho tratamiento mediante un tratamiento ácido no logró remover los metales en su totalidad, el método resultó eficiente para remover la mayoría de los metales adsorbidos superficialmente. Para ello, 1gr de la muestra de MWCNT se suspendió en 10 ml de HCl concentrado (12M) y se lo dejó reaccionar por 5 h a temperatura ambiente y bajo agitación constante. Posteriormente se utilizó un sistema de filtrado por vacío y el sólido se lavó repetidas veces con agua destilada para solubilizar los restos de HCl. La muestra se colocó en un vidrio reloj y se lo secó por 18 h a 80°C y así se obtuvo la muestra de HCl-MWCNT.

2.4. Ensayos microbiológicos

Los cultivos de *P. aeruginosa* (PAK wt) se desarrollaron en 100 ml de caldo de cultivo estéril durante 12 hs, a 35°C y con agitación a 250 rpm. A la suspensión de bacterias se le añadió caldo nutritivo estéril fresco para conseguir una concentración de bacterias de 1×10^6 bacterias (D₀=1) y esta fue utilizada en los ensayos posteriores.

2.4.1. Ensayos de inhibición del crecimiento en función de la concentración

Con el objetivo de seleccionar una concentración para realizar los ensayos microbiológicos empleando NP-ZnO y NP-Al₂O₃, en una placa de Petri se sembraron 100 µL de una suspensión de *P. aeruginosa* (D₀=0.5), con el objetivo de generar un césped bacteriano. Se colocaron discos de papel absorbente de 0.5 cm de diámetro, impregnados con soluciones de distinta concentración de NP-ZnO y NP-Al₂O₃ sobre el agar recién inoculado. Se ensayaron concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm de cada muestra de NP-ZnO y NP-Al₂O₃ por separado. La placa se incubó a

31°C por 24 hs. La concentración inhibitoria mínima se determinó como la concentración a la cual comienza a aparecer un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco de papel. En los ensayos empleando estos NMs, se utilizó una concentración levemente inferior a la inhibitoria, realizando un promedio entre la concentración a la cual se observa inhibición y la anterior menos concentrada. Estas concentraciones de 50 ppm fueron utilizadas en los ensayos posteriores con bacterias.

2.4.2. Ensayos en estado planctónico

Para los ensayos empleando MWCNT se colocaron en un tubo de ensayo 10^6 bacterias/mL, 10ppm de MWCNT (prístinos o irradiados) o 50ppm de NP-ZnO o NP-Al₂O₃, caldo de cultivo 1:10 en un volumen final de 10 ml. Según el diseño experimental en algunos ensayos también se agregó al medio la cantidad suficiente de AH para llegar a una concentración final de 10 ppm.

En los ensayos con irradiación, se irradiaron las suspensiones por 1h en celdas de cuarzo en el reactor Rayonet descrito anteriormente utilizando 8 lámparas a 350 nm o 575 nm ubicando la muestra, en el centro del reactor a 15 cm de las lámparas. El número final de bacterias se obtuvo por recuento en placa, sembrando la 1° y 2° dilución de la muestra irradiada y la 3° y la 4° del control en oscuridad. Se realizó el experimento por triplicado.

Los resultados fueron analizados empleando One Way ANOVA (con test de Tuckey incorporado). Los niveles de significancia se detallan como (**) para $p < 0.01$ y como (*) para $p < 0.05$.

2.4.3. Ensayos con biofilms bacterianos

Para evaluar el crecimiento del biofilm, se colocó un sustrato de vidrio en un portaobjetos y se lo puso en contacto con un cultivo de *P. aeruginosa* (DO=1) por una hora, con la superficie paralela a las paredes del vaso para evitar el efecto de la precipitación de agregados de NMs (figura 2.13).

Figura 2.13. Esquema experimental para la formación de biofilms sobre sustratos de vidrio.

Se desprendió el sustrato del portaobjetos y se lo colocó en una placa multipocillo con 1 ml de volumen final con y sin NMs. Se utilizaron MWCNT irradiados y sin irradiar de concentración final 10ppm o NP-ZnO y NP-Al₂O₃ de concentración final 50 ppm. Cuando correspondía, se agregaba la suficiente cantidad de AH para llegar a una concentración final de 10ppm. A cada pocillo se le adicionó 0,1 ml de caldo de cultivo estéril y se incubó la placa por 24 h a 31°C.

Luego del tiempo de incubación, el sustrato colonizado fue colocado en un tubo con 1 ml de PBS estéril y sometido a baño ultrasónico para desprender los microorganismos adheridos. La determinación del número de bacterias final se realizó por conteo en placa de Petri, sembrando la 3°, 4° y 5° dilución. Cada ensayo se realizó por triplicado. Los resultados fueron analizados empleando One Way ANOVA (con test de Tuckey incorporado). Los niveles de significancia se detallan como (**) para $p < 0.01$ y como (*) para $p < 0.05$.

2.4.4. Respirometría de fangos activos

La respirometría como medida de la inhibición de la respiración de fangos activos ha sido utilizado para medir la toxicidad en aguas residuales, tanto para las bacterias heterotróficas como para las nitrificantes⁹. La respirometría de fangos activos es un método directo normalizado para analizar la actividad de los fangos y su toxicidad que se encuentra bien documentado en la literatura científica¹⁰.

En este método, los fangos ejercen en papel de reactivo en el funcionamiento del sistema de análisis respirométrico (figura 2.14). La medida de la respirometría se basa precisamente en el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos que se encuentran en los fangos activos. A este consumo de oxígeno lo designamos como “respiración” y a la velocidad de consumo la llamamos “tasa de respiración” (OUR, *Oxygen Uptake Rate*, que se mide en mgO₂/L.h).

Los propios fangos activos presentan un consumo de oxígeno cuando se lleva a cabo la oxidación del sustrato intracelular en ausencia de sustrato extracelular. A este consumo de oxígeno se le denomina “tasa de respiración endógena” (OUR_{end}). A tiempos relativamente cortos, los fangos también presentan consumo de oxígeno debido a la conversión de la materia orgánica lentamente biodegradable a materia orgánica fácilmente biodegradable. La suma de ambos consumos es la “tasa de respiración básica” (OUR_b) que a efectos prácticos se puede considerar estable.

Tanto la tasa de respiración endógena como la básica son directamente proporcionales a la concentración de sólidos totales en suspensión específica del fango activo. Los fangos provenientes de aguas residuales presentan habitualmente una cantidad de sólidos sedimentables totales que varía entre 2 a 4 g/L y una respiración de tipo básica. Es importante destacar que los fangos activos que se deben utilizar para los ensayos de toxicidad no deben estar preadaptados a las diferentes muestras residuales que van a ser analizadas.

Para el ensayo de la inhibición de la respiración de fangos activos, se introduce 1L de fangos activos no preadaptados (aireados durante un mínimo de 24 horas) en el reactor del equipo. A continuación, se ceba el equipo según el procedimiento que describe el manual de funcionamiento. Cuando se estabiliza la línea de base (OUR_b) en aproximadamente 5-10 min, se provoca en el fango activo una tasa de respiración máxima (OUR_{max}) por medio de un compuesto orgánico fácilmente asimilable por los fangos (1gr de acetato de sodio). El propósito es que, en el momento de la medida de la muestra a analizar, las bacterias se encuentren totalmente activas y establecer una referencia proporcional a la concentración de la biomasa. Esta OUR_{max} es suficientemente estable y su valor es proporcional al 100% de la actividad de la biomasa. Una vez alcanzada la OUR_{max} y estabilizada, se añaden 250 mL de la muestra a analizar. En el caso de que la muestra presente un cierto grado de toxicidad, la tasa de respiración empezara a descender a lo largo del tiempo hasta alcanzar una respiración básica otra vez estable para la condición tóxica (OUR_f).

Para calcular el porcentaje de inhibición (%inh) se utiliza el descenso del consumo de oxígeno de los fangos activos, según la ecuación 2.13:

$$\%inh = (OUR_{max} - OUR_f) \cdot 100 / OUR_{max} \quad (2.13)$$

La dilución de los fangos por la adición de los volúmenes de muestra provoca un descenso en el OUR, que se determina inicialmente en un experimento control (inh_b). Por este motivo, se calcula la inhibición corregida (%inh_c) según la ecuación 2.14:

$$\%inh_c = 100 \cdot (inh - inh_b) / (100 - inh_b) \quad (2.14)$$

Figura 2.14. Respirómetro empleado

El método de toxicidad basado en la inhibición de la respiración de los fangos activos es un método de referencia ya que es simple, tiene una buena reproducibilidad y los microorganismos son representativos de la biomasa que se encuentra en una estación de tratamientos de aguas residuales. Además, el intervalo de tiempo considerado para la detección de la inhibición de los fangos activos utilizados en los procedimientos del test es muy corto (≤ 10 min).

2.5. Referencias

1. Hugh D. Young, R. A. F. *Física Universitaria*. (2018).
2. Suryanarayana, C. & Norton, M. G. X-ray Diffraction: A Practical Approach. *Microsc. Microanal.* **4**, 513–515 (1998).
3. Zhang, S., L., L. & Kumar, A. *Materials characterization techniques*. (CRC press, 2008).
4. Yahia, L. & Mireles, L. K. *X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF SIMS). Characterization of Polymeric Biomaterials* (Elsevier Ltd., 2017). doi:10.1016/b978-0-08-100737-2.00004-2
5. Coyle, J. D. *Introduction to organic photochemistry*. (John Wiley & Sons, 1991).
6. Lamola, A. A. & Ware, W. R. *Creation and Detection of the Excited State*. **1**, (Marcel Dekker, 1971).
7. Pilling, M. J. & Seakins, P. W. *Reaction kinetics*. (Oxford University Press, 1996).
8. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309–319 (1938).
9. Sanz, A. A., Payá, A. A., González, M. & Mártire, D. *Procesos químicos y fotoquímicos ambientalmente benignos para la degradación de efluentes acuosos industriales*. (2009).
10. 1995. Spanjers. respirometry as a tool for rapid characterization of waste water and activated sludge.pdf.

**Capítulo 3:
Nanopartículas de
óxidos de metales:
caracterización e
interacción con medios
acuosos con y sin
actividad biológica**

Esquemas de procedimientos experimentales

En los siguientes esquemas se sintetizan los procedimientos experimentales discutidos en el capítulo 2 para el caso de las NP-ZnO y NP-Al₂O₃.

Esquema 1: símbolos utilizados en los esquemas 2-4.

Esquema 2. Ensayos realizados en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación UV empleando NP-ZnO y NP-Al₂O₃.

Esquema 3. Ensayos realizados en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación visible empleando NP-ZnO y NP-Al₂O₃.

Esquema 4. Ensayos de formación de biofilm en cultivos de *P. aeruginosa* empleando NP-ZnO y NP-Al₂O₃.

*“A veces hay que dejar de pensar, cómo solucionar una herida.
A veces hay que molestarse y madrugar, para empezar el día,
sentir, volar, pasar desapercibida”*

Capítulo 3. Nanopartículas de óxidos de metales: caracterización e interacción con medios acuosos con y sin actividad biológica

3.1. Introducción

Como mencionamos anteriormente en la introducción del presente trabajo de tesis, las nanopartículas de óxidos de metales (NP-OMe) son de gran interés en la química de materiales debido a las múltiples aplicaciones tecnológicas de estos componentes en medicina, tecnología de la información, catálisis, almacenamiento de energía y censado, entre otros. Los elementos metálicos poseen la capacidad de producir una gran diversidad de compuestos oxidados de diferentes estructuras electrónicas capaces de exhibir comportamiento metálico, semiconductor o aislante. Hoy día, las NP-OMe son utilizadas en la fabricación de circuitos microelectrónicos, sensores, dispositivos piezoeléctricos, recubrimientos para la pasivación de superficies contra la corrosión y catalizadores. Debido a su confinamiento en la nanoescala, las NP-OMe presentan propiedades fisicoquímicas únicas relacionadas con su razón superficie-tamaño. A medida que el tamaño de las NP-OMe decrece, aumenta el número de átomos en la superficie respecto de la fase volumétrica y con ello los fenómenos químicos y físicos superficiales característicos de los NMs.

En el presente capítulo se investigarán dos tipos de NP-OMe producidas a gran escala: nanopartículas de óxido de zinc (NP-ZnO) y nanopartículas de óxido de aluminio (NP-Al₂O₃) que serán analizadas separadamente.

3.2. Nanopartículas de Óxido de Zinc (NP-ZnO)

Desde el descubrimiento de la foto-electrólisis del agua usando electrodos de TiO₂¹, las investigaciones dedicadas al desarrollo de materiales fotocatalíticos cobraron importancia, particularmente en relación con su utilización en remediación medioambiental empleando radiación solar como fuente de energía.

Para entender mejor por qué estos materiales cobran relevancia, es preciso aclarar algunos términos. Los semiconductores tienen una banda llena (banda de valencia) que está separada de la banda de conducción (en el estado fundamental vacía) por una diferencia de energía (band gap) equivalente a la diferencia de energía entre los orbitales de frontera HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) y LUMO (Lowest Occupied Molecular Orbital) para pequeñas moléculas. El band gap para los semiconductores está entre 0,5 y 3,5 eV y es uno de los parámetros más críticos que definen las propiedades ópticas de los mismos.

Cualquier semiconductor inmerso en un solvente (generalmente agua) e iluminado con fotones con una energía mayor al band gap podría funcionar como un fotocatalizador si sobre su superficie tienen lugar reacciones como por ejemplo la oxidación de componentes orgánicos por el oxígeno molecular. Actualmente, la mayoría de los estudios sobre reacciones fotocatalíticas están enfocados en sistemas nanoparticulados, debido a la extensa área superficial en comparación con su análogo en fase masiva y, por consiguiente mayor eficiencia en la utilización de la energía lumínica, llamada eficiencia fotónica.

El Óxido de Zinc (ZnO) tiene un band gap de 3.37eV (en similitud con el TiO₂) por lo que se espera que exhiba un comportamiento similar. Sin embargo, el principal inconveniente del ZnO nanoparticulado en ambientes acuosos es su inestabilidad química²:

El intervalo de pH en el cual el ZnO es estable es bastante limitado. Se ha demostrado que el ZnO tiene efecto fotocatalítico con vías oxidativas similares al TiO₂, incluyendo la formación de radicales •OH así como también reacciones de oxidación directa por huecos fotogenerados. Debido a su baja fotoestabilidad, el ZnO no proliferó como un material fotocatalítico de preferencia, ya que bajo prolongados tiempos de irradiación, sufre descomposición atribuida principalmente a la oxidación desde la fase sólida a la fase acuosa por los huecos generados según³:

Aunque la aplicación en fotocatálisis no es tan exitosa como para el TiO₂, el ZnO es potencialmente atractivo en otros campos, incluyendo sensores⁴, optoelectrónica⁵ y unidades emisoras de campo^{6,7}.

En la actualidad, el ZnO es ampliamente utilizado en la industria del caucho, cerámica, lentes ópticos, pintura y plásticos, cosméticos, productos de higiene personal y pantallas solares⁸. También es agregado a la comida de animales y fertilizantes como un elemento traza esencial. El hecho de que sea un material mesoporoso permitió la aplicación en procesos de adsorción para la remoción de contaminantes como por ejemplo el 4-Cloro-2-nitrofenol y el Cr(VI)⁹.

Si bien las propiedades adsorbentes sumadas a las propiedades fotocatalíticas le confieren a las NP-ZnO un uso potencial en el tratamiento de contaminantes, estos materiales podrían tener consecuencias irreversibles una vez inmersas en el ecosistema a causa de las mismas características que los hacen especiales. Existen varios estudios acerca de las modificaciones de este tipo de NMs inmersos en sistemas naturales, afectando los estados de aglomeración en solución, debido a la adsorción de material orgánico disuelto (MOD)¹⁰. Todas estas modificaciones

generadas por el entorno ambiental podrían afectar el equilibrio del ecosistema al interactuar con la microbiota bacteriana. En el presente apartado se analizarán las modificaciones que las muestras de NP-ZnO sufren una vez inmersas en una suspensión de composición salina similar a la de un acuífero con y sin MOD. También se investigará el efecto sobre el microorganismo ambiental *P. aeruginosa*, en distintas formas de vida: en su estado planctónico, de libre flotación y formando biofilms.

Con el objetivo de estudiar NP-ZnO de origen comercial, se emplearon para los estudios pertinentes nanopartículas provenientes de la empresa GetNanoMaterials, con una pureza del 99.8% y un tamaño que oscila entre los 20 y 30 nm.

3.2.1. Caracterización

3.2.1.1. Espectroscopía UV-Vis

En la figura 3.1 se presenta el espectro de atenuancia de una suspensión acuosa de NP-ZnO (50ppm). El espectro presenta una banda de absorción con un máximo a 370 nm debido al confinamiento cuántico ocasionado por el efecto del tamaño, en concordancia con la literatura¹¹.

Figura 3.1. Espectro de atenuancia de una suspensión acuosa de NP-ZnO 50 ppm.

3.2.1.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro de FT-IR presenta picos bien definidos a lo largo de todo el registro de números de onda analizado. Puede observarse una banda ancha entre los 3000 y 3500 cm^{-1} , correspondiente al agua de hidratación presente en la muestra. Los picos a 1511 y 1376 cm^{-1} corresponden a vibraciones simétricas y asimétricas del enlace C-O, provenientes de los precursores de la síntesis (generalmente AcZn)¹². Los picos entre 670 y 844 cm^{-1} pueden ser atribuidos a las vibraciones dentro y fuera del plano del CO_3^{2-} , también proveniente de la descomposición de los precursores de la síntesis¹³. En el caso del pico a 704 cm^{-1} esta contribución también puede atribuirse a la molécula dimetil-zinc ($\text{Zn}(\text{CH}_3)_2$) que podría ser un producto secundario de la síntesis¹⁴.

Figura 3.2. Espectroscopía FTIR de la muestra de NP-ZnO.

3.2.1.3. Difracción de rayos X

En la figura 3.3. puede observarse el patrón de difracción de rayos X. La presencia de picos finos indica que el material está compuesto por partículas en escala nanométrica con fases cristalinas. Los picos correspondientes a 2θ : 31.84°, 34.52°, 36.33°, 47.63°, 56.71°, 62.96°, 68.13° y 69.18° concuerdan perfectamente con la fase wurzita característica del ZnO ¹⁵ con constantes $a=b=0.324\text{nm}$ y $c=0.521\text{ nm}$.

Figura 3.3. Patrón de difracción de Rayos X de una muestra en polvo de NP-ZnO.

3.2.2. Interacción de NP-ZnO con medio acuoso salino y MOD

3.2.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

La determinación de tamaños por la medida de dispersión dinámica de luz (DLS) permite determinar la capacidad de aglomeración de los NMs suspendidos en distintos medios. Resulta interesante evaluar los cambios que ocurren cuando las NP-ZnO se encuentran en una solución con fuerza iónica similar a la de los efluentes naturales (en adelante MIS (*matriz inorgánica simulada*)) así también como en presencia de MOD. A tal fin se realizaron las determinaciones de la muestra de NP-ZnO en agua destilada, en MIS y en MIS con 10 ppm de ácidos húmicos (AH). La composición de la MIS se detalla en la sección “Materiales y métodos experimentales” correspondiente al capítulo 2 de la presente tesis. En la tabla 3.1 se muestran los valores de tamaño obtenidos para una solución 100 ppm de NP-ZnO.

Muestra	Tamaño/nm	Desviación estándar/nm
NP-ZnO en H₂O	735	54
NP-ZnO en MIS	973	125
NP-ZnO en 10 ppm de AH	245	24
	37	2

Tabla 3.1. Distribución de tamaños de las NP-ZnO en distintos medios obtenidos por DLS.

Puede observarse que las NP-ZnO en suspensión acuosa se encuentran formando aglomerados de un tamaño considerable con un máximo en 735 ± 54 nm, que corresponde a 40 veces del tamaño de una nanopartícula individual declarado por la empresa que comercializa el producto. Estos aglomerados muestran un aumento de tamaño cuando se suspenden las NP-ZnO en MIS, mostrando el comportamiento previamente descrito para soluciones con fuerza iónica elevada¹⁶.

A pesar de la elevada fuerza iónica, en presencia de AH en suspensión, se forman aglomerados mucho más pequeños e incluso se observan tamaños correspondientes a NP-ZnO no aglomeradas. Esto podría deberse principalmente a la adsorción superficial de las moléculas de AH en las NP-ZnO, lo que generaría un efecto surfactante manteniendo las partículas en suspensión.

3.2.2.2. Termogravimetría analítica (TGA)

Para evidenciar la interacción de los AH y las NP-ZnO se recurrió a la termogravimetría analítica. Se utilizó atmósfera inerte de N₂, entre 100 y 650°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/min. La muestra se preparó colocando 50,0 mg de NP-ZnO, 100,0 mg de AH en un volumen final de 50,00 ml. Seguidamente, se dejó reposar 18h con el objetivo de alcanzar el equilibrio de adsorción y posteriormente se centrifugó a 7000 g por 10 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado fue analizado por TGA. Como control se utilizaron AH y NP-ZnO por separado.

Con el fin de obtener información que servirá para el posterior análisis AH-NP, es importante realizar un estudio termogravimétrico preliminar de los AH empleados. Los AH comerciales (Sigma Aldrich, Humic acid sodium salt N° Catálogo: H26752) utilizados en este trabajo son una mezcla de AH, sulfato de amonio y ácido adípico, con residuos de polisacáridos, proteínas, y agentes quelantes de iones metálicos. Dado el alto contenido de oxígeno en los AH, los productos de oxidación podrían formarse también en condiciones anaeróbicas (es decir, en ausencia de una atmósfera oxidante). En la literatura se encuentran en detalle los procesos que se llevan a cabo cuando los AH son sometidos a tratamiento térmico¹⁷. Generalmente, las características estructurales básicas de los AH se mantienen intactas hasta 250°C, por lo que la pérdida de agua a temperaturas menores debe ser atribuida a la liberación de agua contenida

en el material¹⁷. Estudios anteriores, asignan la pérdida de masa observada a 110 y 210°C a la liberación de las moléculas de agua física y químicamente adsorbida, respectivamente¹⁸. La descomposición parcial de los grupos alifáticos y la evaporación de pequeñas moléculas orgánicas ocurre a 210°C^{18,19}. Por otra parte, la descarboxilación de los AH y la descomposición total de las estructuras alifáticas está reportada para temperaturas alrededor de 300°C^{20,21}. Además, la pérdida de masa hasta los 300°C esta atribuida al deterioro de los grupos alcohólicos, fenólicos y amino^{22,18}. En el rango entre los 300 a 500 °C tiene lugar la descomposición de las estructuras aromáticas, mientras que para valores mayores a 700°C comienzan los procesos de condensación²¹. En la figura 3.4. puede observarse el porcentaje descenso de masa de la muestra de AH comerciales, junto con el análisis de la primer derivada. La muestra de AH comerciales se comporta de acuerdo a lo previamente publicado¹⁷, con un pico en la región de 100-200°C atribuible a la pérdida de agua, otro cercano a los 300°C correspondiente a la descomposición de las moléculas alifáticas y otro pico entre los 400 y 500 °C atribuible a la oxidación de moléculas aromáticas. Luego de los 700°C puede verse otro cambio en la derivada, generada por los procesos de condensación.

Figura 3.4. Análisis TGA de una muestra de AH comerciales (Sigma Aldrich, curva azul) y su respectiva derivada dm/dT (curva bordo punteada).

El análisis termogravimétrico de las NP-ZnO en ausencia y presencia de AH se detalla en la figura 3.5. en el rango entre 100 y 600°C, ya que es la región de nuestro interés. La muestra de NP-ZnO presenta un pequeño (menor al 6%) descenso relativo en la masa, lo que es esperable ya que se trata de una muestra oxidada. El cambio más significativo ocurre a los 220°C, en donde el descenso de masa representa el 5% del total. Este comportamiento no es propio del nanomaterial y si bien puede atribuirse a

la liberación de moléculas de agua, también coincide con la temperatura de descomposición del Acetato de Zinc (AcZn) anhidro, el precursor más utilizado en la industria en la síntesis de NP-ZnO por descomposición termal²³. Los estudios de FT-IR también soportan esta afirmación. Por otra parte, en el análisis termogravimétrico de las NP-ZnO en presencia de AH, la curva de descenso de masa es considerablemente distinta y puede observarse un cambio en la derivada a temperaturas entre 300 y 400°C, indicando la adsorción preferencial de la porción alifática de los AH por la muestra.

Figura 3.5. Análisis TGA de la muestra de NP-ZnO en ausencia (curva bordo) y en presencia (curva naranja) de AH. La figura inferior corresponde a la pérdida de masa y el análisis de la primer derivada se detalla en el grafico superior.

Es interesante destacar que luego del análisis termogravimétrico ambas muestras (en presencia y ausencia de AH) convergen al mismo valor de descenso de masa. Según estudios anteriores²⁴, el pico observado en la segunda derivada corresponde a la temperatura de descomposición del AcZn, ahora soluble en solución, con una temperatura de descomposición de 250°C. Estos resultados sugieren que existe un intercambio entre las

moléculas adsorbidas en la muestra de NP-ZnO y los AH, ya que además de observarse el mismo descenso de masa en ambas muestras, en la segunda derivada puede notarse un pico correspondiente a la temperatura de descomposición del AcZn, ahora soluble en solución²⁴.

3.2.2.3. Espectroscopía IR por atenuancia total reflectada (ATR)

Con el objetivo de observar con más detalle los mecanismos de adsorción de AH en la muestra de NP-ZnO, se analizaron los espectros ATR de la muestra resultante de la centrifugación de la solución de las NP-ZnO que tomó contacto con AH. Adicionalmente se obtuvieron los espectros de la muestra de NP-ZnO y AH puras como control (figura 3.6).

Figura 3.6. Espectros ATR de una muestra de AH comerciales (Curva azul), NP-ZnO (Curva amarilla) y el sólido resultante de la centrifugación de una muestra de NP-ZnO y AH.

El espectro ATR de los AH comerciales coincide con la literatura²⁵ y pueden observarse los picos característicos entre 3400-3000 cm⁻¹ perteneciente al agua de hidratación. Los picos presentes 2917 y 2849cm⁻¹ pertenecen a las vibraciones C-H de los grupos -CH₂ de moléculas alifáticas mientras que las vibraciones en la zona de 1620 cm⁻¹ están relacionadas con las vibraciones C=C de los anillos aromáticos presentes en la muestra. Los picos presentes entre 1400 y 1280 cm⁻¹ son atribuibles a los grupos carboxilatos y las deformaciones de los anillos fenólicos. La banda presente a 1090 cm⁻¹ está relacionada con los ésteres de fenoles

mientras que la banda presente a 1039 cm^{-1} corresponde al grupo -OH en un entorno alifático²⁶. Por último, la banda a 940 cm^{-1} puede ser asignada a las deformaciones de grupos C-OH y las bandas entre $700\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ a los modos vibracionales del grupo carboxilato -O-C=O .

La muestra de NP-ZnO que tomó contacto con AH, sugiere la adsorción de moléculas alifáticas con grupos -OH, ya que se aprecia el pico a 1039 cm^{-1} . Puede observarse también un desplazamiento de los máximos de los picos a 1565 y 1376 cm^{-1} hacia 1510 y 1381 cm^{-1} respectivamente, sugiriendo una interacción de los carboxilatos presentes en las moléculas de AH con la superficie de las NP-ZnO¹⁰.

3.2.2.4. Ensayos de adsorción de moléculas orgánicas y liberación de iones Zn

La relación entre la absorbancia a 465nm y 665nm ($E4/6$) está directamente relacionada con el grado de condensación de los residuos aromáticos de los AH²⁷. Valores altos de $E4/6$ reflejan la presencia de elevadas proporciones de estructuras alifáticas y bajas proporciones de estructuras aromáticas condensadas, siendo esta relación inversamente proporcional al grado de aromaticidad presente en la muestra. Durante el desarrollo del ensayo se mantuvo una concentración constante de NP-ZnO (50ppm) y se colocaron distintas concentraciones de AH. La muestra se dejó reposar por 18 horas para que se alcance el equilibrio de adsorción y se centrifugó la mezcla a 7000 g por 10 minutos para estudiar la relación $E4/6$ en el sobrenadante. Los resultados se encuentran plasmados en la figura 3.7, en donde se pueden observar los puntos correspondientes a los AH puros y al sobrenadante remanente de la centrifugación de la suspensión de NP-ZnO y AH.

Figura 3.7. E4/6 vs concentración de AH para una muestra de AH puros (puntos verdes) y para el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación de una suspensión de NP-ZnO 50ppm y distintas concentraciones de AH (puntos rojos).

Los resultados deben ser interpretados teniendo en cuenta estudios anteriores²⁸ donde se observa el espectro de aquellas moléculas pertenecientes a AH que no se adsorbieron en la muestra de NP-ZnO. La forma de la curva de la figura 3.7 sugiere que, en una primera instancia, la porción alifática es la que se adsorbe preferencialmente sobre la superficie de NP-ZnO, quedando remanente la porción aromática en el sobrenadante. Este resultado es muy importante cuando se desean evaluar los efectos ambientales, porque se podría ver afectada la estabilidad en solución de este NM, con la formación de aglomerados de distinto tamaño, la viabilidad de los microorganismos por el cambio de composición del medio, etc.

Como un análisis adicional, se realizaron ensayos de cuantificación del Zn liberado por las NP-ZnO utilizando espectroscopía ICP-MS a partir de una muestra de NP-ZnO con y sin AH. Para ello se prepararon suspensiones 200 ppm de NP-ZnO en agua milliQ y en una solución conteniendo 40 ppm de AH, para respetar la proporción de NP-ZnO/AH que se utilizó para realizar todos los ensayos descriptos en el presente capítulo. Una vez obtenida la suspensión, la muestra se centrifugó 10 min

a 7000g luego de 18h en reposo, con el objetivo de alcanzar el equilibrio de adsorción y se determinó la concentración de Zn en el sobrenadante. Cabe destacar que, para la muestra de NP-ZnO en agua, se detectó una cantidad de Zn de 0.024 ppm, mientras que para la muestra dispersa en presencia de AH la concentración final fue de 2.895 ppm revelando el gran efecto de los AH sobre la solubilidad de Zn de las NP.

El sobrenadante de la muestra conteniendo 50 ppm de NP-ZnO y 10 ppm de AH también se analizó empleando espectroscopía FT-IR, secando la solución a 70° en KBr, con el posterior armado de una pastilla. Los resultados se pueden observar en la figura 3.8 en donde se grafica el espectro obtenido para: i) el sobrenadante de NP-ZnO y AH luego de la centrifugación (curva verde), ii) una solución de AH sin el aditivo de NP-ZnO (curva roja) y iii) una solución conformada de la sal ZnCl_2 y AH. Puede notarse la presencia de una banda ancha en la zona de $3000\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ en la muestra de AH y de Zn^{+2} con AH atribuible a las vibraciones -OH de los grupos funcionales de las moléculas presentes en los AH. En la muestra conteniendo NP-ZnO y AH, puede observarse que en dicha zona la banda resultante es mucho más angosta, con dos picos a 3470 y 3415 cm^{-1} , relacionados con las vibraciones del grupo -OH o H_2O en la formación de complejos coordinados covalentemente²⁹. De hecho, podemos notar un corrimiento en el pico atribuible al grupo COO^- de 1586 cm^{-1} a 1637 y 1618 cm^{-1} en ambas muestras conteniendo Zn^{+2} y AH. Estudios anteriores plantean que las bandas correspondientes a las vibraciones de los carboxilatos en el rango de $1580\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ corresponde a las vibraciones del grupo libre formando un anión, mientras que las absorciones entre los $1600\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ corresponden a transiciones entre covalentes y iónicas. Por último, las vibraciones del carboxilato observadas entre $1615\text{-}1630\text{ cm}^{-1}$ corresponden a la formación de enlaces con carácter covalente. También puede notarse que la contribución observable a 1381 cm^{-1} relacionada a la flexión del enlace C-H presente en el espectro NP-ZnO y AH y el de AH es muy leve en el caso de la solución ZnCl_2/AH .

Estos resultados junto con las medidas de concentración de Zn en el sobrenadante mostraron, por un lado, un aumento de la concentración de este metal en solución por la presencia de AH. Además, sustentan, no solo la formación de complejos entre el Zn^{+2} y los AH, sino también brindan información del estado del grupo carboxilato del AH en la esfera de coordinación del complejo³⁰.

Figura 3.8. Espectro FT-IR de soluciones de: sobrenadante de la centrifugación de NP-ZnO y AH (curva verde), solución de $ZnCl_2$ y AH (curva azul) y solución de AH (curva Roja).

3.2.3. Ensayos microbiológicos

Se evaluó el efecto que tiene la radiación lumínica en cultivos de *P. aeruginosa* irradiando con lámparas de emisión monocromática en la región visible del espectro electromagnético (575 ± 5 nm) y en la región ultravioleta (350 ± 5 nm) según el protocolo detallado en el capítulo 2. Los ensayos se realizaron con y sin presencia de AH, para dilucidar el efecto que la MOD tiene en el medio cuando se encuentran presentes las NP-ZnO según detallado en el capítulo 2. Al principio de este capítulo pueden observarse esquemas que resumen los procedimientos experimentales llevado a cabo para realizar las siguientes experiencias.

Con el fin de elegir la concentración de NP-ZnO empleada se evaluó la inhibición del crecimiento bacteriano mediante el ensayo de halo de inhibición. Para ello se utilizaron discos impregnados de soluciones de distintas concentraciones de NP-ZnO. Pudo comprobarse que para concentraciones mayores a 60 ppm de NP-ZnO se formaba un halo inhibitorio, mientras que para concentraciones menores no se observan

cambios. Por ese motivo se eligió 50 ppm como una concentración adecuada para realizar los ensayos.

3.2.3.1. Ensayos realizados sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico y utilizando fuentes de irradiación visible

Los ensayos se realizaron según el esquema 3 mostrado al inicio del presente capítulo y descrito en materiales y métodos experimentales. Los recuentos bacterianos en presencia de irradiación visible se presentan en la figura 3.9. En ausencia de AH, se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre la muestra conteniendo 50ppm de NP-ZnO y el control en oscuridad. Este resultado es coincidente con la bibliografía, donde se sugiere que las NP-ZnO actúan como “*quorum quencher*”, interrumpiendo la comunicación entre bacterias y regulando negativamente genes vitales en *P. aeruginosa*³¹. También hay otros mecanismos por los cuales las NP-ZnO podrían ser tóxicas como la generación de especies reactivas (H_2O_2 principalmente) generadas en oscuridad por la presencia de vacancias de oxígeno (V_O)³² y la liberación de iones Zn^{+2} ³³. Utilizando el kit comercial para la determinación de H_2O_2 se midieron las concentraciones de agua oxigenada de una muestra 100 ppm de NP-ZnO recién preparada y luego de 28 h en oscuridad. Para ninguna de las muestras se detectó una cantidad de H_2O_2 apreciable, descartando que el mecanismo de toxicidad sea por esta vía. En concordancia, se ha reportado que para cultivos de *S. aureus* el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) es poco significativo³⁴. El ensayo de medición de H_2O_2 , sumado a los resultados de FT-IR y TGA (que indican la permuta de moléculas de AH por las moléculas adsorbidas superficialmente provenientes de la síntesis) sugieren que el efecto tóxico de estos NMs para *P. aeruginosa* puede deberse a diferentes mecanismos, ya sea por la liberación de iones Zn^{+2} al medio circundante o por la inhibición de la comunicación entre bacterias (*quorum quenching*) generada por la presencia de las NP-ZnO³⁵. Recientemente se reportaron nuevas formas de interpretar el mecanismo antimicrobiano de las NP-ZnO³⁶ en cultivos de *S. aureus*. Los autores concluyen mediante análisis de la expresión genética de dichas bacterias que las NP-ZnO pueden tener influencia sobre el metabolismo anaeróbico de los carbohidratos y la bioenergía asociada.

Cabe destacar que los efectos citotóxicos se revierten cuando en el medio se encuentran AH, y no es posible observar diferencias apreciables entre todas las muestras ensayadas y el control (figura 3.9, derecha). Si observamos los espectros FT-IR de la muestra de NP-ZnO en presencia de AH, puede notarse la presencia de picos característicos del AH sugiriendo que la superficie del NM se encuentra recubierta por moléculas de AH adsorbidas (*vide supra*). Estos resultados sugieren una pasivación de la superficie de las NP-ZnO por la adsorción de AH, generando inhibición de

los mecanismos de *quorum quenching* y por lo tanto reducción de la toxicidad.

Por otra parte, si bien en presencia de AH la cantidad de Zn en solución aumenta, este se encontraría formando complejos de coordinación con las moléculas de los AH, dificultando el acceso al interior celular y, en consecuencia, sus efectos tóxicos. Estos resultados aportan información acerca del rol de los AH como pasivante de las NP-ZnO y complejante de iones metálicos, modificando las condiciones del entorno y disminuyendo el impacto sobre los microorganismos planctónicos.

Figura 3.9. Efectos de NP-ZnO en cultivos *P. aeruginosa* en estado planctónico, en oscuridad y bajo irradiación a 575 nm en presencia y ausencia de AH.

Es interesante el hecho de que la presencia de luz visible logra revertir el efecto citotóxico observado para la muestra de NP-ZnO en oscuridad. Estos resultados son consistentes con lo encontrado en la literatura, en donde se plantea que la mayoría de las cepas de *Pseudomonas* poseen una secuencia conservada que codifica la proteína PAS, una cromoproteína capaz de activarse con luz visible (con máximo de absorción en la zona del espectro electromagnético del rojo entre los 600 y 650 nm) desencadenando respuestas metabólicas tendientes a aumentar la movilidad, la virulencia³⁷ y la utilización de fuente de carbono³⁸, mejorando la respuesta adaptativa frente a las condiciones desfavorables del ambiente y permitiendo revertir el efecto tóxico³⁷.

3.2.3.2. Ensayos realizados sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico irradiadas con luz ultravioleta

La figura 3.10 presenta los resultados obtenidos para los cultivos de *P. aeruginosa* en presencia de radiación UV. Se puede apreciar una diferencia significativa ($p < 0.01$) para la muestra conteniendo NP-ZnO en relación con

el control en oscuridad, que se revierte en presencia de AH. En el caso de la radiación UV, a diferencia de lo observado para la luz visible, también se pueden observar diferencias significativas ($p < 0.01$) entre todas las condiciones bajo irradiación en comparación con el control en oscuridad. La luz ultravioleta inactiva a los microorganismos formando dímeros de pirimidina en el RNA y DNA, lo que puede interferir en la transcripción y replicación³⁹, generando daños irreversibles en la célula.

Figura 3.10 Efectos de NP-ZnO en cultivos *P. aeruginosa* en estado planctónico, en oscuridad y bajo irradiación a 350 nm en presencia y ausencia de AH.

3.2.3.3. Ensayos realizados sobre *P. aeruginosa* formando biofilms

En un entorno natural, las bacterias pueden estar tanto en estado planctónico como formando biopelículas. Para que una superficie sea colonizada es necesario que se encuentre en un lugar accesible para las bacterias con condiciones que permitan la adhesión. Si pensamos en un sistema ambiental, las superficies más colonizadas serán generalmente aquellas que se encuentren en el fondo de acuíferos o lugares que no se encuentren sometidos a daños generados por la luz, temperatura, o incluso mecánicos. Considerando la atenuación de los efectos de la radiación en las zonas de crecimiento de los biofilms en los acuíferos, los ensayos de viabilidad del biofilm se realizaron en oscuridad exclusivamente. El protocolo experimental está detallado en el capítulo 2 y se sintetizan en el esquema 4 del inicio del presente capítulo. En la figura 3.11 pueden observarse los recuentos celulares.

Puede observarse en la figura 3.11 que, para la muestra conteniendo NP-ZnO y AH, el número de bacterias viables es significativamente mayor ($p < 0.01$) que el de los controles. También es significativa ($p < 0.05$) la diferencia entre la muestra que contiene NP-ZnO en presencia y ausencia de AH. Estos resultados coinciden con el aumento de Zn en solución por la presencia de los AH. Tal como se dijo previamente, se ha reportado que los

grupos carboxilos y alcohólicos de los AH pueden formar complejos con metales multivalentes⁴⁰, lo que generaría mayor biodisponibilidad del Zn para las bacterias. De hecho, estudios realizados en *P. aeruginosa* revelan la existencia de un regulador transcripcional (CzcR)⁴¹ encargado de modular la respuesta contra antibióticos y estimular el “*quorum sensing*”, proceso que permite controlar procesos específicos, tales como formación de biopelículas, expresión de factores de virulencia, producción de metabolitos secundarios y mecanismos de resistencia al estrés³⁵. En particular, está demostrado que altas concentraciones de Zn^{+2} modelan positivamente este regulador transcripcional, aumentando la proliferación del biofilm⁴² en varias cepas bacterianas, incluyendo *P. aeruginosa*.

Figura 3.11. Recuentos bacterianos (N/N0) en biofilm bacterianos de *P. aeruginosa* cultivados en distintas condiciones.

3.2.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la figura 3.12. pueden observarse las microfotografías SEM de los biofilms tempranos de *P. aeruginosa* cultivados en distintas condiciones. En dicha figura pueden apreciarse magnificaciones de 10.000 X a la izquierda y 50.000 X a la derecha. También se reporta para cada muestra un histograma que brinda información sobre la distribución de las longitudes de las bacterias en cada muestra. El control (paneles 1a y 1b),

muestra una superficie poco colonizada, con pocos acúmulos bacterianos y sin formación de un biofilm tridimensional. Para magnificaciones mayores pueden observarse con más detalle las células, cuya longitud promedio es $1,4\pm0,3\mu\text{m}$ y la presencia de exopolisacárido (EPS) ubicado debajo y entre de las mismas.

Figura 3.12. Microfotografías SEM de biofilm de *P. aeruginosa*. Control (1a y 1b), cultivadas en presencia de 50ppm de NP-ZnO (2a y 2b) y en presencia de 50ppm de NP-ZnO Y 10ppm de AH (3a y 3b). Se presenta a la izquierda de cada grafico un histograma de la distribución de tamaños de las bacterias en cada muestra.

En concordancia con los recuentos celulares, puede apreciarse que en la muestra del biofilm crecido en presencia de 50ppm de NP-ZnO con AH (paneles 3a y 3b) y sin AH (paneles 2a y 2b) una densidad celular mayor, formando un biofilm tridimensional. Comparando los histogramas, puede apreciarse que si bien la longitud promedio de las bacterias es similar al del control (longitud promedio= $1.3\pm0.2\mu\text{m}$) en presencia de NP-ZnO con y sin AH, la distribución de tamaño de las bacterias varía según la muestra siendo el aspecto del EPS es más granulado en presencia de las NP. En el

caso del control el 88% de las células miden entre 1.0 y 1.8 μm , mientras que en presencia de las NP-ZnO tanto en presencia como ausencia de AH, sólo el 65% alcanzaba ese rango de tamaños.

Figura 3.13. Diámetro medio de las bacterias en el biofilm en las distintas condiciones ensayadas.

3.2.4. Conclusiones

Las suspensiones de NP-ZnO muestran diferencias considerables en sus propiedades dependiendo de la composición del medio donde se encuentran inmersas. Si bien se observan aglomerados de mayor tamaño debido al aumento de la fuerza iónica en la MIS, la presencia de AH parece estabilizar la generación de aglomerados de menor volumen mediante la adsorción superficial de moléculas orgánicas provenientes de los AH. De hecho, los ensayos de TGA y FT-IR revelan la adsorción preferencial de la parte aromática de los AH sobre las NP-ZnO con formación de complejos con el Zn^{+2} .

Las NP-ZnO mostraron un efecto tóxico en oscuridad sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico, pero no se encontraron diferencias respecto del control en el número final de bacterias bajo irradiación. La estimulación metabólica generada por la radiación visible podría atenuar el efecto nocivo de las NP-ZnO observado en oscuridad.

Cabe destacar que la presencia de AH logra revertir el efecto tóxico en oscuridad. Los resultados indicarían que el mecanismo de toxicidad más plausible es causado por la inhibición de la comunicación (*quorum quenching*) entre bacterias en presencia de NP-ZnO. Los ensayos de FT-IR y adsorción UV/Vis (E4/6) sugieren la pasivación de la superficie de la NP, por la porción alifática presente en los AH conduciendo a la reducción de la liberación de iones Zn^{2+} y a su complejación. Por otra parte, la radiación

UV causó un importante descenso en el número de microorganismos ya que provoca daños irreversibles en las bacterias que impiden su replicación.

Sorprendentemente, en el caso de los biofilms se observa un importante incremento en el número final de bacterias para las muestras conteniendo NP-ZnO y AH. Estos ensayos coinciden con el aumento relativo de la concentración de Zn en solución debido a la presencia de los AH, aumentando la biodisponibilidad del Zn que estimula el *quorum sensing* y con ello la proliferación del biofilm. Las micrografías SEM concuerdan con estos resultados y muestran un biofilm más desarrollado con estructura tridimensional y bacterias de menor longitud en promedio, rodeado de EPS no homogéneo. Además de la estimulación del *quorum sensing*, en la literatura también se plantea la inactivación de la enzima fosfodiesterasa por la presencia de Zn^{+2} , encargada de disminuir la concentración de c-di-GMP, un segundo mensajero encargado de modular la respuesta genética en la formación del biofilm⁴³.

Todos los experimentos anteriores sugieren que el rol de la MOD en el medio es de suma importancia para evaluar el impacto ambiental de las NP-ZnO, ya que cambia marcadamente las propiedades de la muestra logrando modificaciones en el crecimiento y proliferación de *P. aeruginosa*.

3.3. Nanopartículas de óxido de aluminio (NP- Al_2O_3)

Como mencionamos anteriormente en la introducción de la presente tesis, las nanopartículas de óxido de aluminio (NP- Al_2O_3), presentan propiedades químicas muy particulares que hace que sean uno de los nanomateriales con mayor índice de ventas en países desarrollados. Las NP- Al_2O_3 tienen aplicaciones importantes en la industria de la cerámica, como material antiabrasivo, en catálisis heterogénea, como absorbente, como componente biomateriales y también para reforzar la matriz de composites de metales⁴⁴.

Si bien la literatura plantea que recién a muy altas concentraciones (>1000 ppm) estos materiales comienzan a presentar toxicidad en sistemas vivos⁴⁵, existe poca información sobre el impacto en sistemas ambientales con y sin presencia de AH y microorganismos. Hay estudios que afirman que una vez inmersas en una matriz medioambiental, las NP- Al_2O_3 exhiben propiedades antimicrobianas en aislados de bacterias⁴⁶. Estudiar las modificaciones que el medio ambiente realiza sobre este NM y viceversa, dilucidando el efecto sobre la microbiota bacteriana en distintas formas de vida (planctónicas/biofilm), es el punto de partida para obtener información global de lo que sucede en el entorno natural.

En el presente trabajo de tesis, se utilizaron NP- Al_2O_3 comerciales de valor medio 150 ± 30 nm con 99.97% de pureza proveniente de la empresa GetNanoMaterials.

3.3.1 Caracterización

3.3.1.1 Espectroscopía UV-Vis

En la figura 3.14 puede observarse el espectro de atenuancia de las NP- Al_2O_3 entre 200 y 800 nm. Puede notarse que no hay absorción en el rango de longitudes de onda ensayado.

Figura 3.14. Espectro de atenuancia de una muestra de NP- Al_2O_3 .

3.3.1.2. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Las bandas de absorción de las vibraciones Al-O en la región del infrarrojo comienzan a aparecer para números de onda bajos, entre 500 y 1000 cm^{-1} (figura 3.15). Esto indica que la muestra NP- Al_2O_3 tiene un grado de pureza elevado seguramente debido al paso de calcinación a altas temperaturas, propio de la síntesis de este NM.

Figura 3.15. Espectro FT-IR de NP-Al₂O₃.

3.3.1.3. Difracción de rayos X

El patrón de difracción de rayos X de la muestra de las NP-Al₂O₃ (figura 3.16) exhibe picos a valores de 2θ de 25.7, 34.9, 37.7, 43.75, 46.5, 52.63, 57.82, 61.50, 66.7, 68.4 y 77.3; correspondientes al espaciamiento de (d012), (d104), (d110), (d113), (d202), (d024), (d116), (d018), (d214), (d300) y (d1,0,10) respectivamente. Estos resultados coinciden con la estructura de alto grado de pureza y cristalinidad del α -Al₂O₃⁴⁷.

Figura 3.16. Patrón de difracción de rayos X de la muestra de NP-Al₂O₃.

3.3.2. Interacción de NP-Al₂O₃ con medio acuoso salino y MOD

3.3.2.1. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Se evaluaron las distribuciones de tamaños de las NP-Al₂O₃ en agua, medio inorgánico simulado (MIS) y MIS con 10 ppm de AH, utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS). Los resultados se presentan en la Tabla 3.2.

Muestra	Tamaño	Desviación estándar
NP-Al ₂ O ₃ en H ₂ O	388	14
NP-Al ₂ O ₃ en MIS	244	49
	974	186
NP-Al ₂ O ₃ en 10 ppm de AH	727	201

Tabla 3.2. Distribución de tamaños de la muestra de NP-Al₂O₃ en distintos medios obtenidos por DLS.

Puede observarse que en agua las NP-Al₂O₃ se encuentran aglomeradas, pero teniendo en cuenta que su diámetro oscila alrededor de 150 nm podemos intuir que no es una aglomeración de gran cantidad de partículas. El aumento de la fuerza iónica genera la formación de aglomerados más grandes, en concordancia con la literatura¹⁶. Sin

embargo, con el agregado de AH, no se aprecian cambios en la distribución de tamaños respecto de las muestras en MIS.

3.3.2.2. Termogravimetría analítica

El análisis termogravimétrico de las NP- Al_2O_3 (figura 3.17) no muestra cambios apreciables en el descenso de masa en el rango de temperaturas que estamos analizando.

Figura 3.17. Análisis TGA de la muestra de NP- Al_2O_3 en ausencia (curva roja) y en presencia de AH (curva naranja). La figura inferior corresponde a la pérdida de masa y el análisis de la primer derivada se detalla en el grafico superior.

La pérdida de peso a temperaturas mayores a 400 °C, se le atribuye en la literatura a la reacción de deshidratación que ocurre en la superficie de las NP- Al_2O_3 ⁴⁸. En presencia de AH, pueden verse los picos característicos a temperaturas cercanas a 300°C y en el rango de 400-500°C, lo que permitiría inferir que tanto la porción alifática como la aromática son absorbidas por la muestra.

3.3.2.3. Espectroscopía IR por atenuancia total reflectada (ATR)

En la figura 3.18 se presenta el análisis por ATR de una muestra de AH (curva roja), NP-Al₂O₃ (curva amarilla) y el sólido remanente luego de la centrifugación de una solución 50 ppm de NP-Al₂O₃ y 10ppm de AH. Puede observarse la presencia de componentes alifáticos de los AH adsorbidos en la superficie de la NP-Al₂O₃, por las bandas a 2917 y 2849 cm⁻¹ atribuidas a las vibraciones del enlace -CH en un moléculas alifáticas y por la presencia de un pico a 1090 cm⁻¹ atribuible a la vibración del grupo -OH en un entorno alifático. Las bandas a 1620 y 1090 cm⁻¹, sugieren al presencia de residuos fenólicos adsorbidos y la banda pronunciada a 3350 cm⁻¹ atribuida a la vibración del -OH⁴⁹, indican la presencia de grupos alcohólicos, fenólicos y carboxílicos interactuando con la superficie.

Figura 3.18. Espectros ATR de una muestra de AH comerciales (Curva azul), NP-Al₂O₃ (Curva amarilla) y el sólido resultante de la centrifugación de una suspensión de NP- Al₂O₃ y AH.

3.3.2.4. Ensayos de adsorción

Para conocer en mayor detalle las características de los compuestos de AH adsorbidos en la muestra de NP-Al₂O₃, se evaluaron los radios E4/6, calculando la absorbancia a 465nm y 665nm respectivamente. Los resultados deben analizarse teniendo en cuenta que valores elevados de E4/6 indican la presencia de mayor cantidad de estructuras alifáticas con

respecto a las aromáticas en solución. Para realizar el experimento, se centrifugaron suspensiones 50 ppm de NP- Al_2O_3 en presencia de distintas concentraciones de AH (dejando previamente alcanzar el equilibrio de adsorción por 18h), y el sobrenadante se analizó por espectroscopía UV-Vis. Puede notarse en la figura 3.19 que las variaciones en E4/6 con el aumento de la concentración de AH es muy pequeña. Estos resultados son concluyentes con los análisis ATR y TGA del precipitado, en donde puede observarse la presencia de los picos correspondientes tanto a la porción alifática como a la aromática de los AH adsorbidos en la superficie de la NP- Al_2O_3 , sugiriendo que, a diferencia de lo observado para NP-ZnO, existe una adsorción indiscriminada de ambas porciones de los AH sobre la superficie de NP- Al_2O_3 .

Figura 3.19. E4/6 vs concentración de AH para una muestra de ácidos húmicos puros (puntos verdes) y para el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación de una suspensión de NP- Al_2O_3 50ppm y distintas concentraciones de AH (puntos rojos).

En un experimento independiente, se determinó la concentración de Al en dispersiones de 200 ppm de NP- Al_2O_3 , en ausencia y en presencia de 40 ppm de AH, con el objetivo de respetar la proporción de las concentraciones de ambos reactivos utilizadas en los experimentos anteriores. La solución se centrifugó a 7000 g por 10 min, y se analizó el sobrenadante por ICP-MS. Los resultados mostraron que para la muestra que no contenía AH, la concentración de Al en el sobrenadante fue de

0.913 ppm, mientras que en presencia de AH la concentración asciende a 2.770 ppm.

El sobrenadante de la muestra conteniendo 50 ppm de NP-Al₂O₃ y 10ppm de AH se analizó por espectroscopía FT-IR (figura 3.20). Como control se utilizó una solución de AH sin el agregado de NP-Al₂O₃ y una solución conteniendo Al₂(SO₄)₃ y AH. Las muestras se prepararon goteando la solución en KBr, secando a 70° con el posterior armado de la pastilla. Puede notarse una banda ancha entre 3000 y 4000 cm⁻¹ en la muestra de AH, que se ensancha formando una banda más angosta con máximos a 3467 y 3415 cm⁻¹, producto de la formación de complejos con enlaces covalentes coordinados²⁹ entre el Al³⁺ y las moléculas de los AH. Por otro lado, puede observarse un corrimiento de la banda atribuible a los grupos carboxilatos de 1586 a 1637 cm⁻¹ por adición de Al³⁺ a la muestra. Estos datos son concluyentes con la formación de complejos de coordinación con enlaces de carácter covalente entre los carboxilatos presentes en los AH y el Al³⁺ presente en solución³⁰. En la misma línea, se observa un corrimiento de la banda a 1090 cm⁻¹ a 1100 cm⁻¹, atribuible a la formación de complejos de coordinación entre el Al³⁺ y moléculas orgánicas con grupos -OH en entorno alifático. Por último, la presencia de la banda a 1384 cm⁻¹ confirma la participación de residuos fenólicos o ésteres de fenoles en la interacción del Al³⁺ con los AH. Sin embargo, en la muestra conteniendo NP-Al₂O₃ y AH, esta banda presenta una reducción en la intensidad muy pronunciada, en concordancia con la disminución de las vibraciones del -OH de los residuos fenólicos presentes en los AH, generado por la formación de complejos de coordinación⁵⁰.

Los resultados sugieren la formación de complejos de Al³⁺ proveniente de las NP-Al₂O₃ con los grupos carboxilatos y oxidrilos presentes en las moléculas de los AH.

Figura 3.20. Espectros FTIR del resultado de la centrifugación de una suspensión de NP-Al₂O₃ y AH (curva azul), una solución de Al₂(SO₄) y AH (Curva verde) y una solución de AH (curva roja)

3.3.3. Ensayos microbiológicos

El estudio del impacto de las NP-Al₂O₃ y la radiación lumínica en cultivos de *P. aeruginosa* irradiando con lámparas de emisión monocromática en la región visible del espectro electromagnético (575±5nm) y en la región ultravioleta (350±5nm) se presenta a continuación. Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia de AH, con el propósito de observar el efecto de la MOD en estos sistemas. Al principio de este capítulo, pueden observarse esquemas detallando el procedimiento experimental seguido.

La elección de la concentración empleada (50 ppm) fue realizada en base a el ensayo de inhibición con discos impregnados de soluciones de distintas concentraciones de NP-Al₂O₃. Para concentraciones mayores a 60ppm de NP-Al₂O₃ pudo observarse la presencia de un halo inhibitorio, mientras que para concentraciones menores a 40ppm no se observan cambios aparentes.

3.3.3.1. Ensayos realizados sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico y fuentes de irradiación visible

Los resultados de los recuentos bacterianos de *P. aeruginosa* en estado planctónico en presencia de NP-Al₂O₃ y bajo irradiación visible se muestran en la figura 3.21. El gráfico de barras de la izquierda corresponde a los ensayos irradiados en ausencia de AH y el de la derecha corresponde a los ensayos realizados en presencia de 10 ppm de AH. Puede observarse que en ausencia de AH no hay diferencias significativas entre la muestra conteniendo NP-Al₂O₃ y el control, tanto en oscuridad como bajo irradiación visible.

Bajo irradiación se nota un pequeño incremento tanto en el control como en presencia de NP-Al₂O₃, atribuido en la literatura³⁷ al aumento de la transcripción de la proteína PAS por la luz visible, estimulando la motilidad y optimización del uso de la fuente de carbono.

Es interesante notar que en presencia de AH, se encuentran diferencias significativas ($p < 0.05$) en el número de microorganismos entre la muestra conteniendo NP-Al₂O₃ y AH con respecto al control en oscuridad y entre la muestra con NP-Al₂O₃ irradiada y sin irradiar.

Estos resultados se condicen con los recuentos bacterianos, ya que estudios anteriores plantean que las moléculas presentes en los AH son capaces de formar complejos con el Al³⁺^{51,52}, un elemento muy tóxico para gran cantidad de sistemas biológicos, incluyendo procariontes. Hay varios mecanismos planteados que explican la toxicidad de este elemento, entre los que se destacan la interacción con enzimas, cofactores enzimáticos y ADN, despolarización de la membrana plasmática y pared celular⁵³, entre otros. Debe considerarse que la formación de complejos entre el AH y el Al³⁺ mediante mecanismos de atracción electrostática e intercambio de ligandos⁵⁴, depende fuertemente del pH del medio, debido al carácter anfotérico del ion Al³⁺. A los pH de las soluciones de trabajo (6,5-7,5), el ion Al³⁺ se encuentra formando complejos con carga formal positiva (Al(OH)₂¹⁺, Al(OH)₂²⁺), aumentando su solubilidad en suspensión⁵⁵.

Las moléculas de AH pueden participar en procesos de óxido-reducción, mediando los procesos de respiración microbiana. La presencia de metales multivalentes formando complejos con estas moléculas, pueden aumentar o debilitar esta propiedad. Estudios anteriores⁵⁶ plantean que los complejos de AH con Fe³⁺ poseen una mayor actividad de transferencia de electrones, facilitando ciertos procesos metabólicos en sistemas microbiológicos. Por el contrario, la presencia de Al³⁺, bloquea los sitios redox presentes en los AH, formando complejos con baja capacidad de transferencia de electrones. Consecuentemente, el rol de los AH como moléculas participantes en los procesos de transferencia de electrones a nivel extracelular se ve disminuida en presencia de iones Al³⁺.

Los resultados sugieren que la presencia de AH, aumenta la concentración y la biodisponibilidad de Al^{3+} , afectando negativamente el desarrollo de cultivos planctónicos de *P. aeruginosa*.

El hecho de que también se encuentren diferencias significativas entre la muestra conteniendo NP- Al_2O_3 en oscuridad y bajo irradiación visible, coincide con la estimulación metabólica inducida por luz visible, logrando que el cultivo se comporte como el control en oscuridad³⁷.

Figura 3.21. Efectos de NP- Al_2O_3 en cultivos *P. aeruginosa* en estado planctónico, en oscuridad y bajo irradiación a 575 nm en presencia y ausencia de AH.

3.3.3.2. Ensayos realizados sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico y bajo irradiación ultravioleta

En la figura 3.22. se detallan los resultados de los recuentos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación a 350nm. Además de los resultados en oscuridad previamente discutidos en la sección anterior, pueden observarse diferencias significativas ($p < 0.01$) entre el control irradiado y sin irradiar, para todas las condiciones ensayadas, producto del efecto de la luz UV en la integridad celular³⁹.

Figura 3.22. Efectos de NP-Al₂O₃ en cultivos *P. aeruginosa* en estado planctónico, en oscuridad y bajo irradiación a 350nm en presencia y ausencia de AH.

3.3.3.3. Ensayos realizados sobre *P. aeruginosa* formando biofilms

Los resultados de los recuentos bacterianos de *P. aeruginosa* formando biofilms bajo distintas condiciones se presentan en la figura 3.23. puede apreciarse un incremento significativo ($p < 0.01$) en el número final de bacterias en el biofilm crecido en presencia de NP-Al₂O₃ y AH con respecto al resto de las condiciones ensayadas. Se ha reportado⁵⁷ que una vez formado el biofilm, las células tienen una mayor resistencia a la toxicidad de los metales. Existen varios estudios que plantean que para concentraciones de metales menores a la inhibitoria, el desarrollo del biofilm se ve favorecido^{58,59}. En concordancia, los resultados que muestran el incremento de los valores en el recuento bacteriano son consistentes con el aumento de la concentración de Al en solución por la adición de AH.

Figura 3.23. Recuentos bacterianos (N/N0) en biofilm bacterianos de *P. aeruginosa* cultivados en distintas condiciones.

3.3.3.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las microfotografías SEM y la distribución de tamaños celulares se exponen en la figura 3.24. Puede observarse en el control (panel 1a y 1b) la presencia de células aisladas, y pequeños acúmulos, sin conformar un biofilm tridimensional. A mayor magnitud puede notarse que el tamaño de las células de *P. aeruginosa* es variado (más del 80% de las células entre 1.0 y 1.8 μm) debido a que se encuentran en la fase de colonización de la superficie en la que varias de ellas están próximas a su división. Por otra parte, se observa la presencia de EPS uniendo a las células a la superficie y entre sí. Es interesante notar que las células presentes en el biofilm cultivado en presencia de 50ppm de NP- Al_2O_3 muestran una marcada reducción en el tamaño celular promedio respecto al control (de $1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (control) a $0.7 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (NP- Al_2O_3)) (figura 3.24, 2a), sin la presencia de EPS. Estos resultados sugieren un ambiente desfavorable para el desarrollo de la biopelícula a consecuencia de la presencia de Al^{3+} en solución, un elemento con alta toxicidad en *P. aeruginosa*⁶⁰. Estos resultados están en línea con la reducción del tamaño observado en *E. coli*

por el tratamiento con iones metálicos⁶¹. Observando las microfotografías, además de la ausencia de EPS, pueden notarse que las bacterias aún conservan su fenotipo planctónico, utilizando los flagelos y pilis para establecer contacto entre célula-célula y célula-superficie. Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que en las cercanías con una superficie, son los orgánulos motrices (pili tipo IV, fimbrias y flagelos) los que establecen el primer contacto para efectuar la colonización⁶². De hecho, la literatura plantea que el primer anclaje a la superficie es llevado a cabo por los flagelos unipolares mientras que, en una segunda etapa, los pili tipo IV son los que logran establecer un contacto más firme entre la célula y la superficie⁶³. Existe una división asimétrica, en donde una de las células hijas queda anclada a la superficie mediante los pili tipo IV y la otra permanece con el flagelo unipolar volviendo al medio con su fenotipo planctónico⁶⁴. Una vez establecido el contacto, se producen señales en cascada incluyendo la producción de proteínas específicas y segundos mensajeros capaces de desencadenar la primera fase del desarrollo del biofilm⁶⁵. Cuando el ambiente es favorable, estas señalizaciones introducen un cambio en el fenotipo de la bacteria entre las que podemos destacar la retracción de los órganos motrices y la estimulación de la producción de proteínas Pel, Pls y alginato presentes en el EPS, formando las primeras microcolonias de un biofilm temprano⁶⁶.

Uno de los segundos mensajeros cruciales en el cambio fenotípico de planctónico a sésil es el ácido ciclo- 3'5' -diguanicílico (c-di-GMP). Elevados niveles de c-di-GMP promueven la formación del biofilm inhibiendo también la motilidad celular⁶⁷. El c-di-GMP funciona como efector de reguladores transcripcionales, mediando las funciones celulares mediante mecanismos señal-receptor⁶⁸. Por ejemplo, la proteína encargada de la producción de Pel se ve modulada positivamente por la presencia de c-di-GMP, ya que funciona como un receptor de la misma⁴⁴. La síntesis de c-di-GMP a partir de dos moléculas de GTP es llevada a cabo por la familia de enzimas diguanilato ciclasas (DGCs) mientras que las fosfodiesterasas (PDEs) son las encargadas de degradar este segundo mensajero a productos secundarios, como el GMP. Las DGCs funcionan como homodímeros, el sitio catalítico está situado en la interfase del dímero y está involucrado en el anclaje de dos moléculas de GTP para su conversión a c-di-GMP utilizando Mg^{2+} como cofactor. Está demostrado que organismos vivos los procesos biológicos dependientes de Mg^{2+} se ven afectados por la presencia de Al^{3+} . De hecho, concentraciones menores a la nanomolar de Al^{3+} son suficientes para competir con las concentraciones milimolares de Mg^{2+} requeridas para llevar a cabo procesos enzimáticos⁶⁹. Esta inhibición de los procesos dependientes de Mg^{2+} en presencia de iones Al^{3+} puede modificar muchas reacciones intracelulares, inclusive la producción de c-di-GMP por las DGCs generando la imposibilidad para la bacteria de modificar su fenotipo de planctónico a sésil, permaneciendo en las primeras fases de anclaje superficial previo a la formación de un

biofilm temprano, tal como se observa en la figura 3.24 (microfotografías 2a y 2b).

Figura 3.24. Microfotografías SEM de biofilm de *P. aeruginosa*. Control (1a y 1b), cultivadas en presencia de 50ppm de NP- Al₂O₃ (2a y 2b) y en presencia de 50ppm de NP- Al₂O₃ Y 10ppm de AH (3a y 3b).

En presencia de AH puede observarse (figura 3.24, 3a y 3b), la formación de un biofilm tridimensional con una densidad celular mayor y un tamaño promedio de $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$. Los resultados observados deben ser analizados teniendo en cuenta que la presencia de AH, logra aumentar la concentración de Al^{+3} , formando complejos de coordinación con los AH. Puede notarse que la respuesta adaptativa de *P. aeruginosa* es muy diferente si además de NP-Al₂O₃ se encuentran presentes los AH. Puede observarse una disminución del tamaño celular (de $1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (control) a $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (NP-Al₂O₃ + AH)), indicando también un ambiente algo más

desfavorable que el control, pero menos hostil que en el caso de NP-Al₂O₃. Sin embargo, se evidenció un incremento en la proliferación bacteriana ya que los recuentos revelan un incremento en el número final de bacterias para estas condiciones (figura 3.23). Por otra parte, la microfotografía SEM muestra un biofilm estructurado tridimensionalmente con la presencia de altas cantidades de EPS y acúmulos de partículas sobre ellos. Estos resultados sugieren que, en estas condiciones, la presencia de AH logra desencadenar procesos de respuesta frente al estrés, mediante la elaboración de una matriz polimérica que aísla a las bacterias del efecto de los iones Al³⁺ logrando mayor proliferación microbiana. De acuerdo a ello, dentro de todos los mecanismos planteados en la literatura, el que más se adecúa a nuestras observaciones es la estimulación de la producción de EPS, logrando encapsular los complejos formados entre los AH y el Al³⁺, dejándolo inaccesible para la célula⁷⁰. Los resultados sugieren que la presencia de estos complejos no logra inhibir las enzimas encargadas de elevar los niveles de c-di-GMP, debido a que se puede notar la formación de un biofilm con células en fenotipo sésil y grandes cantidades de EPS. La producción de un EPS autogenerado, con una viscosidad y un grado de hidratación elevado, puede estar compuesta por ADN, ARN, proteínas y carbohidratos complejos modificados químicamente. Como resultado, esta matriz posee una densidad de carga elevada, producto de todos los grupos funcionales de los compuestos orgánicos, como carboxilatos, fosfatos, sulfhidrilos aminos y fenoles. Esta matriz presenta una densidad de sitios de anclaje elevados que exceden ampliamente el número de sitios presentes en las membranas celulares⁷¹, impidiendo la difusión de pequeñas moléculas y iones metálicos hacia las células⁷².

Figura 3.25. Diámetro medio de las bacterias en el biofilm crecidos en distintas condiciones

3.3.4. Conclusiones

La suspensión de las NPs en agua mostró, en el caso de las NP-Al₂O₃, un aumento en las distribuciones de tamaño de los agregados por el incremento de la fuerza iónica del medio, en concordancia con la teoría DLVO¹⁶. Los estudios de TGA demuestran la adsorción de los AH sobre este NM, tanto de la porción orgánica alifática como de la aromática. Sin embargo, los ensayos de ATR y espectroscopía UV-Vis sugieren la adsorción preferencial de la porción alifática de los AH sobre la superficie de NP-Al₂O₃, mientras que la porción aromática quedaría retenida en la solución, formando complejos con el Al³⁺.

Al igual que en el caso de las NP-ZnO, cuando se agregaron NP-Al₂O₃ a los cultivos de bacterias planctónicas, no pudo observarse un efecto tóxico inducido por la luz, pero sí se evidenció en el caso de la irradiación UV debido al efecto de la misma sobre la integridad celular. Si bien el número final de bacterias en oscuridad es menor cuando se hallan las NP-Al₂O₃ en el medio en relación con el control, solo se ven diferencias significativas cuando en el medio se hallan presentes los AH. Un mecanismo que pueda explicar la toxicidad en oscuridad es la mayor liberación de iones Al³⁺ y formación de complejos en la presencia de AH, de bajo poder de transferencia de electrones.

Los resultados de los recuentos celulares en el biofilm y distribución de tamaños de las bacterias adheridas a la superficie obtenidos a partir de las microfotografías SEM, sugieren que *P. aeruginosa* adopta distintas estrategias de supervivencia dependiendo de la presencia o ausencia de NP y de AH. La presencia de NP-Al₂O₃ induce la reducción del tamaño de las bacterias y la formación de redes microbianas con bacterias unidas a través de flagelos y pilis y con escasa, casi nula, producción de EPS dando cuenta de un alto impacto de dichas NPs.

La presencia de conjunta de AH y NP-Al₂O₃ indujo un incremento del número de bacterias en el biofilm y una mayor producción de EPS. Sin embargo, también existe un cambio en la morfología y disminución del tamaño celular, lo que indica un ambiente desfavorable para las bacterias. Estas observaciones se condicen con las medidas de ICP, que muestran un aumento de la concentración de Al en solución por efecto de los AH, la formación complejos y modificación de las propiedades del sistema.

En ausencia de AH, además de un cambio en el tamaño celular y la casi nula producción de EPS, la presencia de iones Al³⁺ puede modificar muchas reacciones intracelulares imposibilitando la modificación de su fenotipo de planctónico a sésil, por lo que las bacterias permanecen en las primeras fases de anclaje superficial previo a la formación de un biofilm temprano.

Todos estos resultados muestran un marcado efecto del entorno celular con o sin presencia de NP y AH sobre la estructuración del biofilm sobre la superficie.

3.4. Conclusiones parciales (NP-ZnO Y NP-Al₂O₃)

Ambos NMs mostraron un aumento de la concentración del metal por el agregado de AH junto con la formación de complejos de coordinación entre el metal y moléculas de AH. Sin embargo, en el caso de la muestra de NP-ZnO se observan efectos tóxicos en oscuridad para cultivos planctónicos que se ven revertidos por la presencia de AH. El aumento de la concentración de Zn²⁺ por el agregado de AH tiene un efecto potenciador en la proliferación del biofilm. Por otra parte, la muestra de NP-Al₂O₃ muestra toxicidad en *P. aeruginosa* en estado planctónico solo después del agregado de AH, lo que indica que los complejos de coordinación formados son de distinta naturaleza en ambos casos. Si bien los recuentos en el biofilm en presencia de NP-Al₂O₃ no muestran diferencias significativas con el control, las microfotografías SEM muestran células aisladas con una importante reducción del tamaño celular. Las bacterias se hallan con fenotipo planctónico ancladas a la superficie por orgánulos motrices, lo que indica la presencia de un ambiente altamente tóxico, con la imposibilidad del cambio de fenotipo planctónico al sésil por parte del microorganismo. Sin embargo, con el agregado de AH el biofilm se ve incrementado varias veces y puede observarse la presencia de grandes cantidades de EPS, una reducción del tamaño celular y una estructura tridimensional del biofilm. Esto podría estar indicando que, si bien el ambiente es tóxico en presencia de AH, *P. aeruginosa* se adapta de manera diferente al entorno, logrando la formación de un biofilm estructurado.

Los resultados junto con lo expuesto en la literatura, sugieren que ambos NMs intervienen en distintos estadios de la formación del segundo mensajero c-di-GMP, encargado de regular las primeras fases de formación del biofilm⁴⁴ (figura 3.26). La presencia de Zn²⁺ inhibe la acción de la fosfodiesterasa, enzima encargada de degradar el c-di-GMP a GMP⁴³. Ello trae como consecuencia la acumulación de c-di-GMP y con ello un incremento en la proliferación del biofilm. El aumento de la concentración de Zn²⁺ por el agregado de AH tiene un efecto potenciador en la formación de la biopelícula⁴¹. Por el contrario, la presencia de Al³⁺ inhibe la acción de la enzima diguanilato ciclasa, encargada de catalizar la reacción de formación de c-di-GMP a partir del GTP. De esta manera, el microorganismo no puede cambiar su fenotipo de planctónico a sésil y las bacterias quedan ancladas a la superficie mediante sus orgánulos motrices⁶², sin la posibilidad de formar las microcolonias de un biofilm temprano. Sin embargo, en este NM, la presencia de AH logra revertir este efecto y se observa una proliferación en el biofilm.

Estos resultados sugieren marcado efecto de estos NMs en el medio ambiente, ya que pueden alterar significativamente el ecosistema. Además, la MOD puede realizar modificaciones en el NM dependiendo de la naturaleza del mismo, sumándole una complejidad adicional al estudio del impacto de estos NMs en un entorno natural.

Figura 3.36. Efecto de la muestra de NP-ZnO y NP-Al₂O₃ en la vía metabólica de la formación del segundo mensajero c-di-GMP

3.5. Referencias

1. Zhang, H., Chen, G. & Bahnemann, D. W. Photoelectrocatalytic materials for environmental applications. *J. Mater. Chem.* **19**, 5089–5121 (2009).
2. Bahnemann, D. W., Kormann, C. & Hoffmann, M. R. Preparation and characterization of quantum size zinc oxide: A detailed spectroscopic study. *J. Phys. Chem.* **91**, 3789–3798 (1987).
3. Fujishima, A., Kato, T., Maekawa, E. & Honda, K. Mechanism of the Current Doubling Effect. I. The ZnO Photoanode in Aqueous Solution of Sodium Formate. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* vol. 54 1671–1674 (2006).
4. Wan, Q. *et al.* Fabrication and ethanol sensing characteristics of ZnO nanowire gas sensors. *Appl. Phys. Lett.* **84**, 3654–3656 (2004).
5. Wang, X., Summers, C. J. & Wang, Z. L. Large-scale hexagonal-patterned growth of aligned ZnO nanorods for nano-optoelectronics and nanosensor arrays. *Nano Lett.* **4**, 423–426 (2004).
6. Studenikin, S. A., Golego, N. & Cocivera, M. Fabrication of green and orange photoluminescent, undoped ZnO films using spray pyrolysis. *J. Appl. Phys.* **84**, 2287–2294 (1998).
7. Li, Y., Meng, G. W., Zhang, L. D. & Phillipp, F. Ordered semiconductor ZnO nanowire arrays and their photoluminescence properties. *Appl. Phys. Lett.* **76**, 2011–2013 (2000).
8. Xia, W. *et al.* Mesoporous multi-shelled ZnO microspheres for the scattering layer of dye sensitized solar cell with a high efficiency. *Appl. Phys. Lett.* **108**, (2016).
9. Lee, G.-J. *et al.* Environmental Applications of ZnO Materials. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15**, 6900–6913 (2015).
10. Bian, S. W., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T. & Grassian, V. H. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: Influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. *Langmuir* **27**, 6059–6068 (2011).
11. Arefi, M. R. & Rezaei-Zarchi, S. Synthesis of zinc oxide nanoparticles and their effect on the compressive strength and setting time of self-compacted concrete paste as cementitious composites. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 4340–4350 (2012).
12. Vafaei, M. & Ghamsari, M. S. Preparation and characterization of ZnO nanoparticles by a novel sol-gel route. *Mater. Lett.* **61**, 3265–3268 (2007).
13. Karsten, B. P., Bijleveld, J. C., Viani, L. & Cornil, J. Supporting Information. 1–9 (2009).
14. Mallard, P. J. L. and W. G. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* (2019).
15. Talam, S., Karumuri, S. R. & Gunnam, N. Synthesis, Characterization, and Spectroscopic Properties of ZnO Nanoparticles.

- ISRN Nanotechnol.* **2012**, 1–6 (2012).
16. Hiemenz, Paul C and Hiemenz, P. C. *Principles of colloid and surface chemistry*. vol. 188 (M. Dekker New York, 1986).
 17. Janoš, P. & Kozler, J. Thermal stability of humic acids and some of their derivatives. *Fuel* **74**, 708–713 (1995).
 18. Kučerík, J., Kovář, J. & Pekař, M. Thermoanalytical investigation of lignite humic acids fractions. *J. Therm. Anal. Calorim.* **76**, 55–65 (2004).
 19. Provenzano, M. R. & Senesi, N. Thermal properties of standard and reference humic substances by differential scanning calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* **57**, 517–526 (1999).
 20. Montecchio, D. *et al.* Thermal analysis (TG-DTA) and drift spectroscopy applied to investigate the evolution of humic acids in forest soil at different vegetation stages. *J. Therm. Anal. Calorim.* **83**, 393–399 (2006).
 21. Francioso, O., Montecchio, D., Gioacchini, P. & Ciavatta, C. Thermal analysis (TG-DTA) and isotopic characterization (^{13}C - ^{15}N) of humic acids from different origins. *Appl. Geochemistry* **20**, 537–544 (2005).
 22. Ioselis, P., Rubinsztain, Y., Ikan, R., Aizenshtat, Z. & Frenkel, M. Thermal characterization of natural and synthetic humic substances. *Org. Geochem.* **8**, 95–101 (1985).
 23. Yang, Y., Chen, H., Zhao, B. & Bao, X. Size control of ZnO nanoparticles via thermal decomposition of zinc acetate coated on organic additives. *J. Cryst. Growth* **263**, 447–453 (2004).
 24. Ghule, A. V. *et al.* Simultaneous thermogravimetric analysis and in situ thermo-Raman spectroscopic investigation of thermal decomposition of zinc acetate dihydrate forming zinc oxide nanoparticles. *Chem. Phys. Lett.* **381**, 262–270 (2003).
 25. Kar, S. *et al.* Role of organic matter and humic substances in the binding and mobility of arsenic in a Gangetic aquifer. *J. Environ. Sci. Heal. - Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng.* **46**, 1231–1238 (2011).
 26. Koesnarpadi, S., Santosa, S., Siswanta, D. & Rusdiarso, B. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticle Coated Humic Acid ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{HA}$). *Procedia Environ. Sci.* **30**, 103–108 (2015).
 27. Purmalis, O. COMPARATIVE STUDY OF PEAT HUMIC ACIDS BY USING UV. 24–26 (2013).
 28. Hyung, H. & Kim, J. Natural Organic Matter (NOM) Adsorption to Multi-Walled Carbon Nanotubes : Effect of NOM Characteristics and Water Quality Parameters. **42**, 4416–4421 (2008).
 29. Tan, K. H. Formation of metal-humic acid complexes by titration and their characterization by differential thermal analysis and infrared spectroscopy. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 123–129 (1978).
 30. Vinkler, P., Lakatos, B. & Meisel, J. Infrared spectroscopic investigations of humic substances and their metal complexes. *Geoderma* **15**, 231–242 (1976).

31. García-Lara, B. *et al.* Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* **61**, 299–305 (2015).
32. Xu, X. *et al.* Antimicrobial mechanism based on H₂O₂ generation at oxygen vacancies in ZnO crystals. *Langmuir* **29**, 5573–5580 (2013).
33. Gadd, G. E. & Casey, P. S. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchnerella subcapitata*): the. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 8484–8490 (2007).
34. Pasquet, J. *et al.* The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **457**, 263–274 (2014).
35. Waters, C. M. & Bassler, B. L. QUORUM SENSING: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 319–346 (2005).
36. Kadiyala, U., Turali-Emre, E. S., Bahng, J. H., Kotov, N. A. & Scott Vanepps, J. Unexpected insights into antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant: *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Nanoscale* **10**, 4927–4939 (2018).
37. Río-Álvarez, I. *et al.* Light regulates motility, attachment and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000. *Environ. Microbiol.* **16**, 2072–2085 (2014).
38. Gharaie, S. *et al.* Light spectrum modifies the utilization pattern of energy sources in *Pseudomonas* sp. DR 5-09. *PLoS One* **12**, 1–24 (2017).
39. Goosen, N. & Moolenaar, G. F. Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 353–379 (2008).
40. Yang, K., Lin, D. & Xing, B. Interactions of Humic Acid with Nanosized Inorganic Oxides. 3571–3576 (2009) doi:10.1016/j.envpol.2008.11.007.
41. Dieppois, G., Ducret, V., Caille, O. & Perron, K. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**, (2012).
42. Marguerettaz, M. *et al.* Sputum containing zinc enhances carbapenem resistance, biofilm formation and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.* **77**, 36–41 (2014).
43. Tchigvintsev, A. *et al.* Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J. Mol. Biol.* **402**, 524–538 (2010).
44. Lee, V. T. *et al.* A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**, 1474–1484 (2007).
45. Sadiq, I. M., Chowdhury, B., Chandrasekaran, N. & Mukherjee, A. Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli* to alumina nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **5**, 282–286 (2009).

46. Zhao, D. & Lu, G. Q. (Max). Editorial. *J. Colloid Interface Sci.* **427**, 1 (2014).
47. Kim, A. Y. *et al.* Low temperature synthesis of hexagonal shaped α - Al_2O_3 using a solvothermal method. *J. Nanomater.* **2012**, (2012).
48. Gupta, S., Ramamurthy, P. C. & Madras, G. Covalent grafting of polydimethylsiloxane over surface-modified alumina nanoparticles. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**, 6585–6593 (2011).
49. Sadtler Research Laboratories & Simons, W. W. *The Sadtler handbook of infrared spectra*. (W.W. Simons, Heyden and Son, 1978).
50. McBride, M. B. & Wessellink, L. G. 'W. **22**, 703–708 (1988).
51. Erdemoğlu, S. B., Pyrzyniska, K. & Güçer, Ş. Speciation of aluminum in tea infusion by ion-exchange resins and flame AAS detection. *Anal. Chim. Acta* **411**, 81–89 (2000).
52. Sikora, F. J. & McBride, M. B. Aluminum Complexation by Catechol as Determined by Ultraviolet Spectrophotometry. *Environ. Sci. Technol.* **23**, 349–356 (1989).
53. Piña, R. G. & Cervantes, C. Microbial interactions with aluminium. *BioMetals* **9**, 311–316 (1996).
54. Yu, S., Liu, J., Yin, Y. & Shen, M. Interactions between engineered nanoparticles and dissolved organic matter: A review on mechanisms and environmental effects. *J. Environ. Sci. (China)* **63**, 198–217 (2018).
55. Tombácz, E. *et al.* Effect of pH and ionic strength on the interaction of humic acid with aluminium oxide. *Colloid Polym. Sci.* **278**, 337–345 (2000).
56. Zhou, S., Chen, S., Yuan, Y. & Lu, Q. Influence of Humic Acid Complexation with Metal Ions on Extracellular Electron Transfer Activity. *Nat. Publ. Gr.* (2015) doi:10.1038/srep17067.
57. Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 928–938 (2007).
58. Schue, M. *et al.* Modulation of metabolism and switching to biofilm prevail over exopolysaccharide production in the response of rhizobium alamii to cadmium. *PLoS One* **6**, (2011).
59. Sandrin, T. R. & Maier, R. M. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ. Health Perspect.* **111**, 1093–1101 (2003).
60. Harrison, J. J., Ceri, H., Stremick, C. A. & Turner, R. J. Biofilm susceptibility to metal toxicity. *Environ. Microbiol.* **6**, 1220–1227 (2004).
61. Krishnamurthi, V. R., Chen, J. & Wang, Y. Silver ions cause oscillation of bacterial length of Escherichia coli. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
62. Conrad, J. C. Physics of bacterial near-surface motility using flagella and type IV pili: Implications for biofilm formation. *Res. Microbiol.* **163**, 619–629 (2012).

63. Barken, K. B. *et al.* Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environ. Microbiol.* **10**, 2331–2343 (2008).
64. Laventie, B. J. *et al.* A Surface-Induced Asymmetric Program Promotes Tissue Colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cell Host Microbe* **25**, 140–152.e6 (2019).
65. Sivadon, P., Barnier, C., Urios, L. & Grimaud, R. Biofilm formation as a microbial strategy to assimilate particulate substrates. *Environ. Microbiol. Rep.* **00**, (2019).
66. Rossi, E., Paroni, M. & Landini, P. Biofilm and motility in response to environmental and host-related signals in Gram negative opportunistic pathogens. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 1587–1602 (2018).
67. Kulasekara, H. D. *et al.* A novel two-component system controls the expression of *Pseudomonas aeruginosa* fimbrial cup genes. *Mol. Microbiol.* **55**, 368–380 (2005).
68. Valentini, M. & Filloux, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J. Biol. Chem.* **291**, 12547–12555 (2016).
69. Macdonald, T. L. & Bruce Martin, R. Aluminum ion in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 15–19 (1988).
70. van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H. & Lens, P. N. L. Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**, 9–33 (2003).
71. Liu, H. & Fang, H. H. P. Characterization of electrostatic binding sites of extracellular polymers by linear programming analysis of titration data. *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 806–811 (2002).
72. Harrison, J. J., Turner, R. J. & Ceri, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* **7**, 981–994 (2005).

**Capítulo 4:
Nanotubos de carbono
multicapa comerciales:
caracterización e
interacción con
fuentes lumínicas**

Esquemas de procedimientos experimentales

En los siguientes esquemas se sintetizan los procedimientos experimentales discutidos en el capítulo 2 en el caso de los MWCNT.

Esquema 1. Símbolos utilizados en el esquema 2

Esquema 2. Resumen de los tratamientos realizados en el capítulo sobre los MWCNT

*“Solo pido que me escuches, éste lápiz escribe por vos.
Un calor que viene de la cruz del sur
me enseña a disfrutar tu luz”*

Capítulo 4: Nanotubos de carbono multicapa comerciales: caracterización e interacción con fuentes lumínicas

4.1. Introducción

Ya se han mencionado las numerosas ventajas que poseen los nanotubos de carbono dentro de las nuevas aplicaciones tecnológicas. También hemos discutido acerca de todos los procesos de síntesis y las variantes que existen para optimizar los procesos y obtener un mayor rendimiento en la cantidad y calidad de los nanotubos. Si bien la química de estos materiales resulta interesante para diversas aplicaciones, también es pertinente evaluar el comportamiento de los nanotubos en presencia de los residuos de catalizadores que se utilizan para su síntesis, ya que existe una interacción fuerte entre ambos. Estos residuos son muy difíciles de remover y está demostrado que alteran tanto las propiedades electrónicas como electroquímicas de la muestra^{1,2}.

El sistema compuesto por pequeñas NP de catalizadores metálicos y los MWCNT ofrece una química que debe ser considerada especial ya que pueden ocurrir fenómenos de transferencia de carga entre la red de carbono y el metal, generando una amplia variedad de procesos capaz de modificar las propiedades de los NTC. Por otra parte, las propiedades electrónicas y la cantidad de defectos superficiales dependen exclusivamente de cómo se organizan los planos grafiticos en los nanotubos concéntricos. Los defectos superficiales juegan un papel fundamental en las propiedades físicas y químicas de estos sistemas³.

Estudios previos plantean que la excitación con láser genera fuertes modificaciones en los nanotubos, ya sea de múltiples o simple capa^{4,5}. Dentro de los distintos efectos publicados en la literatura se encuentran la pérdida de las impurezas y la inducción de defectos superficiales, generando una destrucción irreversible de los nanotubos⁶.

En el presente capítulo se describirán los ensayos que se realizaron para caracterizar de forma minuciosa la muestra de nanotubos de carbono multicapa comerciales (MWCNT) utilizados y la interacción que tienen los mismos con luz de distinta longitud de onda. Se utilizaron MWCNT comerciales Nanocyl™ NC7000 grado industrial, pureza de Carbono 90%, diámetro 9.5 nm, longitud 1.5 mm, área superficial específica 475m² g⁻¹.

4.2. Estrategias de estudio

Fuentes de luz

La luz solar comprende un amplio espectro en longitudes de onda, que van desde el infrarrojo hasta el ultravioleta, con mayor intensidad comprendida entre los 450 y 650 nm. Con el objetivo de evidenciar el efecto de la irradiación solar sobre las propiedades fisicoquímicas, químicas y estructurales de los MWCNT, se ensayaron distintas fuentes de irradiación, dentro del espectro solar, a fin de identificar el tipo de efecto con la longitud de onda de la radiación. Para ello se utilizaron en una etapa preliminar lámparas de emisión monocromática con longitudes de onda correspondientes al visible ($575\pm 5\text{nm}$) y al UV ($350\pm 5\text{nm}$) según los protocolos detallados en el Capítulo 2 “Materiales y métodos experimentales”. En ocasiones se utilizó una SolarBox® como fuente de irradiación, ya que el espectro de la lámpara era similar al solar. En el capítulo 5 se detallarán los experimentos realizadas con luz solar natural como fuente de irradiación, lo que nos permitirá tener un panorama más global acerca de los eventos que se desenvuelven en un entorno ambiental.

Ensayos de caracterización

Como punto de partida es necesario conocer las características de la muestra sin ninguna modificación, es decir la muestra prístina (pMWCNT). Los análisis por ICP-MS y curvas de magnetización permitieron la obtención de información más detallada de la naturaleza de los residuos metálicos en la muestra. Ensayos como microscopía Raman, FT-IR, TEM, XPS, EPR, TGA, UV-Vis, XDR y susceptibilidad magnética, además de brindar información sobre la muestra prístina sirvieron también para caracterizar la muestra que mantuvo contacto con la luz. Por último, la espectroscopía de emisión de transientes (flash fotólisis) brindó la información sobre el mecanismo de reacción capaz de explicar los sucesos que ocurren cuando la muestra de MWCNT interactúa con la luz UV-visible.

4.3 Resultados

4.3.1. Análisis dispersivo de rayos X y por acoplamiento de plasma inductivo: ICP-MS

El análisis dispersivo de rayos X, (EDX, figura 4.1) sugiere la presencia de Fe, Co y Al. Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a cuantificar los metales por análisis de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Los resultados arrojaron que por gramo de muestra se encuentran 2.9×10^{-5} moles de Co, 4.94×10^{-5} moles de Fe y 1.5×10^{-3} moles de Al. Sin embargo, la técnica no permite detectar Si. El aluminio es el metal

mayoritario en la muestra, y posiblemente se encuentre como un residuo libre. La presencia de los picos correspondiente al Cu, se debe al material soporte que se utilizó para realizar la medida.

Figura 4.1. Espectroscopia dispersiva de rayos X (EDX) de la muestra pMWCNT.

4.3.2. Susceptibilidad magnética

La presencia de elementos como Co y Fe pueden conferirle magnetización a la muestra. Se realizaron mediciones de susceptibilidad magnética de la muestra de pMWCNT y se comparó con la muestra tratada con HCl (protocolo detallado en el capítulo 2: “Materiales y métodos experimentales”). Puede observarse en la figura 4.2, un descenso de la susceptibilidad magnética cuando a la muestra se le extraen la mayor parte de los metales por tratamiento con ácido, sugiriendo que la presencia de los metales es la causante de la magnetización de la muestra. A nivel macroscópico se puede notar que cuando acercamos un imán de Neodimio (Nd) a una dispersión de pMWCNT, los nanotubos son atraídos hacia el mismo. Por el contrario, si hacemos lo mismo contra una dispersión de HCl-MWCNT, los nanotubos decantan hacia el fondo del vaso.

Figura 4.2. Curvas de susceptibilidad magnética (derecha) y ensayo con un imán de Neodimio (izquierda) de pMWCNT Y HCl-MWCNT.

Si bien la muestra de MWCNT con tratamiento ácido reveló una susceptibilidad magnética considerablemente menor, esta no desciende a valores nulos, apoyando otras evidencias experimentales que sugieren que el tratamiento ácido no es capaz de remover la totalidad de los metales en solución. De hecho, las medidas de ICP-MS para la muestra de HCl-MWCNT arrojaron que luego del tratamiento, todavía se encontraron 2.7×10^{-5} moles de Fe y 1.45×10^{-5} moles de Co por gr de muestra.

4.4. Interacción de nanotubos de carbono con fuentes de emisión monocromática

El uso de lámparas de emisión monocromática ofrece la ventaja de poder evaluar el efecto que tiene la luz sobre los MWCNT en un intervalo pequeño de longitudes de onda. A continuación, se presentarán los resultados que se obtuvieron antes y después de irradiar con lámparas de emisión monocromática a 350 ± 5 y 575 ± 5 nm.

4.4.1. Ensayos con luz monocromática con máximo de emisión a 350 nm

A continuación, se detallarán los ensayos realizados utilizando luz monocromática con un máximo de emisión a 350nm. El protocolo de irradiación se encuentra descrito en el capítulo 2: “Materiales y métodos experimentales”. La muestra resultante de irradiar pMWCNTs con esta fuente de luz se denominó 350I-MWCNT.

4.4.1.1. Difracción de rayos X

Los patrones de difracción de rayos X de las muestras pMWCNT, 350I-MWCNT y HCl-MWCNT pueden verse en la figura 4.3. En todas las muestras puede observarse un pico ancho centrado a $2\theta=26.0^\circ$ con alturas distintas. Este pico está formado por la superposición de un pico ancho correspondiente a carbono amorfo y un pico fino (002) de carbono grafítico a 26.5° , que corresponde a un interlineado entre la red de grafito de 0,335 nm. El pico fino ubicado cerca de $2\theta=28.0^\circ$ puede ser atribuido a la presencia de impurezas de Fe_3C adsorbidos superficialmente⁷. El patrón de difracción del NiO (200) a 43.21° ⁸ se observa en todas las muestras, aún en las tratadas con HCl. Este último dato permite explicar la magnetización remanente luego del tratamiento con ácido, ya que las trazas de NiO alojado en los sitios internos del nanotubo podrían dar lugar al magnetismo observado. Los patrones de difracción de las muestras tratadas con luz ultravioleta también muestran el pico a 43.21° , lo que indica que la presencia de este metal no se ve afectada por la irradiación.

Figura 4.3. Patrón de difracción de rayos X en muestras de pMWCNT, HCl-MWCNT y 350I-MWCNT.

4.4.1.2. Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de las muestras de MWCNT muestran las formas características de los picos de los MWCNT: una banda levemente asimétrica aproximadamente en 1580 cm^{-1} correspondiente a las capas gráficas relacionadas con las vibraciones laterales de todos los materiales presentes que contengan enlaces sp^2 y por otro lado la banda dispersiva D y D' ubicadas aproximadamente en 1350 y 1620 cm^{-1} , respectivamente,

con intensidades dependientes del número de defectos presentes en la muestra⁹. La banda D refleja la presencia de defectos en los sistemas de carbono¹⁰ y está relacionada con la presencia de carbono amorfo¹¹. La banda D' está asociada con los desórdenes que se introducen por la funcionalización y la tensión, de materiales basados en grafito¹².

Podemos obtener información acerca de la calidad estructural de los nanotubos si relacionamos el área de los picos D y G (A_D/A_G). Los pMWCNT muestran una razón A_D/A_G de 1.5 ± 0.1 mientras que los 350I-MWCNT tienen un valor de 0.8 ± 0.1 , indicando que tanto los defectos de los nanotubos como el carbono amorfo presente en la muestra son removidos luego de la irradiación^{13,9}.

Figura 4.4. Espectroscopía Raman de pMWCNT y 350-MWCNT.

4.4.1.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro FT-IR de los pMWCNT (figura 4.5) muestra bandas pronunciadas de absorción a 3440, 2950 y 2860 cm^{-1} , atribuidas al estiramiento asimétrico y simétrico del OH y al estiramiento simétrico del C-H respectivamente. Los picos a 1640 y 1540 cm^{-1} pueden asignarse a las vibraciones de los enlaces conjugados C-C y a los grupos aromáticos. De hecho, las bandas a 1550 y 1200 cm^{-1} están directamente relacionadas con las bandas G y D observadas en el espectro Raman¹⁴.

Los picos a 1391 y 1097 cm^{-1} están atribuidos a la vibración C-O en alcoholes y fenoles respectivamente. Los grupos funcionales con enlaces C-O pueden generarse durante los procesos de síntesis¹⁵. Sin embargo, la contribución de vibraciones Si-O a 1050-1100 cm^{-1} no debe ser descartada teniendo en cuenta que el SiO_2 está presente en la muestra como una impureza residual.

Las bandas anchas intensas entre los 680-540 cm^{-1} , podrían deberse a la presencia de los óxidos de metales utilizados en los procesos de síntesis. Las bandas coinciden con las publicadas para la magnetita y los óxidos de

hierro que presentan bandas características en la región comprendida entre 630-572 cm^{-1} . Cuando comparamos el espectro de los pMWCNT con los HCl-MWCNT, se puede apreciar que, si bien se siguen manteniendo los picos característicos de los grupos oxidados del nanotubo, las bandas atribuidas a los óxidos metálicos disminuyen considerablemente, aunque todavía puede observarse la presencia de un pico a 639 cm^{-1} .

Cabe destacar que cuando observamos el FT-IR de la muestra de 350I-MWCNT las bandas correspondientes a las vibraciones C-O y O-H se ven mucho menos intensas cuando las comparamos con las vibraciones C-H, indicando un menor contenido de grupos con oxígeno luego de la irradiación. Asimismo, y en comparación con la muestra de HCl-MWCNT, las bandas anchas intensas entre los 689-540 cm^{-1} desaparecen completamente, indicando que el tratamiento con luz logra remover los metales adsorbidos superficialmente casi en su totalidad.

Figura 4.5. FTIR de pMWCNT (curva azul), HCl-MWCNT (curva verde) y 350I-MWCNT (curva violeta).

4.4.1.4. Termogravimetría analítica (TGA)

Se realizaron ensayos de TGA en presencia de atmósfera oxidante (21% O_2). El análisis de los pMWCNT muestran una temperatura de oxidación de 610°C en el punto de mayor pérdida de peso y una masa final residual equivalente al 24% del peso inicial, atribuidos a los metales oxidados¹⁶. Por otro lado, cuando analizamos la muestra 350I-MWCNT, se pueden

observar procesos de oxidación que ocurren en el rango de 610 a 685 °C, tal como lo indica el pico en la primera derivada. Generalmente los procesos de oxidación de los pMWCNT ocurren en el rango de los 400 a 650 °C. Cualquier variante que introduzca una modificación superficial, defectos o acortamientos hacen decrecer la temperatura de oxidación¹⁴.

La mayor temperatura de oxidación observada para los 350I-MWCNT sugiere la formación de estructuras más resistentes a la oxidación luego de la irradiación con la luz.

Figura 4.6. Análisis termogravimétrico de la muestra de pMWCNT (curva verde), 350I-MWCNT (curva naranja) y HCl-MWCNT (curva bordo).

La muestra de HCl-MWCNT tiene una temperatura similar de descomposición que la muestra irradiada, pero aumenta significativamente su masa entre los 500 y 600°. Estudios anteriores muestran que el tratamiento con HCl en nanotubos sin presencia de impurezas metálicas, no presenta los aumentos de masa observados para esta muestra¹⁷, lo que sugiere que el aumento de masa observado se debe a la presencia de metales remanentes que reaccionan con el oxígeno molecular. Estos

metales podrían modificarse o liberarse luego del tratamiento previo de HCl, generando los efectos observados.

Es interesante resaltar que la masa residual de los 350I-MWCNT es mucho mayor que la medida para los pMWCNT (40 vs 24% respectivamente).

Las cenizas remanentes de las muestras de 350I-MWCNT se analizaron por difracción de rayos X luego de hacer el análisis termogravimétrico, en donde se pueden observar la presencia de pequeños picos a $2\theta = 35.5$, 43, 47, 63.2 y 67 °, atribuidos al Fe_2O_4 , NiO y Co_2O_3 evidenciando que los residuos que quedan remanentes son principalmente óxidos de metales (figura 4.7).

Figura 4.7. Difracción de rayos X de las cenizas del TGA de la muestra de 350I-MWCNT.

4.4.1.5. Curvas de adsorción de nitrógeno

Los MWCNT poseen una superficie irregular y de alta porosidad. La medición del área superficial mediante adsorción de nitrógeno y su análisis mediante el modelo BET (Brunauer, Emmett y Teller)¹⁸ resulta una técnica adecuada para su caracterización. Los resultados se presentan en la tabla 4.1. Los resultados indican un aumento del tamaño de poro de las muestras irradiadas y con tratamiento ácido. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que tanto la irradiación como el tratamiento ácido logran remover los metales catalíticos adsorbidos superficialmente y que

posiblemente se encuentran taponando los extremos de los nanotubos, impidiendo la adsorción de nitrógeno en los espacios libres entre capas internas. En efecto, el área superficial aumenta consecuentemente en el caso de la muestra 350I-MWCNT. Sin embargo, no se observa un aumento del área superficial para la muestra HCl-MWCNT.

	pMWCNT	350I-MWCNT	HCl-MWCNT
Área superficial (m ² /g)	281.1	295.1	269.7
Volumen de poro (Cm ³ /g)	0.67	1.10	0.90
Diámetro de poro (Å)	94	146	130
Area superficial BET (m ² /g)	284.7±0.1	302 ±1	275.3±0.5

Tabla 4.1. Área superficial, volumen de poro, diámetro de poro y área superficial calculada por el modelo BET de las muestras de pMWCNT, 350I-MWCNT, HCl-MWCNT.

4.4.1.6. Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Las micrografías HR-TEM (figura 4.8) muestran las imágenes características de los MWCNT (12nm de ancho), en donde la mayoría tienen los extremos cerrados y también puede notarse la presencia de material amorfo. En las micrografías de la muestra 350I-MWCNT también pueden distinguirse las estructuras características de los pMWCNT, pero a diferencia de las muestras prístinas, también se observan estructuras cristalinas e identidades no tubulares de distinto tamaño. Estas estructuras no tubulares cristalinas revelan un espaciado interplanar de 0.355 nm (que se condicen con los valores de $2\theta=26.5$ en el patrón de DRX), del orden del espaciado de las hojas de grafeno¹⁹. Es altamente probable que este material grafitico cristalino se forme a partir de fragmentos que podrían desprenderse luego de la irradiación de los pMWCNT. Sin embargo, es muy difícil poder realizar un análisis estadístico y más aún visualizar un descenso en el radio y longitud de los MWCNT.

Figura 4.8. Microscopía HR-TEM de la muestra pMWCNT (panel superior) y de la muestra 350I-MWCNT (panel inferior).

4.4.1.7. Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS)

La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X ha resultado de gran ayuda para determinar no solo la identidad de los metales que componen los remanentes de catalizadores metálicos sino también para identificar el lugar donde se encuentran. Para ello, se utilizó el bombardeo con Argón ionizado con el objetivo de retirar las capas más externas y analizar los elementos que se encuentran ubicados dentro del nanotubo. Para obtener el espectro XPS de los pMWCNT se goteó una suspensión sobre un soporte de Si metálico y se secó a 60° con una estufa de vacío por 8h. El análisis XPS de pMWCNT muestra la presencia de trazas de Fe, Co y Al en la cara externa del nanotubo. Hay un claro aumento de la señal tanto del Fe como del Co con el aumento del tiempo de bombardeo de Argón y el Ni solo se observa luego del tratamiento, indicando su alojamiento en el centro del nanotubo.

La energía de enlace correspondiente a Al 2p_{3/2} observada a 75.5 eV concuerda con la del grafito recubierto con alúmina²⁰ y con films compuestos de óxidos de aluminio. Lamentablemente, el análisis detallado

no puede concretarse de manera exitosa debido a que los satélites de silicio se superponen a las señales correspondientes al Al.

En la parte interna del nanotubo encontramos Ni, Fe y Co, aunque también se observan pequeñas trazas de Fe y Co en la superficie. Dentro del nanotubo, el Fe está presente como Fe⁰ y FeO, dado que se observan los picos característicos 2p_{3/2} a 707 y 710 eV respectivamente, separados por 12.7 eV de la correspondiente componente spin-orbital 2p_{1/2}. En la superficie, el Fe se encuentra mayormente oxidado, ya que solo se observa el pico característico del FeO a 710 eV. La región 2p del Co muestra picos a 778.9, 781.5 y entre 784-787 eV, característicos de Co⁰, CoO y satélites de Co (II) respectivamente. Los picos del Ni 2p _{3/2} a 853.2 eV con componentes spin-órbita 2p_{1/2} a 870.6 eV y satélites a 859.2 y 875.6 eV son características de Ni metálico⁸. El C1s muestra contribuciones a 284.5, 285.2, 287.1, 289.1 y 291 eV en línea con estudios previos^{21,22}. Las bandas con energías de 287.1, 289.1 y 291 eV están asignadas a átomos de carbono unidos a átomos de oxígeno, carbonatos absorbidos y satélites p-p, respectivamente^{21,22}. Los picos a 284.5 y 284.0 (asimétricos) y el de 285.2 eV (simetría Gaussiana) se atribuyen generalmente a átomos de carbono de carácter sp² dentro de un entorno grafitico y a átomos de carbono con carácter sp³ presentes en la estructura regular del nanotubo. Sin embargo, dado que las muestras fueron expuestas a la atmósfera, el contacto con trazas de carbono adventicio afecta la correcta interpretación de los picos anteriores, por lo que no es correcto estimar la relación carbono sp²: sp³.

De la deconvolución de los picos correspondientes a O1s, se puede observar una banda mayoritaria a 533 eV y dos contribuciones más pequeñas a 531.9 y 534.8 eV respectivamente. La contribución a 531.9 y 533.1 eV confirma la presencia de grupos funcionales hidroxilos y carboxilos presentes en la superficie del pMWCNT⁸.

Las contribuciones de los picos del C1s y del O1s para la muestra de 350I-MWCNT son bastante similares a aquellas observadas para los pMWCNT. Cabe destacar que cuando se bombardean los pMWCNT con argón, aparece un nuevo pico a 284.0 eV, que podría ser asignado a carbono con carácter sp² y/o a carbono amorfo en una superficie de níquel⁸. Esto concuerda perfectamente con el hecho de que el bombardeo de Ar expone el interior de los nanotubos, en donde se hallan las impurezas de Ni.

Si se considera el factor de sensibilidad experimental para los distintos elementos y el área de cada pico, y no se toma en cuenta la contribución de la señal a 284.6 eV, las composiciones promedio de cada elemento de la superficie para pMWCNT, 350I-MWCNT y de las muestras bombardeadas con argón son: C₁O_{1.25}Fe_{0.013}Co_{0.008}, C₁O_{0.98}Fe_{0.014}Co_{0.007} y C₁O_{0.07}Fe_{0.5}Co_{0.2}Ni_{0.2}, respectivamente.

Como el bombardeo con Ar modifica directamente el grosor del nanotubo, se observa una importante reducción de la cantidad de oxígeno y un incremento en la cantidad de metales presentes dentro del nanotubo.

Por otro lado, hay un decrecimiento de oxígeno del 20% en la superficie de los nanotubos luego de la irradiación a 350 nm, aunque no se ve un cambio significativo en la cantidad residual de Fe y Co luego de la fotólisis.

Figura 4.9. Espectro XPS de la muestra prístina (curva roja), muestra irradiada a 350 nm (curva negra) y luego de los bombardeos con argón.

4.4.1.8. Espectroscopía UV-Vis

Se realizaron los espectros de atenuancia de las suspensiones acuosas de pMWCNT y 350I-MWCNT (10ppm de concentración analítica). Ambos espectros aumentan monótonamente con la longitud de onda decreciente en el rango de 800 a 400 nm, mostrando un amplio pico de absorción a 270 nm que puede ser atribuido a las transiciones ópticas π - π^* ²². Las transiciones de resonancia π -plasmon dominan la parte de alta energía del espectro y se extienden hacia el IR cercano²³. De todas maneras, la contribución de las impurezas a la absorción del π -plasmon no puede descartarse^{23,24}. Como se ve en la figura, los nanotubos irradiados muestran una menor atenuación general que los pMWCNT en suspensiones acuosas. Para evaluar la dispersabilidad, se adicionó dodecil sulfato de sodio (SDS) a ambas muestras, de pMWCNT y de 350I-MWCNT, en una concentración final de 6 mM las que se mantuvieron durante 20 min inmersas en un baño ultrasónico antes de medir el espectro de atenuancia. Es interesante notar que, en presencia de surfactante SDS se observa una mayor atenuancia para la muestra 350I-MWCNT, lo que indica que su superficie es más hidrofóbica que la de los pMWCNT ya que necesita del surfactante para su mejor disolución.

Figura 4.10. Espectro UV visible de los pMWCNT (curva negra) y 350I-MWCNT (curva roja) suspendidos en agua destilada (figura principal) y con agregado de SDS (figura superior derecha).

Todos los experimentos anteriores (4.4.1.1 - 4.4.1.8) demuestran que la luz UV inicia varios procesos fotoquímicos que desencadenan una modificación estructural de la muestra de pMWCNT. En una primera instancia, los ensayos de XDR, Raman y FT-IR indican que existe una modificación estructural del nanotubo como consecuencia de la pérdida de carbono amorfo y de parte de los metales remanentes de los procesos de síntesis. Sin embargo, solo los metales adsorbidos superficialmente se liberan luego de la fotólisis. La existencia de metales en el interior del nanotubo (mayormente Ni y Fe se detectó por XPS utilizando bombardeos con argón ionizado capaz de eliminar las capas externas del MWCNT).

Los ensayos termogravimétricos indican la presencia de estructuras más resistentes térmicamente, es decir menos oxidadas, luego de la interacción de los pMWCNT con la luz UV. Los residuos remanentes de la muestra 350I-MWCNT luego del análisis térmico corresponden a los restos de metales dentro del nanotubo, en línea con los ensayos anteriores.

Por otra parte, las microfotografías de HR-TEM muestran estructuras grafiticas luego de la fotólisis, posiblemente como resultado del desprendimiento de las capas más externas del nanotubo. Los ensayos de espectroscopía UV-Vis concuerdan con estas observaciones, ya que puede notarse un aumento de la hidrofobicidad de la muestra de 350I-MWCNT en presencia de un surfactante.

Los mecanismos por los cuales se generan estas modificaciones en la muestra de pMWCNT serán investigados a continuación.

4.4.1.9. Espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR)

Con el objetivo de estudiar la producción de especies reactivas generadas por interacción con la luz se hicieron estudios de espectroscopía de resonancia paramagnética (EPR) utilizando DMPO como agente atrapante. La irradiación de las muestras se realizó con una SolarBox® equipada con una lámpara de xenón como sistema de irradiación. El protocolo se describió en detalle en el Capítulo 2: “Materiales y métodos experimentales”. Los resultados se muestran en la figura 4.11. Si observamos el espectro EPR de la muestra de pMWCNT, puede verse que, además de los picos característicos del radical OH a 3475, 3470, 3485 y 3500 Gauss, se nota la presencia de muchas otras bandas, indicando la generación de otro tipo de radicales del carbono²⁵. El programa WinSim (NIEHS/NIH) permitió simular sólo el espectro de pMWCNT. Estos resultados concuerdan con los resultados de Raman y FT-IR y ofrecen información acerca del efecto de la luz en la muestra prístina. Si observamos el espectro de la muestra de 350I-MWCNT y de HCl-MWCNT, podemos notar que no hay formación de especies radicalarias en la muestra previamente irradiada a 350nm y la tratada con ácido clorhídrico, lo que pone en evidencia la importancia de los metales en la generación de las especies reactivas fotoinducidas.

Figura 4.11. Espectro EPR de suspensiones acuosas de pMWCNT (curva bordo), 350I-MWCNT (curva amarilla) y HCl-MWCNT (curva verde). También se muestra la simulación del espectro obtenida para la suspensión de pMWCNT (curva naranja).

4.4.1.10. Experimentos resueltos en el tiempo: *laser flash fotólisis*

Para observar la naturaleza de los transientes generados por irradiación con luz UV, se utilizó un equipo de Flash fotólisis equipado con un láser de Nd:YAQ de 355 nm de longitud de onda, descrito en el Capítulo 2. Se realizaron medidas para las muestras pMWCNT, 350I-MWCNT y HCl-MWCNT cuyos análisis se presentan a continuación.

En primer lugar, durante el pulso del Láser (del orden de los ns), se nota el fotoblanqueo, es decir la destrucción de un fluoróforo por irradiación con luz de alta intensidad.

Figura 4.12. Tiempo de decaimiento de los transitorios fotogenerados para la muestra de pMWCNT (transitorio A, curva negra y transitorio B, curva roja) y para la muestra de 350I-MWCNT (curva azul). En el cuadro superior derecho pueden observarse los espectros de absorción de todas las especies transitorias detectadas.

En la muestra de pMWCNT, luego del fotoblanqueo puede observarse la formación y el decaimiento consecutivo de dos especies transitorias con tiempos de vida de 49 y 321 ns, respectivamente. En la figura 4.12, se puede distinguir tanto el tiempo de vida como el espectro de absorción de ambos transientes (curva negra (pMWCNT A) y roja (pMWCNT B)). Por otra parte, la muestra 350I-MWCNT solo muestra la formación de un solo transiente luego del pulso láser, con un tiempo de decaimiento de 337 ns (espectro de absorción azul en la figura 4.12). Por último, la muestra de HCl-MWCNT no revela, en el rango de longitudes de onda de trabajo, la formación de transientes luego del pulso flash (figura 4.13).

Figura 4.13. Tiempo de decaimiento obtenido para la muestra de HCl-MWCNT (línea punteada roja) junto con el espectro obtenido luego del fotoblanqueo para la muestra de HCl-MWCNT (cuadro superior derecho).

En concordancia con los estudios relacionados con SWCNT suspendidos en DMF y en ausencia de oxígeno, la formación de excitones a partir de la fotólisis se presenta como una banda pequeña con un tiempo de vida muy corto, correspondiente a la transferencia fotoinducida de un electrón desde el nanotubo a los aceptores²⁶.

El espectro de absorción de transitorios de la muestra de pMWCNT consiste en una banda ancha comprendida entre 370 y 800 nm (pMWCNT A). Este comportamiento se asemeja a lo reportado en la literatura para el único transitorio (SWCNT^{•+}) formado luego de la irradiación con un láser de 355 nm de SWCNT dispersos en ACN²⁷.

Por otra parte, aquellos transitorios con una banda de absorción en el intervalo de 360 y 450 nm (pMWCNT B) muestran la absorción en el mismo rango de longitudes de onda que los “huecos” positivos en el pMWCNT²⁸.

Por otra parte, los transientes con absorción máxima entre los 400 y 450 nm pueden atribuirse a los radicales catiónicos fenólicos con tiempos de vida en solventes orgánicos en el rango de cientos de ns^{29,30}.

Asimismo, la banda ancha que se encuentra entre los 490 y 580 nm concuerda con la correspondiente a los radicales anión $\text{SWCNT}^{\bullet-}$ en solventes orgánicos^{27,31}.

Tomando en cuenta la combinación lineal de los espectros de los radicales catiónicos para el resorcinol y catecol³⁰ y aquellos para $\text{SWCNT}^{\bullet-}$ (figura 4.14), se obtiene un espectro que concuerda con el transiente B observado en la fotólisis de pMWCNT.

Figura 4.14. Espectros del transitorio observado (pMWCNT B) en superposición para los espectros correspondientes a los radicales $\text{SWCNT}^{\bullet-}$ y los radicales catiónicos del resorcinol y catecol.

Para la muestra de 350I-MWCNT, luego de la irradiación con 355 nm se observa la aparición de una especie transitoria con tiempo de vida cercano a los 350 ns. Considerando que, tanto las capas externas del nanotubo como el carbono amorfo se encuentran oxidados, es de esperar que la reactividad química se deba principalmente a este tipo de estructuras, ya que los átomos de carbono con carácter sp^2 en los planos con un electrón π deslocalizado resultan ser menos reactivos. Sin embargo, la contribución de radicales catiónicos fenólicos presentes dentro del carbono amorfo o en la superficie oxidada no puede ser descartada.

Las especies transitorias formadas luego de la irradiación de la muestra 350I-MWCNT revelan una banda ancha entre los 490 y 580 nm, similar a aquellos radicales deslocalizados $\text{SWCNT}^{\bullet-}$ suspendidos en solventes orgánicos. Por otro lado, la absorción de transitorios en el intervalo desde 370 a 450 nm puede ser atribuida a los radicales catiónicos $\text{SWCNT}^{\bullet+}$ ²⁷ en coincidencia con la absorción de los espectros transitorios observada con la combinación lineal de $\text{SWCNT}^{\bullet-}$ y $\text{SWCNT}^{\bullet+}$ descrita por distintos autores (figura 4.15). Sin embargo, el pico a 560 nm no pudo ser asignado.

Figura 4.15. Espectros del transitorio observado (350I-MWCNT) en superposición con los espectros correspondientes a los radicales $\text{SWCNT}^{\bullet-}$ y $\text{SWCNT}^{\bullet+}$ con fines comparativos.

La muestra de HCl-MWCNT con una cantidad mínima de metales adsorbidos, no revela la formación de especies transitorias luego de la irradiación con 355 nm. Sin embargo, los metales remanentes y el carbono amorfo con terminaciones ricas en oxígeno juegan un papel importante en la generación de separaciones de carga fotoinducida de los MWCNT. De hecho, en la literatura se plantea el rol fundamental que juegan los defectos superficiales en la electroreducción del O_2 a H_2O_2 por electrodos modificados con nanotubos de carbono de pared doble (DWCNT)³².

De acuerdo con la evidencia previa, se propone un mecanismo de reacción posible cuando la muestra de pMWCNT se irradia con luz a longitudes de onda entre 350 y 355 nm, tal como se detalla en la figura 4.16. La excitación de suspensiones de pMWCNT con el pulso láser conduce a la formación de excitones (pMWCNT A en la reacción (1)). Posteriormente el hueco generado se transfiere a la impureza metálica adsorbida en la superficie del nanotubo, formando un estado de separación de carga (pMWCNT B en la reacción (2)), en concordancia con el mecanismo reportado para la excitación de ensamblados de $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{NTC}$ y TiO_2/CNT ³³. Una de las posibilidades luego de la formación de excitones es su recombinación acompañado de la liberación de calor o emisión de luz (reacción (-1)). La recombinación rápida podría ser el mecanismo principal para los excitones que se forman en la muestra de HCl-MWCNT.

En muestras saturadas con oxígeno molecular, los radicales $\text{MWCNT}^{\bullet-}$ deberían reaccionar eficientemente con el oxígeno generando O_2^- (reacción (3)). Si bien esta especie no fue detectada en los experimentos de resonancia paramagnética electrónica (EPR), sí se pudo detectar su producto de recombinación, H_2O_2 , en concentraciones apreciables ($[\text{H}_2\text{O}_2]_{\text{pMWCNT}}=15\text{mM/h}$ y $[\text{H}_2\text{O}_2]_{350\text{I-MWCNT}}=103\text{mM/h}$) bajo irradiación con lámpara monocromática a 350nm. Muy probablemente, la recombinación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ con la superficie del nanotubo (reacción (4)) ocurre mucho más rápido que la reacción entre el $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el agente atrapante usado en los ensayos de EPR, impidiendo la detección por esta última técnica. Estas observaciones están en línea con lo informado en la literatura, que indica que los radicales libres no son observados en presencia de H_2O_2 y que los pMWCNT muestran la capacidad de desactivar especies radicalarias en contacto con una fuente externa de radicales superóxido o hidroxilo^{34,35}. Cuando hablamos de la muestra de pMWCNT estamos considerando los grupos con alto contenido de oxígeno, presentes tanto en el carbono amorfo como en la superficie y los extremos de los MWCNT. Los radicales aniones $\text{MWCNT}^{\bullet-}$ presentes en la superficie oxidada del nanotubo, podrían conducir a la eliminación de moléculas más oxidadas y a la formación de radicales en la superficie, denominados $\bullet\text{MWCNT}$ (reacción (5)), en línea con la detección por EPR de radicales $\bullet\text{RCH}_2$ y en concordancia con las reacciones de sustitución de radicales aniones aromáticos propuestas en la literatura^{36,37}. La reacción (6) muestra la desactivación de los huecos en los óxidos metálicos por el carbono amorfo. Las reacciones (5) y (6) plantean la remoción de los grupos oxidados en la superficie del nanotubo y del carbono amorfo presente en forma de cadenas o aglomerados sin ningún tipo de orden (confirmado por la reducción del radio A_D/A_G en Raman en las muestras luego de la fotólisis). Además, los espectros de XPS y FT-IR obtenidos luego de la fotólisis con luz de 350 nm confirman la ausencia/ reducción de las bandas correspondientes a grupos oxidados superficiales.

Un esquema de reacción similar podría ser aplicado a 350I-MWCNT. La diferencia en la naturaleza de los transitorios en el estado de separación de

carga (reacción (2)) observada tanto para pMWCNT como para 350I-MWCNT, está evidentemente relacionada con la cantidad de oxígeno en la porción de carbono amorfo y en las estructuras gráficas presentes en la superficie y en los extremos del MWCNT. La formación de grafito y probablemente hojas de grafeno en contacto con las impurezas metálicas podrían actuar como aceptores del hueco en los estados de separación de carga generados luego de la fotólisis a 350 nm de la muestra de 350I-MWCNT.

$\text{MWCNT/IR} + h\nu (355\text{nm}) \rightarrow (e^- - h^+)\text{MWCNT/IR}$	Formación del excitón (1)
$(e^- - h^+)\text{MWCNT/IR} \rightarrow \text{MWCNT/IR} + \text{calor o luz}$	Recombinación del excitón (-1)
$(e^- - h^+)\text{MWCNT/IR} \rightarrow (e^-)\text{MWCNT/IR}(h^+)$	Estado de separación de carga (2)
$(e^-)\text{MWCNT/IR}(h^+) + \text{O}_2 \rightarrow (\text{O}_2^{\bullet-})\text{MWCNT/IR}(h^+)$	Formación de superóxido absorbido (3)
$(\text{O}_2^{\bullet-})\text{MWCNT/IR}(h^+) \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{MWCNT/IR}(h^+)$	Recombinación del superóxido absorbido (4)
$(e^-)\text{MWCNT/IR}(h^+) \rightarrow \text{C}_{\text{ox}}^- + \bullet\text{MWCNT/IR}(h^+)$	Reacciones de $\bullet\text{MWCNT}$ en los extremos (5)
$\text{MWCNT/IR}(h^+) \rightarrow \text{MWCNT/IR}_{\text{ox}}$	Oxidación del hueco del carbono amorfo (6)

Figura 4.16. Esquema propuesto para la reacción de la muestra de MWCNT prístina cuando es irradiada con luz de 350 nm. Las impurezas residuales como el carbono amorfo o los residuos metálicos se denotan como IR mientras que C_{ox}^- corresponden a moléculas oxidadas del carbono.

4.4.1.11. Conclusiones

Si evaluamos todos los resultados de la sección 4.4.1, podríamos afirmar que la fotólisis a 350 nm conduce a una muestra con menos desórdenes estructurales (demostrado por Raman) y un menor contenido de grupos oxidados superficiales (XPS y FT-IR). Estas observaciones se encuentran en línea con las estructuras de carbono que son más difíciles de oxidar y la baja dispersabilidad observada luego de la fotólisis (TGA y espectroscopía UV-visible). Se podría pensar que la formación de material gráfico altamente ordenado (observado por HR-TEM) proviene de la ruptura de las paredes de los pMWCNT. Los ensayos de XPS y DRX sugieren que la fotólisis remueve solo parcialmente los residuos metálicos que provienen de la síntesis. Estudios de irradiación continua con láser de 1064 nm de alta intensidad publicados en la literatura³⁸ concuerdan con los estudios aquí desarrollados, donde por acción de la luz se produce la ruptura de los enlaces C-C y la formación de nuevas estructuras de grafeno en una superficie de sílice. Los autores de este estudio atribuyeron este efecto a un aumento de la temperatura inducida por la luz. Sin embargo, no debe descartarse que los láseres de alta intensidad suelen dar lugar a reacciones multifotónicas, donde podrían alcanzarse efectos similares a los aquí planteados mediante el uso de lámparas.

Las distintas técnicas empleadas en esta sección resultaron ser una base sólida para demostrar que los catalizadores metálicos, el carbono amorfo (con grupos superficiales ricos en oxígeno) y los grupos oxidados presentes en la superficie y en los extremos del MWCNT juegan un rol fundamental en la generación de estados fotoinducidos de separación de carga en el nanotubo. En línea con lo discutido en la literatura para los análogos SWCNT, la transferencia del hueco generado a los óxidos metálicos y la subsecuente reacción con las especies que contienen carbono oxidado sería el mecanismo más plausible que interpreta los efectos producidos por la irradiación. Como consecuencia directa de la oxidación inducida por luz, obtenemos la fragmentación de los residuos oxidados y la formación de radicales $\bullet$ MWCNT. Finalmente, el desprendimiento de estos residuos oxidados culmina con la exposición de las capas más internas (y reducidas) del nanotubo, aumentando la hidrofobicidad de la muestra.

4.4.2. Ensayos con luz monocromática con máximo de emisión a 575 nm

En esta sección se detallan aquellos ensayos realizados utilizando luz monocromática comprendida en el visible (575 ± 5 nm) como fuente de irradiación. El protocolo de irradiación se halla detallado en el Capítulo 2: “Materiales y métodos experimentales”, en este caso la muestra de pMWCNT irradiada con esta fuente de luz se denominó 575I-MWCNT.

Si tenemos en cuenta el análisis XPS de los nanotubos prístinos previamente mostrados en la figura 4.9, pueden observarse los picos característicos de una superficie de alúmina recubierta por carbono grafitico, con una conductividad térmica y eléctrica muy elevada, característica del sistema³⁹. El estudio de este sistema no es trivial ya que además de los efectos fotoquímicos generados bajo irradiación con UV, también podrían existir efectos térmicos generados por la irradiación con mayores longitudes de onda como la de 575nm, capaces de modificar la naturaleza de este NM. Estudios anteriores describen que la presencia de luz visible genera cambios en los módulos elásticos del nanotubo⁴⁰ generando también una eficiente separación de cargas⁴¹ en muestras de SWCNT. Estas modificaciones podrían verse alteradas por la presencia de metales catalíticos interaccionando con la red de carbono y modificando su estructura. Es por ello que el efecto de la luz a 575nm merece ser estudiado en profundidad irradiando con lámparas en forma de asegurar la presencia de eventos de excitación monofotónicos únicamente.

4.4.2.1. Difracción de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de la muestra de pMWCNT, HCl-MWCNT y 575I-MWCNT se pueden distinguir en la figura 4.17. En todas las muestras puede observarse un pico ancho centrado a $2\theta=26.0^\circ$ con alturas distintas. Este comportamiento sugiere que el pico está formado por la

superposición de un pico ancho correspondiente a carbono amorfo y un pico fino (002) de carbono grafítico a 26.5° , que corresponde a un interlineado entre la red de grafito de 0,335 nm. El pico fino ubicado cerca de $2\theta=28.0^\circ$ puede ser atribuido a la presencia de impurezas de Fe_3C adsorbidos superficialmente⁷. El patrón de difracción del NiO (200) a 43.21° ⁸ se observa en todas las muestras, aún en las tratadas con HCl, tal como se discutió anteriormente.

Figura 4.17. Patrón difracción de rayos X (DRX) de una muestra de pMWCNT, 575I-MWCNT Y HCl-MWCNT.

4.4.2.2. Espectroscopía Raman

Los espectros Raman de las muestras de pMWCNT y de 575I-MWCNT se presentan en la figura 4.18. Ambos espectros muestran las formas características de los picos de los MWCNT: la banda G asimétrica aproximadamente en 1580 cm^{-1} y por otro lado las bandas dispersivas D y D' ubicadas aproximadamente en 1350 y 1620 cm^{-1} , respectivamente, con intensidades dependientes del número de defectos presentes en la muestra⁹. Como describimos anteriormente, la banda D refleja la presencia de defectos en los sistemas de carbono¹⁰ y está relacionada con

la presencia de carbono amorfo¹¹ mientras que la banda D' está asociada con los desórdenes que se introducen por la funcionalización y la tensión, de materiales basados en grafito¹². La banda D' aumenta a medida que aumentan los defectos en el carbono, cambiando la hibridación del carbono y por lo tanto las vibraciones detectadas mediante esta técnica.

Si analizamos la razón A_D/A_G , mientras que los pMWCNT tienen un valor de 1.5 ± 0.1 , en el caso de la muestra de 575I-MWCNT dicha relación vale 0.8 ± 0.1 . Este descenso en la relación A_D/A_G podría sugerir una pérdida de carbono amorfo, pero no una disminución de los desórdenes estructurales del nanotubo, como sucede en el caso de 350I-MWCNT, ya que puede apreciarse un aumento de la banda D', relacionada con la inserción de defectos estructurales en la red del carbono.

Figura 4.18. Espectroscopía Raman de pMWCNT y 575I-MWCNT.

4.4.2.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

En la figura 4.19 se presentan los espectros FT-IR de las muestras de 575I-MWCNT y de pMWCNT y HCl-MWCNT con fines comparativos. Bajo irradiación con 575 nm, puede notarse un descenso de la banda a 1200 cm^{-1} (banda D) y de la banda a 1550 cm^{-1} (banda G), atribuible a la vibración de los enlaces C-C conjugados, en concordancia con los análisis de Raman presentados en la sección anterior, relacionando el descenso de la banda G y el aumento de la D'.

Cabe destacar, sin bien las muestras de 575I-MWCNT presentan una disminución en la zona atribuida a los óxidos de metales, estas no descienden completamente indicando que aún se encuentran metales adsorbidos a nivel superficial, observándose aún después de la irradiación el pico a 639 cm^{-1} atribuible a óxidos metálicos tal como se discutió anteriormente.

Figura 4.19. FTIR de pMWCNT (curva azul), HCl-MWCNT (curva verde) y 575I-MWCNT (curva naranja).

4.4.2.4. Termogravimetría analítica (TGA)

Los ensayos de TGA se presentan en la figura 4.20. Puede observarse que 610°C es el punto de mayor pérdida de peso para la muestra de pMWCNT, con una masa final residual del 24% del peso inicial.

Figura 4.20. Análisis termogravimétrico de la muestra de pMWCNT (curva bordo), 350-MWCNT (curva verde).

Por otra parte, la curva perteneciente a los 575I-MWCNT presenta un cambio en la curva de la derivada y puede observarse que los procesos de oxidación ocurren en el intervalo de temperaturas entre 610-680°C, confirmando la generación de estructuras más resistentes debido a una modificación superficial, defectos o acortamientos inducidos por la luz¹⁴.

En la figura 4.21 puede observarse el patrón de difracción de la muestra de 575I-MWCNT luego del tratamiento térmico con la presencia de picos a $2\theta = 35.5, 43, 47, 63.2$ y 67° . Estos picos son atribuibles al Fe_2O_4 , NiO y Co_2O_3 respectivamente, indicando que los residuos remanentes luego del tratamiento térmico pertenecen a los metales alojados inicialmente en el nanotubo.

En este caso la masa residual de la muestra de 575I-MWCNT luego del tratamiento térmico resulta un 14% mayor que para la muestra de pMWCNT, sugiriendo un aumento de la concentración relativa de metales en la muestra irradiada, probablemente debido a la pérdida de carbono amorfo y a la oxidación de las láminas de grafeno, en concordancia con los resultados obtenidos por espectroscopia Raman.

Figura 4.21. Difracción de rayos X de las cenizas del TGA de la muestra de 575I-MWCNT.

4.4.2.5. Adsorción UV-Vis

En la figura 4.22 se muestran los espectros de atenuancia de las suspensiones acuosas de la muestra de pMWCNT y 575I-MWCNT (10ppm de concentración analítica). Puede observarse un amplio pico de absorción a longitudes de ondas cercanas a 270 nm en ambas muestras, atribuidas a las transiciones ópticas π - π^{*22} . Si bien es mínima la diferencia, los nanotubos irradiados presentan una menor atenuación que los prístinos. Sin embargo, el agregado de dodecil sulfato sódico (SDS) a una concentración de 6mM, permite obtener espectros de atenuancia similares entre ambas muestras, sugiriendo que la modificación superficial de los nanotubos por acción de la luz visible no es tan pronunciada como en el caso de la UV (figura 4.10. cuadro superior derecho).

Figura 4.22. Espectro UV visible de los pMWCNT (curva negra) y 575I-MWCNT (curva roja) suspendidos en agua destilada (figura principal) y con agregado de SDS (recuadro superior derecho).

4.4.2.6 Experimentos resueltos en el tiempo: laser flash fotólisis

Estos experimentos se desarrollan excitando con luz de 350 nm las muestras previamente irradiadas con lámparas de 575 nm, 575I-MWCNT, con el objetivo de observar el tipo de transientes que estas muestras son capaces de generar y obtener así información más detallada sobre las modificaciones introducidas por la luz visible. Tal como se describió anteriormente, para la observación de los transientes fotogenerados se utilizó un equipo de Flash Fotólisis equipado con un Laser Nd:YAG utilizando el armónico correspondiente a 355 nm. Luego del pulso láser, la muestra de 575I-MWCNT presenta la formación de un solo transiente con tiempo de vida de 127 ns (figura 4.23), mucho menor que aquellos observados para la muestra de pMWCNT y 350I-MWCNT. Los espectros obtenidos para los transientes fotogenerados están graficados en el cuadro superior derecho de la figura 4.22. El espectro del transiente observado muestra un pico entre 500 y 600 nm, que podría ser atribuido a especies radicalarias MWCNT^{•-} y otro a longitudes de onda < 450 nm atribuibles a radicales catiónicos MWCNT^{•+} en línea con lo observado para los espectros de láser flash fotólisis de los 350I-MWCNT²⁷.

Figura 4.23. Tiempo de decaimiento de las especies transitorias fotogenerados para la muestra de pMWCNT (transitorio A, curva negra y transitorio B, curva roja) y para la muestra de 575I-MWCNT (curva azul). En el cuadro superior derecho pueden observarse los espectros de absorción de las especies transitorias detectadas.

La producción de H_2O_2 medida para la muestra de 575I-MWCNT es de 90mM (cercana a la de la muestra 350I-MWCNT, cercana a los 100mM de H_2O_2). Esto indica que la producción de ERs bajo irradiación a 355nm se produce a partir de la formación del excitón y la posterior separación del par hueco-electrón. La evidencia sugiere que los procesos fotoquímicos que se desencadenan en la muestra de 575I-MWCNT son muy similares a los 350I-MWCNT. En la figura 4.24 se muestra un espectro FT-IR de la muestra de 575I-MWCNT y se compara con el de 350I-MWCNT, en donde puede observarse que la muestra de 575I-MWCNT aún posee metales adsorbidos superficialmente luego de la fotólisis debido a la aparición de picos entre $690-530\text{ cm}^{-1}$. La presencia de metales adsorbidos podría afectar la estabilidad temporal del transiente fotogenerado, dando lugar al descenso en el tiempo de vida observado.

Figura 4.24. Espectro FT-IR de 575I-MWCNT(curva verde) y 350I-MWCNT (curva azul).

4.4.2.7. Conclusiones

A lo largo de la sección 4.4.2 se estudió la interacción entre la muestra de pMWCNT y la luz visible ($575 \pm 5 \text{ nm}$). Los ensayos de espectroscopía Raman sugieren una modificación estructural de la red del carbono en el nanotubo, generado por la inserción de defectos entre los anillos de carbono con carácter sp^2 , modificando la banda D'. El descenso de la banda D y G sugiere que, luego de la irradiación con luz visible, la cantidad de carbono amorfo y los defectos superficiales de la muestra de pMWCNT se verían disminuidos. Sin embargo, la espectroscopía UV-Vis no muestra cambios importantes en los espectros de atenuancia en ausencia y presencia del surfactante, lo que sugiere que no hay desprendimientos significativos de las capas más externas del nanotubo irradiando con luz visible.

Los resultados obtenidos por FT-IR revelan que la radiación a 575 nm no logra remover en su totalidad la cantidad de metales catalíticos

adsorbidos superficialmente, en concordancia con los ensayos de DRX y TGA.

Sin embargo, los ensayos de TGA sugieren la formación de estructuras más resistentes luego de la irradiación, lo que estaría de acuerdo con la eliminación (oxidación) del carbono amorfo como resultado de los procesos fotoinducidos.

Los estudios resueltos en el tiempo mostraron la fotogeneración de una especie transitoria con un tiempo de vida mucho menor que los detectados para los transitorios de la muestra de pMWCNT y 350I-MWCNT, aunque con un espectro similar. Si se tienen en cuenta las consideraciones sugeridas por otros autores, el menor tiempo de vida observado para este transiente podría explicarse considerando que la luz visible es capaz de generar sitios de distinta tensión entre las redes del carbono que dan lugar a una rápida desactivación de los transientes.

Estos resultados son consistentes con la detección por XPS en la muestra de pMWCNT de un sistema de alúmina (Al_2O_3 presente como la impureza mayoritaria en la muestra) recubierto por grafito. En la literatura se plantean que este sistema tiene una conductividad térmica particular, característica del mismo³⁹. También se plantea la modificación de los módulos elásticos en los análogos SWCNT⁴¹, por acción de la irradiación visible. Todos estos datos sumados a que no se detectaron ERs por la técnica de EPR bajo radiación visible, sugieren que las modificaciones realizadas en el nanotubo por acción de la luz visible se deben principalmente a un aumento local y pronunciado de la temperatura, insertando defectos en la red del nanotubo. Esta reactividad frente a la luz visible coloca a este NM entre los NM potencialmente más peligrosos, una vez que son desechados en un entorno natural.

4.5. Referencias

1. Wong, C. H. A. *et al.* Synthetic routes contaminate graphene materials with a whole spectrum of unanticipated metallic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 13774–13779 (2014).
2. Šljukić, B., Banks, C. E. & Compton, R. G. Iron oxide particles are the active sites for hydrogen peroxide sensing at multiwalled carbon nanotube modified electrodes. *Nano Lett.* **6**, 1556–1558 (2006).
3. Salehi-Khojin, A. *et al.* On the sensing mechanism in carbon nanotube chemiresistors. *ACS Nano* **5**, 153–158 (2011).
4. Bokobza, L. & Zhang, J. Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. *Express Polym. Lett.* **6**, 601–608 (2012).
5. Zhang, L. *et al.* Effects of intense laser irradiation on Raman intensity features of carbon nanotubes. *Phys. Rev. B* **65**, 10–13 (2002).
6. Pérez Del Pino, Á., György, E., Cabana, L., Ballesteros, B. & Tobias, G. Ultraviolet pulsed laser irradiation of multi-walled carbon nanotubes in nitrogen atmosphere. *J. Appl. Phys.* **115**, (2014).
7. Karmakar, S., Sharma, S. M., Teredesai, P. V. & Sood, A. K. Pressure-induced phase transitions in iron-filled carbon nanotubes: X-ray diffraction studies. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **69**, 1–5 (2004).
8. Mallard, P. J. L. and W. G. *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69* (2019).
9. Zdrojek, M., Gebicki, W., Jastrzebski, C., Melin, T. & Huczko, A. Studies of Multiwall Carbon Nanotubes Using Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Solid State Phenom.* **99–100**, 265–268 (2009).
10. Bokobza, L. & Zhang, J. Raman spectroscopic characterization of multiwall carbon nanotubes and of composites. **6**, 601–608 (2012).
11. Osswald, S., Flahaut, E., Ye, H. & Gogotsi, Y. Elimination of D-band in Raman spectra of double-wall carbon nanotubes by oxidation. **402**, 422–427 (2005).
12. Chakrapani, N., Curran, S., Wei, B. & Ajayan, P. M. Spectral fingerprinting of structural defects in plasma-treated carbon nanotubes. 2515–2521 (2003).
13. White, C. M., Banks, R., Hamerton, I. & Watts, J. F. Progress in Organic Coatings Characterisation of commercially CVD grown multi-walled carbon nanotubes for paint applications. *Prog. Org. Coatings* **90**, 44–53 (2016).
14. Lehman, J. H., Terrones, M., Meunier, V., Mansfield, E. & Hurst, K. E. Evaluating the characteristics of multiwall carbon. *Carbon N. Y.* **49**, 2581–2602 (2011).
15. Avile, F. Evaluation of mild acid oxidation treatments for MWCNT functionalization. **7**, 5–10 (2009).

16. Liu, L., Wang, D. & Hu, Y. RSC Advances. *RSC Adv.* **5**, 103365–103372 (2015).
17. Lu, C., Su, F. & Hu, S. Surface modification of carbon nanotubes for enhancing BTEX adsorption from aqueous solutions. *Appl. Surf. Sci.* **254**, 7035–7041 (2008).
18. Brunauer, S., Emmett, P. H. & Teller, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 309–319 (1938).
19. Tang, D. *et al.* Preparation of alumina-coated graphite for thermally conductive and electrically insulating epoxy composites. *RSC Adv.* **5**, 55170–55178 (2015).
20. Tang, D. *et al.* RSC Advances thermally conductive and electrically insulating. *RSC Adv.* **5**, 55170–55178 (2015).
21. Datsyuk, V. *et al.* Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **6**, 2–9 (2008).
22. Ago, H. *et al.* Work Functions and Surface Functional Groups of Multiwall Carbon Nanotubes. 8116–8121 (1999).
23. Itkis, M. E., Perea, D. E., Jung, R., Niyogi, S. & Haddon, R. C. Comparison of Analytical Techniques for Purity Evaluation of Single-Walled Carbon Nanotubes. 29–37 (2005).
24. Zhao, B. *et al.* Study of the Extinction Coefficients of Single-Walled Carbon Nanotubes and Related Carbon Materials. 8136–8141 (2004).
25. Roppolo, I., Chiappone, A., Porro, S., Castellino, M. & Laurenti, E. Study of benzophenone grafting on reduced graphene oxide by unconventional techniques. *New J. Chem.* **39**, 2966–2972 (2015).
26. Ohtani, M. & Fukuzumi, S. Solubilization and photoinduced electron transfer of single-walled carbon nanotubes wrapped with coenzyme Q 10 w. 4997–4999 (2009) doi:10.1039/b910080f.
27. Alvaro, M., Aprile, C., Ferrer, B. & Garcia, H. Functional Molecules from Single Wall Carbon Nanotubes . Photoinduced Solubility of Short Single Wall Carbon Nanotube Residues by Covalent Anchoring of. 5647–5655 (2007).
28. Sci, C., Mart, R. & Javier, F. C. Chemical Science. 470–475 (2012) doi:10.1039/c1sc00609f.
29. Joshi, R. *et al.* Phenol radical cations and phenoxyl radicals in electron transfer from the natural phenols sesamol , curcumin and trolox to the parent radical cations of 1-chlorobutane. 665–674 (2004) doi:10.1002/poc.836.
30. Brede, O. *et al.* Diphenol radical cations and semiquinone radicals as direct products of the free electron transfer from catechol, resorcinol and hydroquinone to parent solvent radical cations. 5096–5104 (2002) doi:10.1039/b205771a.
31. Atienzar, P. An organically modified single wall carbon nanotube containing a pyrene chromophore : fluorescence and diffuse reflectance laser flash photolysis study. **384**, 119–123 (2004).
32. Menezes, H. A. & Maia, G. Electrochimica Acta Specific adsorption of arsenic and humic acid on Pt and PtO films. **55**, 4942–4951 (2010).

33. Zhang, W. De, Xu, B. & Jiang, L. C. Functional hybrid materials based on carbon nanotubes and metal oxides. *J. Mater. Chem.* **20**, 6383–6391 (2010).
34. Tsuruoka, S. *et al.* Radical scavenging reaction kinetics with multiwalled carbon nanotubes. *Carbon N. Y.* **83**, 232–239 (2015).
35. Fenoglio, I. *et al.* Reactivity of carbon nanotubes: Free radical generation or scavenging activity? *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1227–1233 (2006).
36. Holy, N. L. Reactions of the Radical Anions and Dianions of Aromatic Hydrocarbons. *Chem. Rev.* **74**, 243–277 (1974).
37. Masnovi, J. Radical Anions of Esters of Carboxylic Acids. Effects of Structure and Solvent on Unimolecular Fragmentations. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 9081–9089 (1989).
38. Yuan, Y. & Chen, J. Nano-Welding of Multi-Walled Carbon Nanotubes on Silicon and Silica Surface by Laser Irradiation. 1–7 (2016) doi:10.3390/nano6030036.
39. Zhan, G.-D. & Mukherjee, A. K. Carbon Nanotube Reinforced Alumina-Based Ceramics with Novel Mechanical, Electrical, and Thermal Properties. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **1**, 161–171 (2005).
40. Zhang, Y. & Iijima, S. Elastic response of carbon nanotube bundles to visible light. *Phys. Rev. Lett.* **82**, 3472–3475 (1999).
41. Barazzouk, S., Hotchandani, S., Vinodgopal, K. & Kamat, P. V. Single-wall carbon nanotube films for photocurrent generation. A prompt response to visible-light irradiation. *J. Phys. Chem. B* **108**, 17015–17018 (2004).

Capítulo 5: Interacción de nanotubos de carbono con medios acuosos con y sin actividad biológica

Esquemas de procedimientos experimentales

En los siguientes esquemas se sintetizan los procedimientos experimentales discutidos en el capítulo 2 para el caso de los MWCNT.

Esquema 1. Símbolos utilizados en los esquemas 2-8.

Esquema 2: Protocolo seguido para generar la muestra de FpMWCNT y FMWCNT-Irr

Esquema 3. Ensayos realizados en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación UV.

Esquema 4. Ensayos realizados en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación UV en presencia de AH.

Esquema 5. Ensayos realizados en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación visible.

Esquema 6. Ensayos en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación visible en presencia de AH.

Esquema 5. Procedimiento experimental para la generación de las muestras de MWCNT irradiadas con luz solar.

Esquema 6. Ensayos de formación de biofilm en cultivos de *P. aeruginosa* empleando la muestra irradiada con luz solar.

*“Titiritero de mi corazón,
¿cómo piensas salir intacto?
si el que gobierna siempre suelo ser yo,
no me acostumbro a los extraños”*

Capítulo 5: interacción de nanotubos de carbono con medios acuosos con y sin actividad biológica

5.1. Introducción

Como mencionamos anteriormente, los MWCNTs son NMs que representan un potencial peligro para el medioambiente tanto por su propia naturaleza como por la gran cantidad de contaminantes que pueden adsorber. Si bien los MWCNT son materiales lipofílicos, no biodegradables e insolubles en agua y se esperaría que se depositen o precipiten rápidamente, la capacidad de adsorber moléculas de distinta naturaleza hace que formen suspensiones estables, perdurando más tiempo en suspensión. Además, la presencia de restos de metales de catalizadores en íntima asociación con la red del nanotubo, le confiere al sistema una reactividad adicional, sumándole un mayor grado de toxicidad. Es preciso establecer las interacciones de los MWCNTs con el entorno natural para obtener información acerca de los mecanismos de toxicidad de este NM.

Los ensayos detallados en el capítulo anterior concluyen que las impurezas metálicas le confieren a la muestra de MWCNT una particular interacción con la luz, generando reacciones radicalarias, modificando la estructura del MWCNT, la oxidación de los residuos metálicos y la posterior liberación de NPs al medio circundante.

El objetivo del presente capítulo es la evaluación de los MWCNT en un sistema acuoso, donde la composición, fuerza iónica, irradiación lumínica y MOD son similares a las ambientales y cuya contaminación microbiana se simula utilizando bacterias ambientales modelos. Es crucial evaluar los efectos tanto de la muestra prístina como la modificada, ya sea por adsorción de materia orgánica o por la radiación lumínica.

En una primera instancia se detallarán los ensayos correspondientes en un microorganismo modelo en estado planctónico *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) en contacto con MWCNT, en cultivos con o sin radiación monocromática de distintas longitudes de onda, con las muestras de MWCNT prístinos o previamente irradiados, según corresponda, y en presencia o ausencia de MOD. Posteriormente, el estudio se complejizará aún más al evaluar los efectos de los MWCNT cuando se irradian con luz solar natural, con y sin presencia de MOD, en biofilms de *P. aeruginosa*. Por último, la respirometría de fangos activos simulará lo que sucede en un ambiente natural donde se encuentran la microbiota, la MOD y el medio acuoso con su fuerza iónica característica.

5.2. Ensayos de adsorción

La elevada área superficial de los MWCNT junto con su hidrofobicidad característica explica su capacidad de interaccionar fuertemente con moléculas orgánicas del medio circundante. Dado que la MOD está compuesta principalmente por moléculas orgánicas de distinta naturaleza (AH en la parte soluble), es conveniente realizar un estudio de adsorción de estos AH sobre los MWCNT.

La relación entre la absorbancia a 465nm y 665nm (E4/6) está directamente relacionada con el grado de condensación de los residuos aromáticos de los AH¹. Valores altos de E4/6 reflejan la presencia de elevadas proporciones de estructuras alifáticas y bajas proporciones de estructuras aromáticas condensadas, siendo esta relación inversamente proporcional al grado de aromaticidad presente en la muestra.

En los ensayos realizados se mantuvo una concentración constante de MWCNT (10ppm) y se colocaron distintas concentraciones de AH. La muestra se dejó reposar por 3 horas para que se alcance el equilibrio de adsorción y la mezcla se centrifugó a 7000 rpm por 10 min para estudiar la relación E4/6 en el sobrenadante. Los resultados se presentan en la figura 5.1.

Figura 5.1. Círculos azules: E4/6 vs concentración de AH para una muestra de distintas concentraciones de pMWCNT. Círculos verdes: Para una mejor comparación se muestran los valores de la suspensión de AH antes de adsorberse sobre los pMWCNT .

Los resultados pueden interpretarse teniendo en cuenta que las medidas reflejan la adsorción de las moléculas pertenecientes a AH que no se adsorbieron sobre la superficie de los MWCNT². La disminución observada de la relación E4/6 en la solución en equilibrio con los MWCNT con AH adsorbidos indica que se adsorben preferentemente los compuestos aromáticos sobre los MWCNT quedando los alifáticos en suspensión. A medida que se aumenta la concentración de AH por sobre los 20 ppm no se produce mayor adsorción de componentes de AH en los 10ppm de MWCNT usados en los ensayos. Como valor límite máximo podría decirse que 10 ppm de MWCNT son capaces de adsorber al menos su peso en AH². Esta adsorción es muy importante cuando se quieren evaluar los efectos ambientales, porque podría afectar la estabilidad en solución de los MWCNT, el tamaño de los agregados, la composición del medio acuoso, etc.

5.3. Dispersión dinámica de luz (DLS)

Los ensayos de dispersión dinámica de luz nos permiten evaluar comparativamente los tamaños de los aglomerados que se generan de los MWCNT en distintos entornos. Se midieron los tamaños de los pMWCNT en agua destilada, en una matriz inorgánica simulada (MIS) respetando las proporciones de sales detalladas en el capítulo 2: “materiales y métodos ambientales” y en presencia de 10 ppm de AH (con y sin MIS). Los resultados se detallan en la tabla 5.1.

Puede observarse que cuando se encuentran los MWCNT en presencia de AH, como consecuencia de la adsorción de AH se forman aglomerados de menor tamaño. La situación es contraria cuando la muestra se encuentra en un entorno con fuerza iónica elevada: el sistema se comporta de acuerdo a lo previsto por la teoría DLVO³ generando aglomerados muchos más grandes al aumentar la fuerza iónica, aun habiendo AH presentes en solución.

Muestra	Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)
MWCNT- H ₂ O	530	80
MWCNT- AH	490	40
	120	20
MWCNT/MIS	980	121
MWCNT- AH/MIS	1335	258
	5560	50

Tabla 5.1. Distribuciones de tamaños de una muestra de pMWCNT en distintos medios obtenidos por DLS.

5.4. Irradiación con luz solar natural

En el capítulo 4 se detallan los experimentos que concluyen que hay una modificación muy importante cuando la muestra de MWCNT toma

contacto con la luz. Si bien el mayor efecto se ve para longitudes de onda dentro de la región ultravioleta, también hay cambios que no podemos descartar dentro de la región del visible.

Para obtener un panorama más acertado de lo que sucede en un entorno natural, además de simular las condiciones ambientales tales como fuerza iónica y presencia de MOD, resulta muy interesante obtener datos de lo que sucede con la radiación solar natural ya que el espectro de luz solar tiene intensidades que varían según la longitud de onda en un intervalo amplio.

Para realizar los experimentos se utilizó un sistema de cilindros parabólicos concéntricos (CPC) según lo descripto en el capítulo 2: “materiales y métodos experimentales”. Se irradiaron soluciones 10 ppm de MWCNT en MIS en presencia y ausencia de AH.

5.4.1. Demanda química de oxígeno (DQO)

La demanda química de oxígeno fue utilizada como una medida de los cambios globales en el estado de oxidación de los MWCNT. En la figura 5.2 se detalla la DQO en función del tiempo de irradiación normalizado (TW30) para suspensiones de MWCNT en MIS en presencia y ausencia de AH. Para el cálculo de TW30 se asume que en un día perfectamente soleado, la radiación UV media acumulada por dos horas, alrededor del mediodía, es aproximadamente $30\text{W}/\text{m}^2$. El detalle del cálculo de TW30 esta descripto en el capítulo 2: “Materiales y métodos experimentales” sección “2.3.6.3. Luz solar”.

Figura 5.2. Demanda química de oxígeno (DQO) vs TW30 de una muestra 10ppm de MWCNT con (▼) y sin AH (■). DQO de una muestra 10 ppm de AH (●).

La DQO para la muestra de pMWCNT en MIS es cercana a 1000 ppm de O_2 y desciende a medida que se irradia con luz solar. Un comportamiento similar se observa cuando se irradia la muestra de pMWCNT en MIS y AH,

aunque el descenso de DQO es mucho más pronunciado. Los resultados sugieren que las interacciones que existen entre los AH y los MWCNT hacen que los procesos fotoquímicos que se llevan a cabo conduzcan a una mayor DQO, generando una velocidad de oxidación más pronunciada en la muestra. Como control se irradió una suspensión de 10 ppm de AH, y puede notarse un leve aumento en la DQO con el avance del tiempo de irradiación.

5.4.2. Dispersión dinámica de luz (DLS) en MWCNT irradiados

Se realizaron estudios por DLS para observar el efecto que tiene la radiación solar natural en los aglomerados de pMWCNT. Claramente se puede notar que luego de la irradiación aparecen aglomerados de menor tamaño (123 ± 32 nm) coexistiendo con otros de tamaños similares al control en oscuridad, confirmando la ruptura del MWCNT por efecto de la radiación (tabla 5.2).

	Tamaño (nm)	Desviación estándar (nm)
MWCNT	530	80
SI-MWCNT	454	57
	123	32

Tabla 5.2. Distribuciones de tamaño obtenidos por DLS de la muestra prístina (MWCNT) en comparación con la muestra irradiada con luz solar natural (SI-MWCNT).

5.4.3. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Para observar el efecto de la irradiación sobre los MWCNT con distintos tratamientos se realizaron ensayos de FT-IR. Dada la cantidad de muestras y la complejidad de los tratamientos, se optó por adoptar la siguiente nomenclatura (tabla 5.3).

Muestra	Descripción
pMWCNT	Nanotubos multicapa prístinos (sin ningún tratamiento).
AH-MWCNT	Nanotubos multicapa prístinos con ácidos húmicos comerciales Sigma Aldrich® adsorbidos sobre su superficie.
SI-MWCNT	Nanotubos multicapa irradiados con luz solar natural en MIS.
SI-AH-MWCNT	Nanotubos multicapa irradiados con luz solar natural en presencia de Ácidos húmicos Sigma Aldrich® en MIS.

Tabla 5.3. Nomenclatura empleada para los siguientes ensayos.

Tal como se describió en el capítulo 4 y a modo de recordatorio se muestra el espectro FT-IR de los pMWCNT. El mismo revela las bandas de absorción características de los grupos superficiales oxidados y el carbono amorfo: a 3440 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente a la vibración del grupo OH^4 , a 2925 y 2860 cm^{-1} aquéllas correspondientes a las vibraciones asimétricas y simétricas del enlace C-H en carbonos sp^3 , respectivamente y por último las vibraciones del enlace C-O en alcoholes y fenoles a 1391 y 1097 cm^{-1} respectivamente. Se pueden notar pequeños picos alrededor de 1740 cm^{-1} ocasionados por los modos vibracionales de los grupos carbonilos en los ácidos carboxílicos y pequeñas bandas a 1640 y 1540 cm^{-1} que se pueden asignar a las vibraciones de enlaces conjugados C=C y estructuras aromáticas.

Los espectros de AH-MWCNT y SI-AH-MWCNT (figura 5.3) muestran picos más intensos que los correspondientes a la muestra prístina y los picos relacionados a los AH aparecen más estrechos o desplazados que los de la muestra de AH. Particularmente, los picos a 3240 cm^{-1} que se observan únicamente en estas dos muestras han sido asignados a la interacción de los grupos superficiales OH con una superficie de diamante⁵. Los picos en la región cercana a 1150 cm^{-1} , que no se observan para la muestra de pMWCNT, pueden ser asignados al grupo =C-H presente en los anillos fenólicos, sugiriendo la adsorción de compuestos aromáticos sobre los MWCNT, en concordancia con los ensayos de adsorción (E_4/E_6).

Aquellas contribuciones a 1592 cm^{-1} asignadas a COO^- en los AH⁶ no se observan en las muestras de AH-MWCNT y SI-AH-MWCNT.

Las observaciones indican que aquellos componentes polares con grupos carboxilos pertenecientes a los AH no son preferencialmente adsorbidos por el MWCNT².

En la figura 5.3 podemos observar que no hay diferencias significativas entre los espectros de AH-MWCNT y SI-AH-MWCNT, excepto por las distintas relaciones entre los picos observados en la región de $1150\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$, lo que indica una clara modificación en la naturaleza de los residuos C-OH luego de la irradiación solar.

Las bandas anchas observadas en la región comprendida entre $680\text{-}540\text{ cm}^{-1}$ del espectro de pMWCNT han sido asignadas previamente⁷ a los residuos de óxidos de metales utilizados en los procesos de síntesis, como óxidos de hierro, entre los cuales podemos encontrar magnetita. Esto concuerda con el análisis FT-IR de nanopartículas de Fe_3O_4 en una solución conteniendo AH, en donde se puede vislumbrar un pico característico a 563 cm^{-1} , atribuido a la vibración Fe-O⁷. Es interesante notar que estos picos ($680\text{-}540\text{ cm}^{-1}$) se encuentran ausentes en la muestra irradiada (SI-MWCNT y SI-AH-MWCNT) por lo que puede inferirse que la desorción y liberación de los residuos metálicos superficiales serían provocadas por la radiación solar sobre las suspensiones de MWCNT, en línea con estudios anteriores.

El hecho de que en la muestra AH-MWCNT se observe la ausencia de moléculas con grupos carboxilos adsorbidos y un contenido de metales menor que en la muestra de pMWCNT, sugiere que existe interacción de los AH con estos metales, estabilizándolos en solución. Estudios anteriores indican que hay una adsorción preferencial de las partes hidrofóbicas de los AH en los MWCNT⁸ como consecuencia de las interacciones π - π hidrofóbicas, mientras que las fracciones hidrofílicas que tienen distintos tipos de grupos funcionales (entre ellos, grupos carboxilos) pueden unirse a los óxidos de metales por intercambio de ligandos y atracciones electroestáticas⁹⁻¹¹, aumentando su estabilidad en solución. También, la literatura sostiene que las NPs de óxidos de metales pueden aumentar su estabilidad en solución en presencia de AH⁷. Estos resultados justifican el menor contenido de metales en la muestra AH-MWCNT, así como la ausencia de grupos carboxilos.

Por lo tanto, la composición del medio acuoso después de la adición de pMWCNT cambia y se caracteriza por una menor aromaticidad y una mayor presencia de componentes alifáticos hidrofílicos, así como por la presencia de metales, probablemente formando complejos metal-orgánicos. Estos cambios en las fracciones de AH y las concentraciones de iones metálicos en solución causadas por la presencia de pMWCNT en el medio acuático, pueden llevar a impactos dramáticos en el sistema biológico del entorno que utilizan sustancias orgánicas e iones metálicos en sus vías metabólicas.

Figura 5.3. Espectros FTIR de las muestras de nanotubos con distintos tratamientos, según Tabla 5.3.

5.4.4. Voltametría Cíclica

Para evaluar la reactividad de los componentes solubles en MIS conteniendo AH (luego de alcanzado el equilibrio de adsorción) se realizaron estudios electroquímicos potenciodinámicos sobre electrodos de platino. El procedimiento experimental está detallado en el capítulo 2 “Materiales y métodos experimentales”. Se utilizaron como controles la solución iónica modelo (MIS) y MIS con 10 ppm de AH.

Los voltagramas de la figura 5.4 (A) sugieren que ni las suspensiones conteniendo pMWCNT ni las soluciones de AH presentan una reactividad significativa en la superficie de los electrodos de Pt, en relación con el control de la matriz MIS. Puede observarse un descenso en la densidad de corriente asociada a la adsorción de hidrógeno sobre el electrodo de Pt en presencia de AH que puede ser atribuida a la adsorción de componentes orgánicos en la superficie del Pt que dificulta parcialmente la adsorción del hidrógeno sobre la superficie del mismo¹².

Por otro lado, los resultados de los ensayos con la suspensión de pMWCNT en MIS con agregado de 10ppm de AH muestran una elevada corriente de oxidación a 0.6V (SCE) cuando se realiza el barrido de potencial en dirección anódica (de -0.6V a +0.8V). Adicionalmente, durante el barrido en el sentido catódico (de 0.8V a -0.6V) puede detectarse un pico anódico a 0.3V. Se han obtenido resultados similares para la electrooxidación de alcoholes primarios de bajo peso molecular en MWCNT y composites Pt-MWCNT/Ti, indicando que el comportamiento observado puede estar relacionado con la oxidación de moléculas orgánicas de bajo peso molecular provenientes del proceso adsorción/desorción sobre los MWCNTs^{13,14}.

Teniendo en cuenta la baja reactividad de los AH en el electrodo de Pt en ausencia de MWCNT, los resultados potenciodinámicos muestran la importancia de la interacción entre los MWCNT y los AH, que conducen a la formación de productos que se oxidan sobre el Pt a potenciales cercanos a 0,3V. Estos resultados electroquímicos confirman la adsorción preferencial de las moléculas aromáticas de alto peso molecular de los AH sobre los MWCNTs, dejando disponibles en solución aquellas moléculas de bajo peso molecular hidrofílicas y componentes alifáticos carboxilados que luego se oxidarán sobre la superficie del Pt. Por otro lado, la electrooxidación estaría facilitada por la presencia de residuos metálicos (Fe, Co, Al) provenientes de la síntesis de MWCNTs seguido de la estabilización en solución por las moléculas alifáticas con grupos carboxilos, en concordancia con lo discutido en la literatura¹⁵.

Los voltagramas de las suspensiones conteniendo SI-AH-MWCNT y SI-MWCNT en MIS, muestran respuestas electroquímicas débiles (figura 5.4(B)), lo que indica que estos composites no liberan cantidades apreciables de moléculas de bajo peso molecular una vez suspendidos en MIS. Cabe destacar que las muestras de SI-MWCNT y SI-AH-MWCNT se prepararon según lo descripto en el esquema 2 al inicio del presente

capítulo, en donde existe un paso de filtración en donde todos los componentes liberados durante la irradiación y menores a $45\mu\text{m}$ son removidos. El pico relacionado al óxido de Pt a -0.10V observado para la muestra de SI-MWCNT no se observa en el voltagrama correspondiente para SI-AH-MWCNT, revelando que los derivados de AH liberados de la muestra de SI-AH-MWCNT son oxidados en la superficie de Pt a -0.08V , diferenciándose de los picos detectados para los pMWCNT en presencia de AH ($0,3\text{V}$), lo que indica que los compuestos que se oxidan en ambos casos son diferentes. De hecho, en la muestra de AH-MWCNT donde los componentes más hidrofóbicos de los AH son retenidos y se liberan metales¹⁶, la irradiación con luz solar puede conducir a la oxidación fotoinducida de los mismos sobre la superficie de los MWCNTs. Esto indicaría que la fotólisis de AH conduce a la formación de moléculas de bajo peso molecular con carácter ácido con menor potencialidad de electrooxidación. La disminución de la DQO para las muestras de AH-MWCNT irradiadas con luz solar apoya aún más las conclusiones anteriores. De hecho, tal como se explicó anteriormente, los voltagramas muestran que las suspensiones de SI-AH-MWCNT en MIS liberarían una pequeña cantidad de moléculas oxidadas, con menos reactividad y diferente potencial de electrooxidación que las liberadas por los MWCNT no irradiados y, por lo tanto, diferentes de las liberadas por la muestra de pMWCNT en presencia de AH.

Figura 5.4. Voltamogramas de las muestras de MWCNT prístinas en distintos medios (A) y de la muestra irradiada con luz solar en distintos medios (B).

5.4.5 Modificación de los residuos metálicos por efecto de la luz solar

Los estudios de caracterización de la muestra de MWCNT demostraron por numerosas técnicas la presencia de metales provenientes de la síntesis. Estos metales son de distinta naturaleza, en donde encontramos mayor proporción de Al, Fe y Co formando nanopartículas alojadas dentro del nanotubo, adsorbidos superficialmente o en el medio circundante. Los ensayos realizados con irradiación monocromática demostraron que existe

una modificación importante en la estructura del nanotubo, liberando nanopartículas metálicas y fragmentos de la red del nanotubo, exponiendo las capas más reducidas del MWCNT. En esta sección, se detallarán los estudios centrados en el efecto de la luz solar natural sobre la muestra de MWCNT, específicamente en aquellos que se liberan al medio circundante, ya que son los que estarían en mayor contacto con el entorno.

Para los experimentos se irradiaron 5L de una suspensión 10ppm de pMWCNT en el reactor CPC en MIS (descripción en “Materiales y métodos experimentales”) y luego de un TW30=52min se cortó la irradiación y se filtró utilizando membrana de nylon de 0,45 μm (FMWCNT-Irr). Como control se empleó una muestra 10 ppm de pMWCNT y se la filtró sin irradiar previamente con la membrana de 0.45 μm (FpMWCNT). El procedimiento se detalla en el esquema 7 ubicado al inicio del corriente capítulo.

Los filtrados de los nanotubos se analizaron por TEM para determinar su morfología y tamaño. Por otro lado, con el objetivo de la detección de ROS se utilizó EPR con agentes atrapantes específicos para radical hidroxilo y oxígeno singulete.

Es interesante observar que tanto la morfología como el tamaño de los residuos presentes en los filtrados de las suspensiones de nanotubos se ven modificados luego de la irradiación. En la figura 5.5. pueden observarse las micrografías TEM.

Se puede notar un aumento de tamaño de las partículas de las muestras irradiadas (en su mayoría entre 110 y 130 nm) 2 - 3 veces mayores en comparación con las muestras sin irradiar (la mayoría de aproximadamente 40 nm).

Se aprecia que los filtrados de la muestra irradiada presentan estructuras y tamaños completamente diferentes a la muestra prístina, lo que indica una clara liberación de nanomateriales de muy distinta morfología por efecto de la luz sobre los pMWCNT.

Adicionalmente, los espectros EPR muestran una producción de $\bullet\text{OH}$ en ambas muestras, pero de oxígeno singulete solo en la muestra irradiada.

Figura 5.5. Microscopía TEM, detección de radical $\text{OH}\cdot$ y $^1\text{O}_2$ para las muestras de los filtrados de nanotubos prístinos (FpMWCNT) y los filtrados de los nanotubos irradiados con luz solar (FMWCNT-Irr). Escala: 100 nm.

La tabla 5.4 presenta los valores de las medidas de potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de las muestras analizadas. Si bien no hay cambios apreciables en cuanto al potencial Z y la movilidad electroforética, la muestra irradiada aumenta considerablemente la conductividad (de 0.07 a 0.38 mS/cm).

	FpMWCNT	FMWCNT-Irr
Potencial Z (mV)	-5.8 (± 0.4)	-8 (± 2)
Movilidad Electroforética ($\mu\text{mcm/Vs}$)	-0.46 (± 0.03)	-0.6 (± 0.1)
Conductividad (mS/cm)	0.0738 (± 0.0004)	0.38 (± 0.001)

Tabla 5.4. Potencial Z, movilidad electroforética y conductividad de las muestras FpMWCNT Y FMWCNT-Irr.

La muestra de FMWCNT-Irr fue analizada por ICP-MS para determinar el contenido de metales disueltos. El ensayo se realizó utilizando como referencia la muestra de FpMWCNT, de modo que en la figura 5.6 se presentan los datos del aumento relativo de los metales luego de la irradiación. Puede notarse que la abundancia relativa aumenta 55 veces para el caso del Al, y en menor medida para la cantidad de Fe y Co. El hecho de que no se observe un aumento de Ni, está en consistencia con que este metal solo se encuentra en el interior del MWCNT y no es liberado por la fotólisis.

Figura 5.6. Aumento relativo $[C]/[C_0]$ de la concentración de los metales presentes en solución luego de la irradiación.

Se realizaron estudios de espectroscopía FT-IR y Raman con el objetivo de obtener mayor detalle de la composición de la muestra. En la figura 5.7 se detallan los resultados. Puede observarse que para la muestra FMWCNT-Irr el espectro Raman posee un pico entre los 1000 y 1300 cm^{-1} (banda G), además del pico a 1600 cm^{-1} (banda D) que se observa en ambas muestras, lo que indica que el carbono presente en la muestra irradiada podría presentar estructuras grafiticas. Estos sistemas, en donde una superficie de Al se halla en contacto con estructuras de carbono, presentan conductividades térmicas y eléctricas muy elevadas¹⁷. Por otra parte, los espectros FT-IR muestran relaciones de picos distintas para ambas muestras: el pico a 1740 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O de los ácidos carboxílicos aparece solo en FpMWCNT. En la misma línea, hay una disminución del pico presente a 1100 cm^{-1} (vibraciones del enlace C-O) para la muestra irradiada, lo que indica la presencia de menor cantidad de grupos funcionales oxidados del carbono, confirmando los ensayos de voltametría cíclica. Por otra parte, hay un aumento del pico a 1550 cm^{-1} para la muestra irradiada que corresponde a la vibración del enlace C=C,

en concordancia con la hipótesis de la formación de estructuras de tipo gráficas. Por último, se ve un aumento considerable de la intensidad del pico a 1440 cm^{-1} (huella o “fingerprint” de estructuras del tipo grafeno¹⁸) para la muestra de FMWCNT-Irr, corroborando la hipótesis anterior.

Figura 5.7. Espectroscopía FT-IR (derecha) y Raman (izquierda) de los filtrados de nanotubos prístinos (FpMWCNT) y de los filtrados de nanotubos irradiados con luz solar (FMWCNT-Irr).

Las medidas de carbono orgánico total (TOC) y la demanda química de oxígeno (DQO) se presentan en la tabla 5.5. Puede observarse que la irradiación afecta ambos parámetros de la muestra. Por un lado, hay un aumento considerable del TOC, lo que indicaría que el aumento relativo de estas muestras luego de la irradiación es debido a la presencia de estructuras basadas en carbono orgánico, y por otro se observa un marcado descenso de la DQO para la muestra irradiada en concordancia con la oxidación de los residuos metálicos luego de la oxidación. Estudios descriptos en el capítulo 4 demuestran que la radiación electromagnética genera en el nanotubo un estado de separación de cargas, en donde el aceptor de electrones es el nanotubo y el hueco se transfiere al metal. Este hueco luego se recombina con especies de radicales provenientes del propio nanotubo o del carbono amorfo del medio, culminando con la oxidación del metal. Estos resultados concuerdan con los valores de DQO obtenidos.

	TOC (gr CO/CT)	DQO(ppm O ₂)
FpMWCNT	0.9 ± 0.1	>1000
FMWCNT-Irr	15.2 ± 0.1	<50

Tabla 5.5. Determinación de carbono orgánico total (TOC) y demanda química de oxígeno (DQO) de las muestras filtradas FpMWCNT y FMWCNT-Irr.

5.5. Ensayos microbiológicos

Los MWCNT dispersos en solución pueden afectar a las bacterias, tanto en su estado planctónico como formando biofilms, en mayor o menor medida dependiendo de factores tales como la presencia de MOD, fuerza iónica, presencia de radiación solar, etc. La combinación de los factores anteriores nos dará un panorama más acertado del efecto real que ocurre en el medio ambiente.

El estudio de lo que ocurre con las bacterias en estado planctónico y en interacción con la luz es complejo debido a la diversidad de variables ambientales. Para mayor reproducibilidad de la radiación lumínica los experimentos se realizaron utilizando lámparas de emisión monocromática en el visible ($575\pm 5\text{nm}$) y en el UV ($350\pm 5\text{nm}$) por separado, según los protocolos detallados en el capítulo 2.

Por otra parte, se realizaron estudios sobre biofilms de *P. aeruginosa* del efecto producido por el descarte de MWCNTs en distintas condiciones: en su estado prístino con las modificaciones inducidas por la luz y, por la presencia de MOD. Con fines comparativos, se realizó también la evaluación del efecto de los MWCNTs en un entorno natural real como son los fangos activos a través de ensayos de respirometría.

5.5.1. Ensayos en *P. aeruginosa* en estado planctónico

5.5.1.1. Irradiación Visible

En la figura 5.8 se presentan los gráficos de barra correspondientes a los recuentos bacterianos en presencia de irradiación a $575\pm 5\text{nm}$ de acuerdo a los esquemas 5 y 6 ubicados en el inicio del capítulo. El gráfico de la izquierda corresponde a los ensayos realizados en ausencia de AH, en donde las columnas color bordo son los valores obtenidos en oscuridad y la columnas naranjas aquellas bajo irradiación. Se trabajó con 10 ppm de MWCNT sin ninguna modificación o tratamiento (pMWCNT) y 10 ppm de MWCNT previamente irradiados con luz visible (575I-MWCNT) según lo descrito del capítulo 2 “Materiales y métodos experimentales”. Como control se realizó el mismo protocolo sin adición de MWCNT. El gráfico de la derecha (B) representa los mismos experimentos anteriormente descritos, pero adicionando 10 ppm de AH al medio.

Figura 5.8. Recuentos bacterianos (Nf/NO) de *P. aeruginosa*, cultivada en oscuridad y bajo irradiación visible, de muestras conteniendo pMWCNT 575I-MWCNT en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de AH.

Los resultados indican que irradiar los MWCNT previamente irradiados con luz visible no tiene un efecto nocivo para las bacterias tanto en ausencia como en presencia de AH cuando se cultivan en oscuridad. Sin embargo, pueden observarse diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los ensayos con muestras de pMWCNT irradiadas (575I-MWCNT) que presentan menores valores que las sin irradiar cuando se cultivan las bacterias con luz visible, ya sea en presencia o en ausencia de AH. Asimismo, solo se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre la muestra de pMWCNT y 575I-MWCNT cuando el cultivo se realiza bajo irradiación y en ausencia de AH. Los resultados anteriores pueden explicarse teniendo en cuenta que la luz visible genera modificaciones en el MWCNT que si bien no conducen a la formación de especies reactivas, modifican los módulos elásticos de los nanotubos¹⁹, y/o generan un aumento local de la temperatura en el nanotubo que puede conducir a la reducción de la viabilidad bacteriana. Este efecto culmina con la liberación de metales y residuos de carbono orgánico al medio circundante¹⁷. Por lo tanto, podría pensarse que los mecanismos de toxicidad bajo radiación visible no son generados por la producción de especies reactivas sino por el efecto térmico o liberación de metales, en línea con lo observado en el capítulo anterior. De hecho, se han descrito efectos antibacterianos similares en combinaciones TiO₂ dopado con MWCNT cuando son irradiados por luz visible²⁰ así como con grafeno irradiado con NIR²¹.

5.5.1.2. Irradiación UV

Los resultados obtenidos irradiando con lámparas de emisión monocromática con longitudes de onda comprendidas en el UV (350 ± 5 nm) se presentan en la figura 5.9 y corresponden a los esquemas 3 y 4 del inicio del capítulo.

Figura 5.9. Recuentos bacterianos (Nf/N0) de *P. aeruginosa*, en oscuridad y bajo irradiación UV, de muestras conteniendo pMWCNT y 350I-MWCNT en ausencia (izquierda) y en presencia (derecha) de AH.

Observando el control sin irradiar y el correspondiente control irradiado, puede notarse que la luz UV tiene un efecto biocida que puede atribuirse a la generación intracelular de ROS, dando lugar a defectos en el ADN y en proteínas vitales para el microorganismo²². Por otra parte, el agregado de 350I-MWCNT (en ausencia de AH) a cultivos realizados en oscuridad tiene un impacto negativo en el número final de bacterias, presentando diferencias significativas ($p < 0.01$) con respecto al control en oscuridad. Estos resultados se explican según lo discutido en el capítulo anterior, en donde pudo demostrarse que se produce una fuerte modificación superficial de los MWCNTs en presencia de luz UV, liberando estructuras nanoscópicas de grafeno, metales adsorbidos (particularmente Al, tal como se vio en las secciones anteriores) y carbono amorfo al medio circundante que afectarían la viabilidad celular. Cuando el cultivo se realiza bajo irradiación, puede observarse una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre la muestra de pMWCNT y 575I-MWCNT. Si observamos los espectros EPR del capítulo anterior, puede notarse que luego de la fotólisis con luz UV, la producción de especies reactivas detectable es nula, mientras que en la muestra de pMWCNT se detectaron, además del $\bullet\text{OH}$ y oxígeno singlete (capítulo 4, figura 4.11), muchos tipos de radicales carbonados. Es decir,

el efecto de la muestra de pMWCNT en *P. aeruginosa* en estado planctónico bajo irradiación se asociaría a la producción de especies reactivas *in situ* con capacidad biocida.

En presencia de AH, se observa que, en el caso de los cultivos en oscuridad, la muestra de 350I-MWCNT no presenta el efecto biocida anteriormente descrito. Estos resultados son de gran interés, ya que revelan el rol de los AH como moléculas capaces de revertir el efecto tóxico de los MWCNT. Las moléculas de AH pueden adsorberse sobre la pared del nanotubo modificando sus propiedades pero también pueden formar complejos coordinados con los metales disueltos en solución²³, modificando así la interacción de los MWCNT con la radiación e indirectamente con las bacterias. Por otra parte, en presencia de AH también se observan diferencias significativas ($p < 0.01$) entre la muestra de pMWCNT y 350I-MWCNT en cultivos bajo irradiación presentando mayor toxicidad el ensayo con pMWCNT. Estos resultados están probablemente asociados a la producción de ERs con la posterior liberación de los metales catalíticos formando complejos metal-orgánicos con los componentes alifáticos de los AH hacia el medio circundante.

5.5.2. Ensayos con biofilms de *P. aeruginosa*

En la figura 5.10 se muestran los resultados de viabilidad bacteriana para el caso de biofilms cultivados en oscuridad. Cabe destacar que las muestras de MWCNT que tomaron contacto con fuentes de radiación solar, lo hicieron en una instancia previa. Es por ello que los efectos descriptos a continuación se deben a los efectos generados por la radiación sobre la integridad de la muestra y no por la producción de ERs.

Puede observarse que tanto la presencia de 10 ppm de pMWCNT como 10 ppm de AH individualmente no afectan al crecimiento. Sin embargo, se evidencia un aumento significativo en el crecimiento en la presencia de 10 ppm de SI-AH-MWCNT, AH-MWCNT y SI-MWCNT, respectivamente. Estos resultados indican que el biofilm se ve afectado por las alteraciones nanoestructurales y los cambios físicoquímicos consecuentes que sufre el pMWCNT ya sea por la irradiación con luz solar (SI-MWCNT) como por la adsorción de AH (AH-MWCNT). La menor presencia de iones metálicos en la superficie del MWCNT en las muestras irradiadas y el recubrimiento con la porción aromática de los AH probablemente son agentes causales del aumento del crecimiento en la vecindad de los AH-MWCNT.

En el esquema 6 puede observarse la descripción gráfica de la formación de biofilms en distintas situaciones.

Figura 5.10. Crecimiento del biofilm en presencia de MWCNT con distintos tratamientos.

Las microfotografías SEM revelan que la irradiación y/o la presencia de AH inducen cambios morfológicos en la bacteria y la formación de distintos tipos de aglomerados microbianos (figura 5.11). Puede notarse que en la superficie control (sin agregado de MWCNT) las bacterias se encuentran mayormente aisladas (Tamaño medio: $1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$) con bajo porcentaje de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), mientras que en las demás muestras pueden observarse colonias y agregados bacterianos. Es interesante notar que, si bien la adición de pMWCNT no afecta marcadamente el crecimiento microbiano, afecta la longitud bacteriana ($1.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$) y hay menos números de bacterias en división. Asimismo, pueden observarse pequeños aglomerados de bacterias. La presencia de AH-MWCNT, en donde los aglomerados de MWCNT son de mayor tamaño y los microorganismos presentan una longitud promedio próxima a la del control ($1.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$), parece aumentar la acumulación de las células alrededor de las nanoestructuras. En el caso de los SI-MWCNT se observa un impacto importante en el tamaño y morfología de las células. Tanto en presencia de SI-MWCNT como de SI-AH-MWCNT las bacterias son más pequeñas que las del control (longitudes promedio $1.4 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (control), $0.9 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (SI-MWCNT) y $1.0 \pm 0.2 \mu\text{m}$ en SI-AH-MWCNT) y forman grandes cantidades de EPS, en relación con el control, indicando que la luz solar genera un ambiente desfavorable en la vecindad del nanotubo. En la figura 5.12 se comparan las longitudes promedio de las bacterias en las distintas

condiciones ensayadas. Estos estudios están en concordancia con estudios anteriores que atribuyen cambios morfológicos similares a los observados a condiciones de estrés como por ejemplo, el daño oxidativo^{24,25,26}. Asimismo, se ha mostrado que bajo ambientes tóxicos el largo de las bacterias puede oscilar, algunas se acortan como una forma resistiva mientras que las que logran superar la situación de estrés se alargan y se duplican²⁷.

Hay varios mecanismos planteados que explican el efecto potenciador del desarrollo del biofilm. En una primera instancia, la muestra de MWCNT toma contacto con los microorganismos, generando daño celular seguido de muerte. Los restos celulares funcionan como nutrientes para el desarrollo del biofilm, incrementando la viabilidad de las células que no se hallan en contacto con la muestra de MWCNT, formando un biofilm con alta producción de EPS, brindando mayor protección y asegurando la proliferación de la biopelícula²⁸. De hecho, la literatura plantea que existe una interacción muy característica del EPS soluble con muestras de nanotubos de carbono doble capa (DWCNT), que involucra procesos físicos de adsorción, pero también interacciones químicas de tipo hidrofóbicas²⁹. Las micrografías SEM muestran que la respuesta del biofilm depende de la presencia de MOD y de la radiación solar.

El hecho de que se observe indicios de un ambiente tóxico en las muestras irradiadas (SI-MWCNT y AH-SI-MWCNT) que conduce a la formación de bacterias de menor longitud, junto con un aumento considerable de la biomasa en el biofilm, están en consistencia con el aumento del EPS como estrategia de supervivencia en biofilms. La adsorción de moléculas orgánicas de los AH disminuye la toxicidad de la muestra, ya que se observa proliferación del biofilm sin reducción del tamaño celular, formando aglomerados de mayor tamaño. Tanto la presencia de EPS como la de AH tienen un efecto similar en la respuesta del biofilm, debido al tipo de interacciones que se generan con la muestra de MWCNT.

Figura 5.11. Microtopografías SEM de las muestras: control (en detalle a la derecha); b) pMWCNT; c) AH-MWCNT, d) SI-MWCNT; e) AH-SI-MWCNT.

Figura 5.12. Diámetro celular medio para las distintas condiciones ensayadas.

5.5.3. Respirometría de fangos activos

Se evaluó la inhibición del crecimiento de los componentes de los fangos en función del tiempo de irradiación medio (TW30) de suspensiones 10 ppm de MWCNT irradiadas en presencia y en ausencia de AH. Puede observarse en la figura 5.13 que el porcentaje de inhibición (%INH) definido previamente como el promedio del descenso en la tasa de respiración antes y después del agregado de la muestra problema (sección 2.3.17 del capítulo 2), aumenta a medida que aumenta el tiempo de irradiación (TW30). Es interesante notar que el efecto se revierte en presencia de AH y no hay modificación del %INH con el aumento del TW30.

De acuerdo con la figura 5.2 (DQO) la cantidad de especies oxidables de los pMWCNT decrecen con el tiempo de irradiación. Este comportamiento se observa tanto en ausencia como en presencia de AH, aunque solo los procesos en ausencia de AH resultan ser tóxicos en concordancia con estudios previos^{30,31}. Esto sugiere un efecto protector de los AH contra la presencia de moléculas tóxicas para los microorganismos que crecen en los fangos.

Figura 5.13. %INH vs TW30 de MWCNT irradiados en ausencia (▼) y en presencia (●) de AH.

5.7. Conclusiones

Caracterización de los MWCNT sin y con irradiación

Los resultados muestran que las suspensiones conteniendo pMWCNT en presencia de AH incrementan la DQO generado por el cambio de la composición del medio. Este cambio es debido a la adsorción preferencial de moléculas orgánicas de alto peso molecular, en gran medida de estructuras aromáticas, sobre los MWCNT quedando libre la porción alifática de menor peso molecular. Dicho proceso está ligado a la disolución en la fase acuosa de los metales presentes en los nanotubos, probablemente favorecida por la complejación con los grupos carboxilos de la porción de las moléculas alifáticas de bajo peso molecular de los AH que permaneció en solución. Estos componentes orgánicos remanentes son los que pueden ser detectados como altas corrientes de oxidación en los electrodos de Pt cuando los MWCNT no fueron irradiados.

La irradiación solar de suspensiones de pMWCNT en soluciones modelo y en presencia de AH muestran alteraciones adicionales debidas a reacciones de oxidación en concordancia con el descenso más acelerado de la DQO con el tiempo de irradiación en presencia de AH. Los resultados

indican que las muestras de SI-AH-MWCNT podrían desorber sustancias de distinta naturaleza comparadas con aquellas generadas durante la adsorción preferencial de AH en los pMWCNT, según los ensayos realizados por voltametría cíclica.

En el caso de irradiación con la luz solar, por un lado, hay una liberación prominente de metales hacia el medio circundante. Asimismo, la irradiación solar afecta los estados de oxidación de los componentes de la muestra asociado al descenso en la DQO. La liberación de nanopartículas con estructuras aparentemente grafiticas, que tienen la capacidad de producir oxígeno singulete y una conductividad térmica elevada, es un factor muy importante a tener en cuenta al analizar del efecto de la luz solar ya que refleja la modificación del sistema y el potencial riesgo medioambiental que esto conlleva. Estas estructuras podrían formarse en efluentes naturales afectando la microbiota ambiental y generando consecuencias irreversibles.

Impacto de los MWCNT sobre bacterias planctónicas, biofilms microbianos y fangos activos

Los ensayos con fuentes de irradiación monocromática en *P. aeruginosa* en estado planctónico sugieren que el efecto citotóxico depende de la longitud de onda a la cual esté sujeta el sistema, ya que se ha demostrado que las modificaciones en el nanotubo son distintas dependiendo la fuente de irradiación. Por un lado, existe una modificación superficial muy pronunciada luego de irradiar la muestra de MWCNT con luz UV, generando nuevas estructuras que aumentan su toxicidad al producir ERs bajo irradiación, afectando también la integridad celular en oscuridad. Las modificaciones inducidas por la luz visible también resultan tóxicas para el estado planctónico, probablemente debido a un aumento local de temperatura y aumentando la disolución de metales, colocando a este NM como un contaminante emergente de alto riesgo.

La presencia de AH es capaz de revertir la toxicidad de la muestra de 350I-MWCNT en oscuridad, mientras que para la irradiación visible esto resulta indistinto. Debido al marcado efecto biocida de la radiación generada por la lámpara de 350 nm, fue imposible establecer una relación entre la muestra de pMWCNT y 350I-MWCNT bajo irradiación, en presencia o ausencia de AH.

Por otra parte, en los ensayos con biofilms de *P. aeruginosa* la muestra de AH-MWCNT presenta un aumento en la biomasa presente en el biofilm generado por la adsorción de los AH sobre la pared del MWCNT, permitiendo que las bacterias puedan aglomerarse en las vecindades de la muestra formando un biofilm más desarrollado.

La irradiación solar de suspensiones de pMWCNT afecta la estructura de los nanotubos con la consecuente desorción de los metales catalíticos. Como resultado, las interacciones de SI-MWCNT con *P. aeruginosa* se incrementan. Si bien la proliferación del biofilm de *P. aeruginosa* se ve

levemente potenciada debido a la presencia de SI-MWCNT, pueden notarse cambios importantes tanto en la morfología como en el tamaño celular con una producción abundante de EPS, sugiriendo la presencia de un ambiente tóxico. De hecho, la producción de altas cantidades de EPS soluble funciona como una estrategia que mitiga el efecto tóxico de la muestra de MWCNT, debido tanto a la adsorción física como a las interacciones de tipo hidrofóbicas entre ambas moléculas, similar a lo que ocurre con los AH y los MWCNTs.

De acuerdo con la actividad de los microorganismos en los fangos activos, puede verse un aumento del porcentaje de inhibición (%INH) generado por la irradiación solar de pMWCNT en ausencia de AH, causado por la liberación de metales y la formación de estructuras nanométricas de diversa naturaleza.

Como conclusión general, el impacto de los MWCNT, a la concentración analizada en el presente trabajo, sobre las bacterias *P. aeruginosa* es dependiente de la irradiación y de la presencia de AH, aunque también varía de acuerdo con la forma de vida (planctónica/biofilm) del microorganismo.

De acuerdo a las consideraciones previas, al analizar el impacto ambiental de los pMWCNT, es necesario tener en cuenta el efecto de la composición del medio, las modificaciones generadas por el material que se desecha en el mismo y la presencia de microorganismos en distintas formas de vida. Los efectos producidos son los puntos de partida de la cadena de eventos que puede conducir a daños severos al ecosistema en general.

5.8. Referencias

1. Purmalis, O. COMPARATIVE STUDY OF PEAT HUMIC ACIDS BY USING UV. 24–26 (2013).
2. Hyung, H. & Kim, J. Natural Organic Matter (NOM) Adsorption to Multi-Walled Carbon Nanotubes : Effect of NOM Characteristics and Water Quality Parameters. **42**, 4416–4421 (2008).
3. Hiemenz, Paul C and Hiemenz, P. C. *Principles of colloid and surface chemistry*. **188**, (M. Dekker New York, 1986).
4. Sadtler Research Laboratories & Simons, W. W. *The Sadtler handbook of infrared spectra*. (W.W. Simons, Heyden and Son, 1978).
5. Goeting, C. H., Marken, F., Gutierrez-Sosa, A., Compton, R. G. & Foord, J. S. Boron-doped diamond electrodes: growth, surface characterisation and sono-electrochemical applications. *New Diam. Front. Carbon Technol.* **9**, (1999).
6. Bian, S., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T. & Grassian, V. H. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments : Influence of pH , Ionic Strength , Size , and Adsorption of Humic Acid. 6059–6068 (2011).
7. Koesnarpadi, S., Santosa, S., Siswanta, D. & Rusdiarso, B. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticle Coated Humic Acid (Fe₃O₄/HA). *Procedia Environ. Sci.* **30**, 103–108 (2015).
8. Tang, W. W. *et al.* Impact of humic/fulvic acid on the removal of heavy metals from aqueous solutions using nanomaterials: A review. *Sci. Total Environ.* **468–469**, 1014–1027 (2014).
9. Giasuddin, A. B. M., Kanel, S. R. & Choi, H. Adsorption of Humic Acid onto Nanoscale Zerovalent Iron and Its Effect on Arsenic Removal. **41**, 2022–2027 (2007).
10. Martyniuk, H. & Wie, J. Adsorption of metal ions on humic acids extracted from brown coals. **84**, 23–36 (2003).
11. Yang, S. *et al.* Effects of humic acid on copper adsorption onto few-layer reduced graphene oxide and few-layer graphene oxide. *Carbon N. Y.* **75**, 227–235 (2014).
12. Menezes, H. A. & Maia, G. Electrochimica Acta Specific adsorption of arsenic and humic acid on Pt and PtO films. **55**, 4942–4951 (2010).
13. Momeni, M. M. Evaluation of the Performance of Pt-MWCNTs Nanocomposites Electrodeposited on Titanium for Methanol Electro-oxidation. **33**, 331–341 (2015).
14. Thomas, J. E. *et al.* Carbon nanotubes as catalyst supports for ethanol oxidation. **5**, 4–9 (2010).
15. Croy, J. R., Mostafa, S., Hickman, L., Heinrich, H. & Cuenya, B. R. Applied Catalysis A : General Bimetallic Pt-Metal catalysts for the decomposition of methanol : Effect of secondary metal on the oxidation state , activity , and selectivity of Pt. **350**, 207–216 (2008).
16. Corin, N., Backlund, P., Kulovaara, M., Chemistry, O. & Health, O. DEGRADATION PRODUCTS FORMED DURING UV-IRRADIATION OF

- HUMIC Water samples. **33**, 245–255 (1996).
17. Zhan, G.-D. & Mukherjee, A. K. Carbon Nanotube Reinforced Alumina-Based Ceramics with Novel Mechanical, Electrical, and Thermal Properties. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **1**, 161–171 (2005).
 18. Lehman, J. H., Terrones, M., Meunier, V., Mansfield, E. & Hurst, K. E. Evaluating the characteristics of multiwall carbon. *Carbon N. Y.* **49**, 2581–2602 (2011).
 19. Zhang, Y. & Iijima, S. Elastic response of carbon nanotube bundles to visible light. *Phys. Rev. Lett.* **82**, 3472–3475 (1999).
 20. Akhavan, O., Azimirad, R., Safa, S. & Larijani, M. M. Visible light photo-induced antibacterial activity of CNT-doped TiO₂ thin films with various CNT contents. *J. Mater. Chem.* **20**, 7386–7392 (2010).
 21. Pereyra, J. Y. *et al.* Photothermally enhanced bactericidal activity by the combined effect of NIR laser and unmodified graphene oxide against *Pseudomonas aeruginosa*. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **24**, 36–43 (2018).
 22. Goosen, N. & Moolenaar, G. F. Repair of UV damage in bacteria. *DNA Repair (Amst)*. **7**, 353–379 (2008).
 23. Tan, K. H. Formation of metal-humic acid complexes by titration and their characterization by differential thermal analysis and infrared spectroscopy. *Soil Biol. Biochem.* **10**, 123–129 (1978).
 24. Van Overbeek, L. S., Eberl, L., Givskov, M., Molin, S. & Van Elsas, J. D. Survival of, and induced stress resistance in, carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4202–4208 (1995).
 25. Cefali, E. *et al.* Morphologic variations in bacteria under stress conditions: Near-field optical studies. *Scanning J. Scanning Microsc.* **24**, 274–283 (2002).
 26. Oh, E., McMullen, L. & Jeon, B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Front. Microbiol.* **6**, 295 (2015).
 27. Krishnamurthi, V. R., Chen, J. & Wang, Y. Silver ions cause oscillation of bacterial length of *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **9**, 1–11 (2019).
 28. Rodrigues, D. & Elimelech, M. Toxic Effects of Single-Walled Carbon Nanotubes in the Development of *E. coli* Biofilm. **44**, 4583–4589 (2010).
 29. Verneuil, L. *et al.* Double walled carbon nanotubes promote the overproduction of extracellular protein-like polymers in *Nitzschia palea*: An adhesive response for an adaptive issue. *Carbon N. Y.* **88**, 113–125 (2015).
 30. Luongo, L. A. & Zhang, X. J. Toxicity of carbon nanotubes to the activated sludge process. **178**, 356–362 (2010).
 31. Hai, R., Wang, Y., Wang, X., Du, Z. & Li, Y. Impacts of multiwalled carbon nanotubes on nutrient removal from wastewater and bacterial community structure in activated sludge. *PLoS One* **9**, e107345 (2014).

Capítulo 6:

Conclusiones generales

*“Odio tener que pedir permiso, prefiero pedir perdón.
A veces al cielo, otras miro al piso,
el techo se me voló”*

Capítulo 6: Conclusiones generales

En el apartado siguiente (6.1) se sintetizan las conclusiones de cada capítulo y en la sección 6.2 las conclusiones generales del presente trabajo de tesis.

6.1. Nanopartículas de óxidos de metales (NP-OMe)

En el caso de las NP-OMe, comparando las muestras de NP-ZnO y NP-Al₂O₃, podemos concluir que el efecto en el medio ambiente depende del tipo de elemento con el que esté constituido el NM. La interacción con MOD es un efecto muy importante debido a que la adsorción de moléculas en la superficie de la NPs depende de la identidad del material. En ambos casos se observó una adsorción preferencial de determinadas fracciones de AH y el aumento de concentración de iones metálicos en solución por la formación de complejos coordinados entre los iones y los AH. Cabe destacar que las muestras impactaron en formas muy distintas sobre los cultivos de *P. aeruginosa*. En las secciones posteriores se describen estos puntos con más detalle, así como las posibles formas de remediación frente al desecho de estos NMs.

6.1.1 Nanopartículas de óxido de cinc (NP-ZnO)

Con respecto a este NM, los estudios de caracterización mostraron las propiedades distintivas del ZnO nanoparticulado, con los picos característicos en el patrón de difracción de rayos X y el plasmón a 370 nm observado por espectroscopía UV-Vis. Sin embargo, los análisis de FT-IR y TGA mostraron la presencia de moléculas de distinta naturaleza que coinciden con las impurezas empleadas en la síntesis¹.

El comportamiento en soluciones salinas (MIS) está en concordancia con la teoría de DLVO² y el hecho de que se observen aglomerados más pequeños en presencia de AH, muestra una clara interacción superficial entre el NM y los AH. De hecho, los ensayos de FT-IR por ATR revelan que existe una adsorción preferencial de los AH, siendo la porción alifática la que se absorbe en mayor proporción. Más aún, las bandas atribuidas a los grupos carboxilatos se ven desplazadas confirmando una interacción entre el NM y los AH³.

Los ensayos de FT-IR y de determinación del índice E4/6 mediante espectroscopía UV-Vis, realizados en el sobrenadante de las dispersiones de NP-ZnO y AH, sugieren la formación de complejos de coordinación entre

las NP-ZnO y los AH, involucrando los grupos alcohólicos y carboxílicos de los AH. De hecho, pudo determinarse un aumento importante en la concentración de Zn^{2+} en el sobrenadante luego del agregado de AH.

Los ensayos en cultivos de *P. aeruginosa* en estado planctónico denotaron que existe un efecto tóxico solamente en oscuridad y, si bien existen muchos mecanismos propuestos para explicar este efecto, los experimentos realizados junto con el soporte de la literatura, sugieren que la presencia de la muestra de NP-ZnO interrumpiría la comunicación célula-célula, a través del *quórum quenching*⁴. La reversión de la toxicidad por el agregado de AH está en concordancia con este mecanismo, ya que se observa la pasivación superficial de la NP-ZnO, por las moléculas orgánicas con grupos alcohólicos y carboxílicos de los AH. La generación de ROS en oscuridad fue descartada luego de realizadas las mediciones de H_2O_2 con valores no detectables. Sin embargo, no se puede descartar la hipótesis de que los iones Zn^{2+} participen también en el efecto global de toxicidad en *P. aeruginosa*, ya que si bien pudo determinarse un aumento de Zn^{2+} en solución luego del agregado de AH (en donde no se observa toxicidad), este ion se encuentra formando complejos con las moléculas de AH, con efectos muy distintos al ion libre en solución⁵.

Los estudios realizados en biofilms de *P. aeruginosa*, presentan resultados diferentes al estado planctónico y puede verse un aumento significativo en el número final de bacterias de la muestra de NP-ZnO/AH. Si bien el resultado estadístico de los recuentos entre la muestra de NP-ZnO en ausencia de AH y el control no mostró diferencias significativas, el número final de bacterias en el biofilm es mayor en presencia del NM, dato que fue corroborado por SEM en donde se puede observar la presencia de un biofilm más estructurado, tridimensional y con mayor cantidad de células. Estos resultados coinciden con los experimentos de determinación de Zn^{2+} en solución, ya que la presencia de Zn^{2+} en biofilms de *P. aeruginosa* modularía positivamente genes metabólicos, generando una mayor proliferación del biofilm. De hecho, los resultados obtenidos están en línea con lo publicado en la literatura, en donde se plantea que altas concentraciones de Zn^{2+} inhiben la acción de la enzima fosfodiesterasa, una proteína capaz de catalizar la reacción de c-di-GMP⁶ (un segundo mensajero encargado de desarrollar el cambio de fenotipo de planctónico a sésil) a GMP⁷. Esta inhibición concluiría en un aumento local de los niveles de c-di-GMP, aumentando la proliferación del biofilm tal como se mostró en el capítulo 3, figura 3.26.

Como conclusión general acerca de este NM, los experimentos sugieren que es la muestra de NP-ZnO la que genera toxicidad en *P. aeruginosa* en estado planctónico y en oscuridad, efecto que es revertido por la adsorción de moléculas orgánicas (principalmente alifáticas) provenientes de los AH. Los efectos en *P. aeruginosa* formando biopelículas resultan contrarios al análogo en estado planctónico, y puede deberse al aumento del ion Zn^{2+} y su efecto potenciador para la formación del biofilm⁴.

Posibles formas de reducir el impacto ambiental

Es claro que este NM posee propiedades que resultan desfavorables para los procesos desarrollados en el medio ambiente ya que por un lado interfiere en el modo de vida planctónico y por otro potencia el crecimiento del biofilm, algo que afectaría el equilibrio del ecosistema, generando potenciales efectos irreversibles en el medio ambiente asociadas al aumento de la concentración local de iones Zn^{2+} , formando complejos de coordinación. Antes del descarte, una posible estrategia podría ser un pretratamiento con AH, y una liberación controlada, de forma tal que la concentración de Zn^{2+} no fluctúe demasiado logrando de esta forma el mantenimiento de la microbiota en valores normales. Para ello es necesario saber la cantidad de Zn^{2+} presente en la muestra y asegurarse de que en volumen de agua en la zona de descarte sea lo suficientemente importante como para que el agregado de este desecho no fluctúe las concentraciones de Zn^{2+} propias del entorno, logrando así el menor impacto posible.

6.1.2. Nanopartículas de óxido de aluminio (NP- Al_2O_3)

El hecho de que la síntesis de NP- Al_2O_3 involucre calcinamiento a altas temperaturas, hace que la muestra no presente impurezas provenientes de los precursores de la síntesis. De hecho, los patrones de DRX obtenidos coinciden perfectamente con la estructura de $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ reportada en la literatura⁸. Hemos demostrado que las NPs permanecen en suspensión formando aglomerados de gran tamaño en solución acuosa salina y si bien existe una disminución de los mismos por el agregado de los AH, aún pueden observarse aglomerados del tamaño de varias NPs en solución. Los ensayos de TGA revelaron que, para este NM, no existe una adsorción preferencial de las porciones de AH, y se observa la adsorción tanto de la porción alifática como de la aromática.

El hecho de que esta muestra no presente toxicidad bajo irradiación está en concordancia con la baja producción de especies reactivas fotoinducidas. Sin embargo, puede notarse una disminución en el número final de bacterias en oscuridad con diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando en el medio se hallan presentes los AH. La evidencia experimental sugiere un aumento local de la concentración de Al^{3+} por la presencia de AH, formando complejos de coordinación con baja actividad de transporte de electrones⁹. En el caso de este NM no se encontraron efectos bajo irradiación.

Puede notarse en los recuentos bacterianos de cultivos con NP- Al_2O_3 que la presencia de AH genera un aumento en la cantidad de células presentes en el biofilm. Sin embargo, en ausencia de AH, los recuentos resultan ser similares al control. Observando las microfotografías SEM puede verse que la muestra conteniendo NP- Al_2O_3 sin AH, presentan bacterias aisladas entre sí, con una importante reducción del tamaño celular, sin la presencia de EPS indicando un alto grado de toxicidad del entorno. Es

importante destacar que dichas bacterias aún se encuentran conservando sus orgánulos motrices (fenotipo planctónico), que utilizan para establecer una red de conexión célula-célula y célula-superficie, pero no han evolucionado hacia el estado sésil que caracteriza a la formación de los biofilms.

Por el contrario, y en línea con los recuentos realizados, los cultivos con NP-Al₂O₃ en presencia de AH presentan un biofilm con mayor densidad celular. También puede notarse la reducción del tamaño celular y la presencia de grandes cantidades de EPS, como una forma de adaptarse al ambiente tóxico que las rodea. El hecho de que se observan fenotipos completamente distintos para la muestra de NP-Al₂O₃ en presencia o ausencia de AH, sugiere estrategias de supervivencia distintas que adopta *P. aeruginosa* para ambas muestras: en ausencia de AH, la presencia del ion Al³⁺ y su competencia por los sitios de anclaje del Mg²⁺¹⁰, podría regular negativamente la actividad de ciertas enzimas entre las que se encuentran las guanidyl ciclasas (DGCs)¹¹, impidiendo el cambio de su fenotipo planctónico al sésil, debido a la imposibilidad de producción del segundo mensajero di-c-GMP⁶ (ver figura 3.26). Por otra parte, si bien existe un aumento de la concentración de Al³⁺ por el agregado de AH, el hecho de que se formen complejos de coordinación entre ambas moléculas posiblemente reduzca la biodisponibilidad del Al³⁺, brindando al microorganismo la posibilidad de formar un biofilm estructurado. Sin embargo, si bien la cantidad de EPS resulta mayor para esta muestra que para el control, las bacterias revelaron una reducción en el tamaño celular (de 1.4±0.2 a 0.9±0.2µm), indicando su respuesta a un ambiente tóxico.

Los resultados de los ensayos con NP-Al₂O₃ en presencia de AH muestran diferencias entre los ensayos con *P. aeruginosa* en estado planctónico o formando biofilms. Sin embargo, al analizar los resultados debe considerarse que no son comparables, debido a que la regulación génica del microorganismo en el biofilm resulta distinta¹², pudiendo revertir los efectos tóxicos más efectivamente que en estado de libre flotación.

Cuando se evalúa el impacto del desecho de materiales que conducen a la liberación de Al³⁺ a lo largo de la historia puede notarse que ha sido un problema para el desarrollo de cultivos agrícolas por su alta toxicidad. Por otra parte, el Al³⁺ está directamente relacionado con muchas enfermedades humanas, particularmente las neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer¹³. Desechar desmedidamente estos NMs en el medio ambiente traerá consecuencias de alto impacto en los sistemas naturales, alterando irreversiblemente el equilibrio del mismo. En este caso el agregado de AH trajo como consecuencia un resultado negativo, ya que aumentó la cantidad de Al³⁺ disuelto y con ello la toxicidad en *P. aeruginosa* en estado planctónico. Además, a pesar de la proliferación del biofilm observada, la reducción del tamaño celular y la producción de grandes cantidades de EPS revelan la presencia de un ambiente tóxico. El análisis comparativo de los resultados nos permite deducir que las

bacterias están actuando como un sensor biológico que indica cambios producidos por la presencia de las NP- Al_2O_3 en el ecosistema.

Posibles modos de reducir el impacto ambiental

Dada la naturaleza tóxica del Al^{3+} y los estudios realizados en este trabajo, es altamente recomendable procesar correctamente este NM y evitar descartarlo en el medio ambiente. Es necesario realizar el correcto pretratamiento de los desechos de este nanomaterial de modo tal de retirar completamente las NP- Al_2O_3 del medio, así como también el Al^{3+} disuelto en la solución. Uno de los métodos actualmente desarrollados que se podría implementar para el tratamiento de tanto el Al^{3+} disuelto como la muestra de NP- Al_2O_3 , es el empleo del lodo rojo. Este método consiste en utilizar residuos provenientes de la bauxita, la principal fuente natural de Al. Este tipo de arcillas ha demostrado mucha eficiencia en la retención de iones de metales pesados y contaminantes orgánicos de alto peso molecular¹⁴. Los lodos pueden después ser utilizados como material para construcción, sin peligro de liberación hacia el medio ambiente. Otro método actualmente en desarrollo implica la utilización de plantas capaces de captar el Al^{3+} e inmovilizarlo en distintos sitios, en un proceso llamado fitorremediación¹⁵. Si bien este método tiene una eficiencia de remoción de Al >90%, las técnicas de fitorremediación aún están en las primeras fases de desarrollo con muchas limitaciones propias del proceso.

6.1.3. Nanotubos de carbono multicapa comerciales (MWCNT)

Los ensayos realizados con MWCNT permitieron obtener conclusiones muy interesantes acerca de este NM. La presencia de metales de distinta naturaleza fue evidenciada y cuantificada por diversas técnicas, que además de la identificación permitieron determinar la ubicación dentro del nanotubo. La íntima interacción entre los metales y el MWCNT genera un sistema muy reactivo químicamente con características propias entre las cuales se destacan la magnetización y la reactividad fotoquímica. Los experimentos demostraron que existe una modificación de la estructura del nanotubo cuando es irradiado con luz de distintas longitudes de onda. La interacción con fuentes de radiación UV es la responsable de la ruptura oxidativa de las capas externas oxidadas del nanotubo, exponiendo las capas interiores más reducidas y liberando estructuras nanoscópicas de grafeno y nanopartículas metálicas de diversa naturaleza. Los experimentos resueltos en el tiempo permitieron el planteo de un mecanismo de reacción que explica los procesos químicos que ocurren en el sistema de MWCNT en interacción con luz UV. Teniendo en cuenta que bajo longitudes de onda comprendidas en el visible, no existe producción de ERs y que una de las impurezas en el MWCNT en mayor cantidad son residuos de Al_2O_3 en asociación con la red de grafeno del nanotubo, se podría inferir que las modificaciones se dan por efectos térmicos dentro del nanotubo.

La producción de especies reactivas fotoinducida afecta drásticamente la proliferación de cultivos planctónicos de *P. aeruginosa*, con un impacto mayor que los otros NMs ensayados. Además, las modificaciones generadas por la irradiación concluyen en un aumento de la toxicidad en oscuridad.

Debido a su extensa área superficial y su capacidad absorbente, existe una interacción pronunciada de los MWCNT con las moléculas de AH del medio circundante. Pudo observarse una adsorción preferencial siendo la porción aromática de moléculas, de alto peso molecular, la que interactúa con la superficie del nanotubo. La porción alifática, de bajo peso molecular, permanece en solución y juega un rol principal en la complejación de los metales que se hallan adsorbidos en el nanotubo, manteniéndolos estables en solución.

En cultivos planctónicos en oscuridad, es la muestra de MWCNT previamente fotolizada con luz UV (350I-MWCNT) la única que presentó una reducción en el número final de bacterias, lo que sugiere un marcado efecto por interacción con esta fuente de irradiación, derivando en un aumento de la toxicidad. Bajo radiación visible, tanto la muestra prístina como la fotolizada (575I-MWCNT) presentaron una disminución significativa del número final de bacterias. Resultados similares se obtuvieron bajo irradiación UV, pero no se observaron diferencias significativas con el control debido al efecto biocida de la lámpara, aunque sí se observan diferencias significativas entre la muestra de pMWCNT y 350I-MWCNT bajo irradiación. Este dato está en concordancia con la detección de ERs fotoinducidas de la muestra de pMWCNT, bajo irradiación UV. Sorprendentemente, la presencia de AH logra revertir los efectos tóxicos en oscuridad para la muestra de 350I-MWCNT. Por otro lado, bajo irradiación visible, la presencia de AH no revierte el efecto tóxico bajo irradiación, pero la diferencia significativa que se observa entre la muestra de pMWCNT y 575I-MWCNT desaparece.

Los ensayos que utilizaron radiación solar natural mostraron un efecto similar a los realizados con luz monocromática, resultando una muestra de MWCNT con mayor grado de oxidación. En relación a ello pudo observarse que el porcentaje de inhibición de fangos activos aumenta con el tiempo de irradiación en suspensiones de MWCNT en solución salina modelo (MIS), pero dicho efecto se ve revertido en su totalidad por interacción con AH que pasivan la superficie.

Los estudios de crecimiento de biopelículas mostraron un importante efecto potenciador del crecimiento para las muestras que habían sido irradiadas con luz solar en presencia y ausencia de AH, aunque las microfotografías SEM revelan una reducción significativa del tamaño celular. Por otra parte, las altas cantidades de EPS indican la presencia de un ambiente tóxico. Los resultados sugieren que las modificaciones estructurales de la muestra de MWCNT desencadenarían en el biofilm la producción de proteínas presentes en el EPS, logrando así encapsular el NM, dejándolo inaccesible a la célula. Esto permitiría la proliferación

celular dentro de la biopelícula. Un efecto similar se obtiene con la muestra de MWCNT en presencia de AH sin irradiar, en donde los aglomerados de MWCNT son de mayor tamaño y parecen aumentar la acumulación de las células alrededor de las nanoestructuras.

Posibles formas de reducir el impacto ambiental

Se desprende de los resultados obtenidos, que un paso crucial en el desarrollo de un protocolo de descarte seguro de los MWCNT prístinos es la remoción de los metales que tienen adsorbidos en su superficie. Sin embargo, este proceso conlleva procedimientos químicos con un costo elevado. Probablemente, sus propiedades magnéticas harán posible su separación parcial utilizando un campo magnético. Dada la elevada reactividad de estos NM y su naturaleza adsorbente resultan ser útiles para la remoción de contaminantes utilizando la radiación solar como fuente de energía. De esta forma, podrían reutilizarse los desechos para la generación de dispositivos útiles en el tratamiento de contaminantes. Algunos de los posibles usos se presentan en el anexo de la presente tesis.

6.2. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que hay un efecto muy marcado de los AH en todas las muestras ensayadas y, en el común de los casos, la adsorción de estas moléculas en la superficie del NM genera cambios muy importantes debido a la adsorción preferencial de algunos compuestos que deben tenerse en cuenta a la hora del estudio del impacto ambiental. En todas las condiciones ensayadas, se demostró por varias técnicas que la presencia de moléculas orgánicas (aromáticas y alifáticas) presentes en los AH, puede dar lugar a la formación de complejos de coordinación con los metales provenientes de las NP-OMe o presentes como remanentes de los procesos de síntesis en los MWCNT prístinos, estabilizándolos en solución y afectando de esta forma a los microorganismos en sus distintas formas de vida. Los ensayos microbiológicos demostraron que la toxicidad de estos NMs sobre las bacterias depende de la forma de vida de las mismas, ya sea en estado planctónico o formando biofilms. Cabe destacar que el estudio de las perturbaciones en el tamaño, viabilidad, producción de material polimérico, persistencia de estadios primitivos de anclaje superficial previos a la formación de las biopelículas ha permitido sensor el mayor o menor impacto de los NM sobre los microorganismos.

Como conclusión general podemos afirmar que para la evaluación del impacto ambiental de un NM hay que tener en cuenta todas las variables posibles que puedan darse en el ecosistema: la presencia de MOD y la elevada fuerza iónica del medio, la radiación a la que el sistema está sometida y la presencia de microorganismos en distintas formas de vida. Todas estas variables no actúan individualmente, sino que lo hacen en conjunto, generando una alta complejidad a la hora del estudio de estos

sistemas. Es por ello que el descarte de NMs en el medioambiente debe ser ejecutado empleando un procedimiento con protocolos rigurosos debido a que sus consecuencias pueden ser importantes e imprevisibles ya que constituyen el primer eslabón de una cadena de eventos.

6.3. Referencias

1. Karsten, B. P., Bijleveld, J. C., Viani, L. & Cornil, J. Supporting Information. 1–9 (2009).
2. Hiemenz, Paul C and Hiemenz, P. C. *Principles of colloid and surface chemistry*. vol. 188 (M. Dekker New York, 1986).
3. Bian, S., Mudunkotuwa, I. A., Rupasinghe, T. & Grassian, V. H. Aggregation and Dissolution of 4 nm ZnO Nanoparticles in Aqueous Environments : Influence of pH , Ionic Strength , Size , and Adsorption of Humic Acid. 6059–6068 (2011).
4. García-Lara, B. *et al.* Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Lett. Appl. Microbiol.* **61**, 299–305 (2015).
5. Gadd, G. E. & Casey, P. S. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO , bulk ZnO and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the. *Environ. Sci. Technol.* **41**, 8484–8490 (2007).
6. Valentini, M. & Filloux, A. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria. *J. Biol. Chem.* **291**, 12547–12555 (2016).
7. Tchigvintsev, A. *et al.* Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. *J. Mol. Biol.* **402**, 524–538 (2010).
8. Kim, A. Y. *et al.* Low temperature synthesis of hexagonal shaped α -Al₂O₃ using a solvothermal method. *J. Nanomater.* **2012**, (2012).
9. Zhou, S., Chen, S., Yuan, Y. & Lu, Q. Influence of Humic Acid Complexation with Metal Ions on Extracellular Electron Transfer Activity. *Nat. Publ. Gr.* (2015) doi:10.1038/srep17067.
10. Macdonald, T. L. & Bruce Martin, R. Aluminum ion in biological systems. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 15–19 (1988).
11. Lee, V. T. *et al.* A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* **65**, 1474–1484 (2007).
12. Harrison, J. J., Ceri, H. & Turner, R. J. Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 928–938 (2007).
13. Gauthier, E. *et al.* Aluminum forms in drinking water and risk of Alzheimer's disease. *Environ. Res.* **84**, 234–246 (2000).
14. Rubinos González, D. *Utilización de lodos rojos de bauxita en la contención e inactivación de residuos tóxicos y peligroso*. (Univ Santiago de Compostela).
15. Arcila, E. J. A. Remoción de aluminio en aguas residuales industriales usando especies macrófitas: una aplicación para el pasto vetiver. (2014).

Anexo:

Prospectivas de reutilización

*“Es la alegría de empezar algo nuevo, sentir normalidad
No es casual que no pueda sentir este entierro,
Dr. Jekyll y Mr. Hide”*

Anexo: perspectivas de reutilización

Introducción

Es inevitable que con el paso del tiempo se desarrollen nuevas tecnologías que permitan solucionar problemas hasta ahora inconclusos para mejorar la calidad de vida de la población. El empleo de la nanotecnología ha superado ampliamente las expectativas y si bien algunos NMs se encuentran en fase prueba otros ya se utilizan cotidianamente sin riesgo aparente. La evaluación del impacto que tienen los NMs es un factor muy importante para evitar problemas de contaminación a las generaciones futuras.

En el presente trabajo de tesis se estudiaron la interacción de tres tipos de NMs y su relación con sistemas de composición similar al natural. Se ha demostrado que existen modificaciones del entorno sobre estos materiales, derivando en un potencial aumento de la toxicidad.

Es necesario que, para el descarte de NMs al medio ambiente haya un tratamiento previo que mitigue de alguna forma la toxicidad aparente de los mismos. Sin embargo, en el caso de los MWCNT, se demostró que la presencia de residuos metálicos catalíticos le confiere al MWCNT una reactividad especial muy nociva para el medio ambiente. Además, estos residuos se encuentran en una asociación muy íntima con el MWCNT, lo que hace que los procesos de remoción resulten muy complejos y con un costo elevado.

Es por ello que en este anexo se presentan dos usos alternativos a la utilización cotidiana de MWCNT comerciales, sin purificación previa y sin en empleo de tecnología muy costosa. Estos métodos podrían usarse para reciclar la muestra de MWCNT que no se utiliza, evitando así el descarte al medio ambiente.

En las próximas secciones se detallarán algunos trabajos que se realizaron el marco de esta tesis, con la muestra de MWCNT comerciales sin purificación previa, en la Universidad Politécnica de Torino (PoLiTo-Italia) y en la Universidad Nacional de Torino (UniTo-Italia), empleando MWCNT comerciales para solventar otras problemáticas actuales.

Utilización de nanotubos múltiple capa comerciales para la inducción de fotopolimerización catiónica de resinas de epóxido

Introducción

En los últimos años, los procesos de polimerización fotoinducida han ganado interés debido a su potencial empleo en revestimientos, adhesivos, tintas y microelectrónica¹. Recientemente nuevas metodologías fotoquímicas han sido desarrolladas para la obtención de polímeros con una estructura, funcionalidad y peso molecular controlado^{2,3}. La fotopolimerización puede ser iniciada por varias vías, entre las que se destacan la formación de radicales catiónicos y aniónicos. Se han desarrollado fotoiniciadores que actúan frente a longitudes de onda comprendidas en el UV, visible⁴ o incluso en el IR^{5,6,7}. Debido a que los procesos que involucran luz UV son muy costosos energéticamente, es necesario el desarrollo de técnicas que permitan los procesos de fotoactivación de la polimerización empleando luz en el rango de longitud onda del visible. Si bien la fotopolimerización mediante radicales libres está en etapas avanzadas, hay muchas investigaciones que actualmente se centran en desarrollar fotoiniciadores empleando luz visible para el modo catiónico, ya que muchos monómeros actualmente importantes para la industria, como los epóxidos y los éteres vinílicos, solo pueden ser polimerizados por mecanismos catiónicos insensibles a la inhibición por oxígeno.

Las estrategias generales para generar polimerizaciones catiónicas en el rango visible involucran la oxidación⁸ de radicales por sales de “onio”⁹ (también llamada polimerización catiónica promovida por radicales libres), la formación de complejos de transferencia de carga¹⁰, y reacciones de transferencia de electrones¹¹ en la cercanías de los compuestos aromáticos y las sales de onio. Se ha publicado que varios colorantes¹², silanos¹³ y politiofenos¹⁴ pueden inducir eficientemente la reducción de las sales de onio, incluso bajo luz visible.

Por otra parte, los MWCNT semiconductores pueden utilizarse en fotoquímica para producir una separación de cargas “hueco-electrón” o la formación de un excitón bajo irradiación, tal como se demostró en el presente trabajo de tesis.

Estudios previos reportan que las nanopartículas de semiconductores¹⁵ y las partículas de magnetita¹⁶ son capaces de generar radicales bajo excitación por irradiación, un proceso que puede iniciar la polimerización radicalaria de monómeros de vinilos. El mecanismo de iniciación está basado en la reacciones de electrones y huecos generados en la banda de conducción y de valencia respectivamente, en analogía con el comportamiento general de los MWCNT. El mecanismo puede observarse en la figura A.1. tanto los huecos como los electrones pueden participar en la generación de radicales iniciadores.

Como los procesos de polimerización catiónica pueden ser iniciados con éxito por procesos de oxidorreducción, que involucran radicales generados fotoquímicamente y sales de yodinio¹⁷, parece apropiado el empleo de MWCNT para la fotopolimerización catiónica.

En este trabajo en particular, se describe una nueva metodología para la fotopolimerización catiónica de epóxidos a través de la generación de pares hueco-electrón inducidos por irradiación visible en MWCNTs, seguido de reacciones de transferencia electrónica con sales de yodinio. El mecanismo propuesto fue evaluado y confirmado por resonancia paramagnética electrónica (EPR) y los films generados fueron caracterizados por sus propiedades termomecánicas.

Figura A.1. (A) Esquema de polimerización radicalaria inducida por luz visible con MWCNT. (B) Oxidación de los radicales formados por luz visible en MWCNT seguido de la abstracción de hidrógeno.

Sección experimental

Se utilizaron carboxilato de 3,4-epoxiciclohexilmetil-3,4-epoxiciclohexano (EEC) y p(octiloxilfenil)feniliodonio hexafluoroantimonato (Sigma Aldrich) y NC 7000 MWCNT de Nancocyl S.A sin purificación previa.

Preparación de la muestra

Los MWCNT fueron dispersados en concentraciones de entre 0.05 y 0.3 %p/p en la resina epoxi y mezclado con un homogeneizador Ultra-Turrax IKA, A 30.000 rpm por 5min. Luego del mezclado se agregó la sal de yodonio (agente fotoiniciador) hasta llegar a una concentración final de 3 %p/p. Las formulaciones se colocaron en un sustrato de polipropileno utilizando un aplicador de alambre enrollado (espesor del film 100 μ m). Los films fueron irradiados con una lámpara visible (Hamamatsu LC8, con un bulbo visible y un filtro para longitudes de onda menor a 400nm) bajo atmósfera inerte de nitrógeno.

Caracterización

Para medir el grado de avance del proceso de fotopolimerización se utilizó la espectroscopía FT-IR durante la irradiación, monitoreando la conversión del grupo epoxi empleando un equipo Thermo-Nicolet 5700. La conversión del grupo epoxi se calculó monitoreando el descenso en la absorbancia del grupo epoxi entre 780 y 820 cm^{-1} . Las medidas se realizaron empleando un soporte de SiC con un espesor de film de 25 μm , colectando el espectro FT-IR antes y después de la irradiación.

El análisis mecánico dinámico (DMA) en estudios de procesos de relajación y en reología, sirve para estudiar y caracterizar el comportamiento de materiales viscoelásticos como polímeros y sus respuestas ante impulsos, estrés, deformación en tiempo y frecuencia. El DMA utiliza el principio de estímulo-respuesta. Para ello, se aplica una fuerza oscilante a la muestra y se mide el desplazamiento resultante, se determina la rigidez de la muestra y se calcula el módulo de la muestra. Por medio de la medición del lapso entre el desplazamiento y la fuerza aplicada es posible determinar las propiedades de deformación del material.

El análisis dinámico termo-mecánico (DMTA) se realizó sobre los sustratos luego de la fotopolimerización empleando un MK III Reometrics Scientific Instrument, a una frecuencia de 4Hz. El módulo de almacenamiento E' y el factor de pérdida $\text{Tan}\delta$ de monitorearon en función de la temperatura hasta alcanzar la temperatura de transición vítrea, que se tomó en el máximo del factor de pérdida $\text{Tan}\delta$.

Resultados y discusión

Debido a que los monómeros de EEC contienen dos grupos epoxi, pueden ser reticulados en condiciones adecuadas. Este trabajo se centra en el estudio del empleo de MWCNTs como fotoiniciadores en fotopolimerización catiónica de resinas epoxílicas empleando luz visible como fuente de excitación.

La sal de iodonio se agregó en una concentración de 3%p/p a las formulaciones que contenían 0.05, 0.1 y 0.3 %p/p de MWCNT, las que luego se irradiaron con luz visible con longitud de onda por encima de 400 nm. A estas longitudes de onda la sal de iodonio no presenta absorción. Sin embargo, las formulaciones conteniendo MWCNT reticulan cuando se las irradia a longitudes de onda > 400 nm y forman un film sólido, confirmando el efecto de los MWCNT.

La conversión del monómero durante la irradiación se evaluó mediante espectroscopía FT-IR, siguiendo el pico del grupo epoxi a 815-780 cm^{-1} , que luego de 30 min presenta una disminución importante con un porcentaje de conversión del 75% para la concentración de MWCNT de

0.05%. En la tabla A.1. se detallan los porcentajes de conversión en función de la concentración. El hecho de que para mayores porcentajes de MWCNT la conversión es menor puede deberse al efecto de filtro interno de la muestra de MWCNT.

MWCNT (%p/p)	Sal de iodonio (%p/p)	Tiempo de irradiación (min)	Porcentaje de conversión (%)
0.05	3	30	75
0.1	3	30	58
0.3	3	30	50

Tabla A.1. Efecto de la concentración de MWCNT en la fotopolimerización catiónica iniciada por luz visible con $\lambda > 400\text{nm}$.

En el proceso, los radicales formados por los MWCNT bajo irradiación pueden sustraer hidrógeno del anillo epoxi del monómero para generar radicales oxidados¹⁸. Estos radicales donantes de electrones pueden ser oxidados por las sales de iodonio para generar las especies catiónicas correspondientes, capaces de propagarse produciendo redes debido a la naturaleza bifuncional del monómero (figura A.1.B).

Figura A.2. Curvas de $\text{Tan}\delta$ vs Temperatura de los films obtenidos conteniendo 0.05, 0.1 y 0.3%p/p y 3%p/p de fotoiniciador.

El efecto de la cantidad de MWCNT en las propiedades termomecánicas fue investigado por DMTA. Como puede verse en la figura A.2., a medida que la concentración de MWCNT aumenta, hay un descenso significativo de la temperatura de transición vítrea, con un desplazamiento del máximo de $\text{Tan}\delta$ hacia valores de menor temperatura. Esta observación surge de un porcentaje de reticulación menor, en concordancia con los ensayos de FT-IR.

Conclusiones

En este trabajo se demostró el efecto de la muestra de MWCNT comerciales para actuar como iniciador, activado por luz visible, en la fotopolimerización catiónica, inducida por especies radicalarias de monómeros epoxi. También se demostró que el porcentaje de la conversión es dependiente de la cantidad de MWCNT, observándose un decrecimiento de la conversión del monómero y una disminución de la temperatura de transición vítrea de los films generados con el aumento de la concentración de MWCNT.

Utilización de nanotubos múltiple capa comerciales inmovilizados en fibras sintéticas para el empleo en tratamientos de contaminantes en agua

Los estudios realizados en el presente trabajo con pMWCNT revelan que la presencia de residuos catalíticos provenientes de la síntesis le confieren a los nanotubos comerciales una reactividad química particular. Los pMWCNT son capaces de interactuar fuertemente con una fuente de fotones, produciendo especies reactivas radicalarias de distinta naturaleza.

El descarte de estos NMs al ambiente puede traer consecuencias graves, principalmente debido a la modificación por el entorno, entre las que destacamos la presencia de MOD y luz solar, así también como la producción de especies reactivas.

Los MWCNT, tal como se describió previamente, son materiales que presentan una extensa área superficial y han sido propuestos para el tratamientos de aguas contaminadas debido a la capacidad de adsorber moléculas orgánicas e iones metálicos en su superficie¹⁹. La posibilidad de generar especies reactivas fotoinducidas, hace de estos NMs herramientas muy interesantes para la remoción de contaminantes. Sin embargo, las reacciones secundarias entre las que destacamos la liberación de metales y estructuras de carbono grafitico luego de la irradiación, son factores a tener en cuenta a la hora de diseñar un sistema que permita la fotodegradación de contaminantes, sin liberar moléculas no deseadas al entorno.

El empleo de nanofibras (NF) mecánicamente resistentes, conductoras y fotoactivas como las NF de poliacrilnitrilo-polipirrol (PAN-PPY) ofrece muchas ventajas en la fotodegradación de contaminantes, ya que pueden ser rápidamente removidas del agua de forma sencilla luego de la fotodegradación. Además, la síntesis de estas NF por la técnica conocida como “electrospinning” ofrece la posibilidad de ser escalable, rápida y de bajo costo, empleando materiales ambientalmente amigables. En este trabajo, se emplearon los pMWCNT para la modificación superficial de PAN-PPY.

Materiales y métodos.

En este trabajo se utilizaron MWCNT comerciales Nanocyl S.A. NC7000 sin purificación previa. Poliacrilonitrilo Sarchem (PM: 50.000-70.000 Da). Pirrol (PY) (Sigma Aldrich, 98% p/p), Peroxidisulfato de Amonio (Sigma Aldrich), Acido 4-dodecilbencenosulfonico (DBSA Sigma Aldrich, 99%p/p), Rodamina B (Sigma Aldrich), Naftaleno (Sigma Aldrich) Dimetil formamida (Applichem), Acetonitrilo(Applichem), Ácido fosfórico (Cicarelli). En los experimentos se utilizó agua calidad MilliQ (TOC=2ppb, conductividad: 19.2 MΩ cm).

Síntesis de las nanofibras PAN

Se colocó una solución de poliacrilonitrilo (PAN) en DMF (20%p/p) en una jeringa comercial de 20 ml. Las NF se generaron utilizando un equipo de electrospinning equipado con una fuente de corriente directa Bertan series 230-30R. Las condiciones en las que se realizaron los procesos de electrospinning fueron las siguientes: humedad relativa: 40-48%; T: 22-25°C; Voltaje: 16kV; Distancia: 20 cm; Flujo: 0,8-0,65 ml/h; Soporte: superficie de aluminio. Las fibras resultantes fueron tratadas para la limpieza y esterilización con un equipo ozonizador (CANDET, Toronto,CA) equipado con una lámpara UV de 15W (303nm, UVP,CA,USA) durante 3 minutos por cada lado, con el objetivo de aumentar el comportamiento hidrofílico de la NF.

Funcionalización de la nanofibra PAN con Nanotubos de carbono y polipirrol (PPY-MWCNT)

La solución de polimerización se preparó mezclando dos soluciones diferentes, bajo agitación constante a 2-4°C, mediante un baño de hielo. La primer solución fue preparada colocando cantidades equimolares de DBSA (0,162gr) y PY (0,0355g, 50mM) en 10 ml de agua. La segunda solución conteniendo APS (0,1141g, 100mM) en 5 ml de agua, se agregó gota a gota sobre la primera. Luego de 90 min a 4-5°C, la solución toma una coloración verdosa y ya está lista para agregarla gota a gota sobre la NF PAN. Las NF impregnadas se dejan secar manteniendo la temperatura constante a 5°C. Una vez secas, una dispersión acuosa de MWCNT (200ppm, asegurando la dispersión utilizando un sonicador de punta) se agregó gota a gota sobre la nanofibra impregnada, hasta visibilizar una cobertura macroscópica. Este procedimiento se realizó dos veces para asegurar una cobertura homogénea de la fibra. Una vez secas las NF, se volvieron a impregnar con la solución de polimerización y se dejó reposar por 6-7h hasta que la fibra se tornara de un color negro oscuro. Finalmente, las NF se dejaron reposar a 4-5°C y fueron lavadas con abundante agua antes de su uso, con el objetivo de remover el surfactante en exceso.

Caracterización de la muestra

Muchos de los ensayos empleados para la caracterización se encuentran detallados en el presente trabajo de tesis y sus fundamentos y características se encuentran plasmados en el capítulo 2: Materiales y Métodos experimentales. Entre ellos destacamos la difracción de rayos X (DRX), la determinación del área superficial por adsorción de nitrógeno, HR-TEM, ICP-MS, TGA, espectroscopía FT-IR y Raman, espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) y medidas de susceptibilidad

magnética. Es por ello por lo que la caracterización de la muestra de MWCNT no será objeto de este apartado.

Las micrografías SEM de las distintas muestras de NF fueron tomadas con un microscopio FEI Inspect F50 FE-SEM, equipado con análisis dispersivo de Rayos X EDAX Octane Super 60mm² SSD y TEAM EDS análisis. Las muestras fueron previamente recubiertas con una capa de 10nm de espesor de platino (Pt) utilizando un equipo LEICA EM ACE600.

Con el objetivo de investigar la estabilidad de las NF-PAN funcionalizadas, se realizaron medidas de la cantidad de carbono orgánico liberado en el medio por las fibras luego de distintos tiempos de irradiación. Para ello 2cm² de distintas nanofibras fueron inmersas en 15ml de agua e irradiadas con una Solar Box® equipada con una lámpara de Xe. Se tomó 1 ml de la solución irradiada y se la diluyó 1:20 para determinar la cantidad de carbono orgánico total.

Las medidas de fotodegradación fueron llevadas a cabo utilizando celdas cilíndricas de borosilicato Pyrex (1.0 cm de diámetro y 2,5 de altura, con línea de corte a los 295 nm). Se colocaron en cada celda 5 ml de una solución de Rodamina B junto con 2cm² de la nanofibra modificada. Se utilizó una Solar Box Sun simulator device como fuente de irradiación. Previo a la irradiación, las soluciones se dejaron reposar por 2 horas en oscuridad, con el objetivo de alcanzar el equilibrio de adsorción entre el sustrato y la muestra de PAN-PPY-MWCNT. Luego de la irradiación las soluciones fueron filtradas utilizando membrana hidrofílica PTFE 0,45µm (Millipore Millex-LCR). La absorción de la Rodamina B y la cinética de degradación se monitoreó con un espectrofotómetro UV-Vis Cary. La solución de Rodamina B inicial fue ajustada a una A⁵⁵⁰= 1,7 (3x10⁻⁶M). La cinética de absorción del naftaleno se monitoreó utilizando un equipo HPLC-UV YL9300 HPLC System equipada con una columna Lichrospher R100 RP-18 (5 µm). El volumen de inyección fue de 50 µL, con un flujo de elución de 1ml/min, en modo isocrático con una solución acuosa de H₃PO₄ (4.2 mM):CH₃CN en proporción 65:35 (tiempo de retención: 9,5min).

Funcionalización de la nanofibra PAN con polipirrol y nanotubos de carbono (PPY-MWCNT)

Una de las ventajas del procedimiento de polimerización con polímeros de pirrol es que es un proceso escalable, con bajo costo y conlleva pasos ambientalmente amigables y sencillos, pues no se requieren solventes orgánicos ni condiciones especiales. La reacción se lleva a cabo en agua, bajo atmósfera de aire y baja temperatura (4-5°C). Por último, el producto final puede ser completamente sintetizado en menos de un día.

Para optimizar la derivatización de las NF-PAN, fue necesario ensayar muchas condiciones, ordenes de agregado de reactivos, etc. En primera instancia, se requiere que la polimerización del PPY en la NF-PAN forme una cobertura continua y homogénea, de forma tal que la conductividad sea óptima. Estas condiciones se lograron luego de dos ciclos de

funcionalización con deposición gota a gota. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando un radio pirrol:oxidante:dopante de 1:2:1, donde el oxidante es el APS y el dopante es DBSA con capacidad de formación de dominios de PPY solubles en agua. En ausencia de DBSA, se forman aglomerados de PPY bajo la presencia del oxidante, incluso a bajas temperaturas.

Las mejores coberturas se obtuvieron cuando la concentración de pirrol es cercana a los 50mM. Concentraciones menores producen NF menos conductoras. Por el contrario, concentraciones mayores producen NF con una conductividad muy elevada y logran cubrir completamente la muestra de MWCNT, resultando una superficie menos efectiva.

Los dominios de adhesión del PPY dependen de la concentración superficial de los grupos hidrofílicos de la NF-PAN. Es por ello que un tratamiento rápido en una cámara de esterilización con ozono (O_3) incrementa drásticamente la hidrofiliidad, previniendo también que la fibra se doble sobre si misma o aumente su volumen en contacto con agua.

Con el objetivo de tener un estudio más detallado acerca de la actividad y las propiedades mecánicas de la muestra se prepararon distintas alternativas. Llamaremos PAN-PPY-MWCNT al sistema que presentaba mayor actividad fotocatalítica.

1. La NF-PAN fue cubierta solo con PPY (2 ciclos de deposición), para investigar la contribución indirecta de la muestra de MWCNT. La muestra fue rotulada como "PAN-PPY".
2. La NF-PAN se recubrió con MWCNT (200ppm, 2 ciclos de cobertura) para investigar rol del PPY como un nexo entre el MWCNT y la fotoactividad del PPY. El sistema resultante no presentó una estabilidad mecánica muy buena en contacto con el agua: la NF aumentaba considerablemente su tamaño liberando MWCNT hacia el medio.
3. El mismo sistema descrito anteriormente (PAN + MWCNT) fue empleado, secando por 1h a 100°C, luego de 2 ciclos de deposición. Este sistema exhibió una excelente estabilidad mecánica una vez inmersa en agua, sin presentar aumento de tamaño ni la liberación de MWCNT. La muestra se rotuló como "PAN-MWCNT".
4. Las NF-PAN fueron cubiertas en una primera instancia con PPY y luego con la suspensión 200ppm de MWCNT (2 ciclos), sin una cobertura final con PPY. Esta muestra permite evaluar indirectamente el rol de la cobertura final de PPY en la estabilidad mecánica de la capa de MWCNT así también como la fotoactividad y capacidad de adsorción de los MWCNT en contacto con la capa de PPY. Estas fibras resultaron mecánicamente estables, pero liberaban restos de MWCNTs hacia el medio circundante.

5. La nanofibra PAN fue cubierta primeramente con la suspensión de MWCNT (200ppm, 2 ciclos) y luego por PPY. No hubo una cobertura inicial de PPY. Esta muestra permite investigar el efecto de la primera capa de PPY en la funcionalización de la nanofibra PAN para el anclado de los MWCNT y su estabilidad mecánica. La estabilidad mecánica resultante de esta fibra resultó ser mucho menor en comparación con la muestra armada en el ítem 2.
6. Se utilizó una suspensión 50ppm de MWCNT en agua como referencia para entender las diferencias en la actividad de los MWCNT libres en comparación con las inmovilizadas en las fibras. La muestra se rotuló como “MWCNT”.

La topología a nivel microscópico y la evolución estructural de las nanofibras PAN-PPY, antes y después de la funcionalización con MWCNT se investigó por FEI-SEM. En la figura A.3a puede observarse que la nanofibra PAN tratada con ozono es blanca, con una superficie regular con grosores monodispersos alrededor de 550nm. La figura A3b, corresponde a la fibra conteniendo PAN y PPY. La superficie de la NF es rugosa debido a la presencia del PPY. Pueden observarse dominios de mayor tamaño cuando dos o más NF se encuentran en contacto. El incremento del grosor de la fibra viene seguido de una caída en la monodispersidad ($780\pm350\text{nm}$). Por último, puede observarse en la figura A.3c que los MWCNT se encuentran inmersos en las fibras PAN-PPY, gracias a la polimerización de una capa adicional de PPY. La muestra de MWCNT se encuentra formando parte de la capa de PPY, lo que garantiza la adhesión y estabilidad mecánica.

Figura A.3. Micrografías SEM de a) NF-PAN luego del tratamiento con ozono por 3,5 min, b) NF-PAN luego de 2 ciclos de polimerización con PPY y c) NF con MWCNT soportados y cubiertos con PPY. En la esquina superior derecha pueden observarse la estructura macroscópica de la nanofibra luego de cada funcionalización.

Producción de $\bullet\text{OH}$ bajo irradiación

La generación de radicales $\bullet\text{OH}$ durante la irradiación se determinó por análisis EPR utilizando DMPO como agente atrapante. Las fibras se colocaron en las celdas de Pirex y se irradiaron por 30 min utilizando una SolarBox. Luego se colocó el agente atrapante y se irradió 5 minutos más, antes de colocarlos en el capilar de vidrio para su análisis.

En la figura A.4. se presentan los espectros de EPR de la fibra PAN. La señal observada en esta muestra puede deberse a los restos de iniciadores radicalarios utilizados para polimerizar las unidades de acrilnitrilo en las nanofibras PAN. La fibra PAN-MWCNT exhibe un espectro con menor intensidad probablemente debido a la inactivación de las especies reactivas producidas en presencia de MWCNT.

Figura A.4. Espectro EPR de la nanofibra PAN (arriba) y la nanofibra PAN-MWCNT(abajo).

También se analizaron las fibras PAN-PPY, PAN-PPY-MWCNT antes y después de realizar ensayos de fotodegradación. Como control, se realizaron las medidas en las mismas condiciones, pero utilizando MWCNT tratados previamente con HCl para generar la nanofibra (PAN-PPY-MWCNT_{HCl}). En la Figura A.5. se presentan los espectros EPR de todas las muestras anteriormente nombradas, en donde puede notarse cómo la cobertura con MWCNT incrementa la producción de $\bullet\text{OH}$. Por el contrario,

la remoción de los metales fotocatalíticos mediante un tratamiento con HCl de los MWCNT conlleva a un descenso en la fotoproducción de $\bullet\text{OH}$, en concordancia con los ensayos realizados en el capítulo 3 de la presente tesis, confirmando el rol central de las NP metálicas en la actividad fotocatalítica de la muestra de MWCNT comerciales.

Puede notarse también que la producción de $\bullet\text{OH}$ no se ve disminuida luego de realizar los ciclos de degradación. Aparentemente la irradiación UV-Vis activa la superficie de MWCNT, removiendo capas oxidadas de los nanotubos y carbono amorfo, aumentando la eficiencia en la fotogeneración de $\bullet\text{OH}$.

Figura A.5. Espectro EPR de las fibras PAN-PPY, PAN-PPY-MWCNT_{HCl} y PAN-PPY-MWCNT antes y después de 1 y dos ciclos de fotodegradación.

Ensayos de adsorción

En la Figura A.6. puede observarse la curva de adsorción de la fibra PAN-PPY-MWCNT utilizando las sondas de naftaleno y RB. Puede notarse que hay una absorción marcada de ambas sondas entre los primeros 30 minutos, indicando adsorción superficial. Se realizaron los mismos ensayos empleando cafeína y naranja de metilo, pero en estos casos la adsorción fue nula.

Figura A.6. Ensayos de absorción monitoreando la absorbancia al máximo de excitación de RB (puntos rosas), naftaleno (puntos azules), naranja de metilo (puntos naranjas) y cafeína (puntos grises) en la muestra PAN-PPY-MWCNT.

Ensayos de fotodegradación

Los ensayos de fotodegradación se midieron utilizando las muestras PAN-MWCNT, PAN-PPY Y PAN-PPY-MWCNT y cuatro sondas diferentes: Rodamina B (RB), Naftaleno, Naranja de metilo y cafeína.

Ni el naranja de metilo ni la cafeína presentan adsorción significativa sobre las nanofibras por lo que la fotodegradación resultó nula. La RB y el naftaleno se absorbieron parcialmente en las muestras de PAN-PPY y PAN-

PPY-MWCNT con un descenso en la concentración importante luego de la irradiación. Para la muestra de PAN-PPY-MWCNT (2cm²) se observó una capacidad de adsorción de 30±10 % para la muestra de RB y 45±10% para el caso del naftaleno. La adsorción para la nanofibra de PAN-PPY fue cercana a la muestra de PAN-PPY-MWCNT (5-10% menor en ambos casos), lo que indica un rol crucial de la capa de PPY en los procesos de adsorción de la sonda.

La muestra de MWCNT probablemente esté unida a las cadenas de PPY a través de los sitios superficiales activos. Estudios anteriores plantean que la polimerización del PPY en presencia de MWCNT induce la formación de agregados sobre los nanotubos²⁰, alterando las propiedades de adsorción. Por otra parte, la elevada área superficial y la conductividad propia de los MWCNT incrementa las propiedades de oxidorreducción del PPY²⁰.

En la figura A.6(a) se presenta el descenso de la concentración relativa de RB en función del tiempo, para las distintas muestras empleadas, junto con la fotólisis directa en ausencia del sustrato. En la figura A.7(b) se presentan los valores de las constantes cinéticas calculadas a partir de las curvas, asumiendo una cinética de pseudo primer orden. La contribución de la fotólisis directa no es muy significativa y representa el 20% del total de la degradación.

Figura A.7. a) primeros dos ciclos de fotodegradación de Rodamina B (10⁻⁵M) utilizando PAN-MWCNT(▲), PAN-PPY(■), PAN-PPY-MWCNT (◆) y el control de fotólisis directa (●) y b) Constantes cinéticas determinadas a partir de las curvas en el panel a).

Tanto en el caso de RB como del naftaleno, la muestra de PAN-MWCNT exhibió una capacidad de remoción muy baja (observar también figura A.7), y las curvas de degradación se asemejan a las obtenidas por fotólisis directa. Este resultado es inesperado teniendo en cuenta la alta producción

de $\bullet\text{OH}$ detectada por EPR. Los resultados pueden explicarse desde el punto de vista de la baja o nula adsorción de la sonda en la nanofibra.

Por otra parte, la muestra PAN-PPY es capaz de degradar RB y naftaleno (figura A.7) a pesar de la baja detección de $\bullet\text{OH}$. Probablemente en la degradación de RB y naftaleno estén involucradas otras especies reactivas (anión radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$ o transferencia de cargas fotoinducidas^{21,22}). Otra posible explicación es que la pequeña porción de $\bullet\text{OH}$ fotogenerados por la nanofibra PAN reaccione con el sustrato que se encuentra adsorbido sobre el polímero conductor de PPY.

Es importante mencionar que la concentración de especies reactivas en las proximidades de los sistemas irradiados podría ser órdenes de magnitud mayor que el valor medido por EPR en la fase acuosa^{23,24}.

Figura A.8. Primeros dos ciclos de la fotodegradación de naftaleno (5ppm en agua), llevadas a cabo utilizando PAN-MWCNT ($\blacktriangle$), PAN-PPY ($\blacksquare$), PAN-PPY-MWCNT ($\blacklozenge$) y el control de fotólisis directa ($\bullet$).

La comparación entre las cinéticas de fotodegradación del naftaleno demuestran que la presencia de MWCNT en la nanofibra PAN-PPY no potencia la degradación, lo que indica que los mecanismos de degradación del naftaleno están gobernados por la generación de otras especies reactivas, que no son detectadas por EPR (como $\text{O}_2^{\bullet-}$ o transferencia del hueco electrón)^{21,22}. La absorción del naftaleno sobre los pMWCNT podría tener un efecto parecido al de los AH, es decir se absorbe el naftaleno sobre el MWCNT desplazando los metales adsorbidos. Esta situación disminuye el efecto de separación de cargas que tienen los metales remanentes de la síntesis en muestras de pMWCNT cuando se las irradia.

Controversialmente, la presencia de pMWCNT en el sistema PAN-PPY potencia la fotodegradación comparada con las muestras PAN-PPY y PAN-MWCNT, debido a la interacción sinérgica entre las nanopartículas metálicas remanentes de la síntesis y los MWCNT en muestras pMWCNT y el polímero conductor de PPY, promoviendo la separación de cargas fotoinducida. La extensa área superficial del polímero conductor PPY permite la migración de las cargas fotogeneradas desde el MWCNT a las moléculas del sustrato adsorbido en la NF.

Luego del primer ciclo, las NF fueron removidas desde la solución, lavadas con abundante agua milliQ y utilizada para otro ciclo de fotodegradación. En la figura A.8 puede verse que la eficiencia de degradación luego de dos ciclos es muy cercana al ciclo anterior, demostrando estabilidad en las condiciones de operación.

Con el objetivo de evaluar la estabilidad de las fibras, se determinó la cantidad de carbono orgánico mediante análisis TOC, luego de distintos tiempos de irradiación (desde 0 a 120 min, tabla A.2 y A.3). Las especies de carbono fueron liberadas entre los primeros 15-30min. Luego de ese tiempo la pérdida de carbono tiende a cero. La cantidad de especies de carbono medidos desde la muestra de PAN-MWCNT es muy cercana a los valores de TOC del agua milliQ. La muestra de PAN-PPY liberan 0,21 mg/cm² de carbono, en los primeros 30 min de irradiación. Un valor similar fue determinado para la muestra de PAN-PPY-MWCNT (0,16 mg/cm²). Estos resultados demuestran que la mayor parte de carbono liberado pertenece a la cobertura de PPY (debido a las pequeñas cadenas de PPY solubles en agua). Dada la toxicidad de los MWCNT, su uso masivo podría generar una exposición al medio ambiente desencadenando riesgos irreversibles para la salud humana y los ecosistemas, por lo que resulta importante producir materiales con una liberación nula de MWCNT al medio.

Cantidad (mg) de carbono orgánico disueltos en 10 ml de solución examinada			
Tiempo de irradiación (min)	PAN-MWCNT	PAN-PPY	PAN-PPY- MWCNT
0	0.16	0.37	0.30
15	0.19	0.54	0.41
30	0.17	0.56	0.44
60	0.15	0.56	0.45
120	0.17	0.57	0.44

Tabla A.2. Cantidad (mg) de carbono orgánico disuelto en 10 ml de agua MilliQ (medida por análisis TOC), en presencia de 2 cm² de las NF funcionalizadas luego de distintos tiempos de irradiación. El valor de TOC del agua MilliQ empleado para los ensayos fue de 0,014 mgC/ml, la mayoría proveniente del plástico del recipiente contenedor.

Cantidad (mg) de Carbono orgánico liberado por cm ² de nanofibra			
Tiempo de irradiación (min)	PAN-MWCNT	PAN-PPY	PAN-PPY- MWCNT
0	0.01	0.11	0.08
15	0.02	0.20	0.14
30	0.01	0.21	0.15
60	0.01	0.21	0.16
120	0.02	0.21	0.15

Tabla A.3. Cantidad de Carbono orgánico (mg) liberado desde las nanofibras funcionalizadas (normalizadas por el área de cada nanofibra) luego de distintos tiempos de irradiación. Los valores fueron calculados a partir de la tabla A.2, sustrayendo el promedio del valor de TOC presente en el agua MilliQ y normalizando por el área de cada nanofibra individual.

En conclusión, la fotoexcitación de los MWCNT bajo irradiación UVA induce una separación de cargas con la formación de un excitón. En el sistema de PAN-PPY-MWCNT, es la muestra de MWCNT la que actúa como una fuente de excitones mientras que la adsorción de los sustratos ocurre preferencialmente en las fibras de PPY, ya que los sitios libres de unión de los MWCNT se encuentran posiblemente ocupados al interaccionar con los dominios de PPY^{20,25}.

Bajo luz visible, los polímeros de PPY conductores promueven la formación de estados excitados de separación de cargas, induciendo una separación de cargas en la interfase con MWCNT²⁵. Estudios anteriores plantean que las estructuras π -conjugadas del PPY son donores eficientes de electrones, así también como un eficiente transportador de los huecos fotogenerados a semiconductores en la interfase^{21,22}. Los huecos producidos desde el MWCNT pueden ser colectados y deslocalizados en la superficie del PPY para luego oxidar a los sustratos adsorbidos.

En todos los casos se observó que los procesos de adsorción son necesarios para la fotodegradación. Cuando el sustrato no está adsorbido en la superficie de la NF funcionalizada, las especies reactivas fotogeneradas por el MWCNT durante la irradiación son desactivadas por el mismo MWCNT o por el soporte polimérico (PAN o PPY)^{26,27}. Debido a que el MWCNT se encuentra en contacto con las NF, la reacción de desactivación con el soporte es estadísticamente favorecida, en comparación con el sustrato disuelto en fase acuosa. En cambio, si la sonda se encuentra adsorbida, en contacto con el PPY o el MWCNT, puede competir para la reacción con las especies reactivas fotogeneradas.

Conclusiones

En este trabajo se logró la optimización de los procesos de funcionalización de nanofibras de PAN-PPY con MWCNT comerciales. Estas NF se mostraron efectivas para su empleo como fotocatalizadores capaces de remover contaminantes en solución acuosa, bajo irradiación UV-Vis. Las NF funcionalizadas son fácilmente removibles desde la solución a tratar y pueden reutilizarse inmediatamente luego de un sencillo lavado, evitando procesos más complicados que pueden involucrar filtración, centrifugación, etc. Más aún, el sistema combinado PAN-PPY-MWCNT se mostró eficiente en la degradación de Rodamina B, en comparación con las muestras de PAN-PPY y PAN-MWCNT por separado. También se demostró la importancia de los residuos catalíticos que forman parte de la estructura del MWCNT en las propiedades fotocatalíticas de la muestra. Para que ocurra la fotodegradación, primero es necesario que la molécula se adsorba superficialmente en la NF. Sin embargo, la fotodegradación también es dependiente de la sonda que se utiliza. En el caso de la RB, que es una molécula cargada con una estructura tridimensional, la fotodegradación es muy efectiva mientras que el naftaleno, que es una molécula plana, tiene mucha menor eficiencia de fotodegradación. Los resultados de la tesis sugieren que la adsorción de este tipo de moléculas orgánicas desplaza los metales catalíticos que se encuentran en la superficie del nanotubo, generando que la separación de cargas sea menor, trayendo como consecuencia un descenso en la eficiencia de fotodegradación. Una vez adsorbido el naftaleno, la pérdida de metales haría que los MWCNT se comportaran como la muestra de HCl-MWCNT, presentando baja producción de ERs (figura A.5).

El sistema muestra la ventaja de utilizar reactivos ambientalmente amigables, tener una síntesis sencilla y escalable a gran escala, además de una estabilidad térmica y mecánica pronunciada bajo irradiación, con poca liberación de compuestos carbonados provenientes de la degradación.

Referencias

1. Yagci, Y., Jockusch, S. & Turro, N. J. Photoinitiated polymerization: advances, challenges, and opportunities. *Macromolecules* **43**, 6245–6260 (2010).
2. Aydogan, C., Ciftci, M., Kumbaraci, V., Talinli, N. & Yagci, Y. Hyperbranched Polymers by Photoinduced Self-Condensing Vinyl Polymerization Using Bisbenzodioxinone. *Macromol. Chem. Phys.* **218**, 1700045 (2017).
3. Aydogan, C., Yilmaz, G. & Yagci, Y. Synthesis of hyperbranched polymers by photoinduced metal-free ATRP. *Macromolecules* **50**, 9115–9120 (2017).
4. Fouassier, J. P., Allonas, X. & Burget, D. Photopolymerization reactions under visible lights: principle, mechanisms and examples of applications. *Prog. Org. coatings* **47**, 16–36 (2003).
5. Shao, J., Huang, Y. & Fan, Q. Visible light initiating systems for photopolymerization: status, development and challenges. *Polym. Chem.* **5**, 4195–4210 (2014).
6. Karatsu, T. *et al.* Evaluation of sensitizing ability of barbiturate-functionalized non-ionic cyanine dyes; application for photoinduced radical generation system initiated by near IR light. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **170**, 123–129 (2005).
7. Schmitz, C., Halbhuber, A., Keil, D. & Strehmel, B. NIR-Sensitized Photoinitiated Radical Polymerization and Proton Generation with Cyanines and LED Arrays. *Prog. Org. Coatings* **100**, 32–46 (2016).
8. Abdul-Rasoul, F. A. M., Ledwith, A. & Yagci, Y. Thermal and photochemical cationic polymerisations induced by AgPF 6 in the presence of free radical initiators. *Polym. Bull.* **1**, 1–6 (1978).
9. IUPAC. Onium compounds definition at IUPAC Gold Book.
10. Hizal, G., Yağci, Y. & Schnabel, W. Charge-transfer complexes of pyridinium ions and methyl-and methoxy-substituted benzenes as photoinitiators for the cationic polymerization of cyclohexene oxide and related compounds. *Polymer (Guildf)*. **35**, 2428–2431 (1994).
11. Dossow, D., Zhu, Q. Q., Hizal, G., Yag, Y. & Schnabel, W. Photosensitized cationic polymerization of cyclohexene oxide: a mechanistic study concerning the use of pyridinium-type salts. *Polymer (Guildf)*. **37**, 2821–2826 (1996).
12. Lalevée, J. *et al.* Dye photosensitized cationic ring-opening polymerization: search for new dye skeletons. *Polymer (Guildf)*. **53**, 4947–4954 (2012).
13. Lalevée, J., Blanchard, N., Tehfe, M. & Fouassier, J. P. Decatungstate (W100)/Silane: A New and Promising Radical Source Under Soft Light Irradiation. *Macromol. Rapid Commun.* **32**, 838–843 (2011).
14. Zhang, J. *et al.* Design of Novel Photoinitiators for Radical and Cationic Photopolymerizations under Near UV and Visible LEDs (385, 395, and 405 nm). *Macromolecules* **47**, 2811–2819 (2014).

15. Hoffman, A. J., Mills, G., Yee, H. & Hoffmann, M. R. Q-sized cadmium sulfide: synthesis, characterization, and efficiency of photoinitiation of polymerization of several vinylic monomers. *J. Phys. Chem.* **96**, 5546–5552 (1992).
16. Sangermano, M. *et al.* Photoinitiator-free UV-cured acrylic coatings containing magnetite nanoparticles. *Macromol. Chem. Phys.* **211**, 2530–2535 (2010).
17. Mariani, A. *et al.* UV-ignited frontal polymerization of an epoxy resin. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **42**, 2066–2072 (2004).
18. Crivello, J. V. The discovery and development of onium salt cationic photoinitiators. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **37**, 4241–4254 (1999).
19. Helland, A., Wick, P., Koehler, A., Schmid, K. & Som, C. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* **115**, 1125–1131 (2007).
20. Hughes, M., Chen, G. Z., Shaffer, M. S. P., Fray, D. J. & Windle, A. H. Electrochemical capacitance of a nanoporous composite of carbon nanotubes and polypyrrole. *Chem. Mater.* **14**, 1610–1613 (2002).
21. Harraz, F. A., Ismail, A. A., Al-Sayari, S. A. & Al-Hajry, A. Novel α -Fe₂O₃/polypyrrole nanocomposite with enhanced photocatalytic performance. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **299**, 18–24 (2015).
22. Zhang, Z., Wang, W. & Gao, E. Polypyrrole/Bi₂WO₆ composite with high charge separation efficiency and enhanced photocatalytic activity. *J. Mater. Sci.* **49**, 7325–7332 (2014).
23. Qu, X., Alvarez, P. J. J. & Li, Q. Photochemical transformation of carboxylated multiwalled carbon nanotubes: role of reactive oxygen species. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 14080–14088 (2013).
24. Latch, D. E. & McNeill, K. Microheterogeneity of singlet oxygen distributions in irradiated humic acid solutions. *Science (80-.).* **311**, 1743–1747 (2006).
25. Zhou, C., Kumar, S., Doyle, C. D. & Tour, J. M. Functionalized single wall carbon nanotubes treated with pyrrole for electrochemical supercapacitor membranes. *Chem. Mater.* **17**, 1997–2002 (2005).
26. Guldi, D. M. *et al.* Single-Wall Carbon Nanotube–Ferrocene Nanohybrids: Observing Intramolecular Electron Transfer in Functionalized SWNTs. *Angew. Chemie Int. Ed.* **42**, 4206–4209 (2003).
27. Álvaro, M., Atienzar, P., Bourdelande, J. L. & García, H. An organically modified single wall carbon nanotube containing a pyrene chromophore: fluorescence and diffuse reflectance laser flash photolysis study. *Chem. Phys. Lett.* **384**, 119–123 (2004).

Publicaciones aceptadas durante el período comprendido en la presente tesis

Título: Multi-walled carbon nanotubes photochemistry: A mechanistic view of the effect of impurities and oxygen-containing surface groups

Autores: Damián Rodríguez Sartori, María Laura Dell’Arciprete, Giuliana Magnacca, Paola Calza, Enzo Laurenti, Mónica C. Gonzalez,

Article reference: CARBON

Título: Visible Light Induced Cationic Polymerization of Epoxides by Using Multiwalled Carbon Nanotubes

Autores: Marco Sangermano, Damián Rodriguez, Mónica C. Gonzalez, Enzo Laurenti and Yusuf Yagci.

Article reference: Macromolecular rapid communications

Publicaciones realizadas en colaboración aceptadas durante el período comprendido en la presente tesis

Título: PEG-Coated Blue-Emitting Silicon Dots with Improved Properties for uses in Aqueous and Biological Environments.

Autores: Rodriguez Sartori, Damián; Lillo, Cristian; Romero, Juan José; Dell’Arciprete, María Laura; Miñán, Alejandro; Fernández Lorenzo de Mele, Mónica; González Mónica.

Article reference: NANO-111364.R1

Título: Towards biomedical application of amino-functionalized silicon nanoparticles.

Autores: Lillo CR; Calienni MN; Gorjod RM; Rivas Aiello MB; Rodriguez Sartori D; Prieto MJ; Alonso SV; Kotler ML; Gonzalez MC; Montanari J

Article reference: NANOMEDICINE

Artículos enviados durante el período comprendido en la presente tesis

Título: A study on non-purified commercial Multiwalled Carbon Nanotubes supported on electrospun PAN@PPY nanofibers for water decontamination

Autores: Capilli Gabriele, Damián Rodríguez Sartori, Mónica C. González, Enzo Laurenti, Minero Claudio, Paola Calza.

Artículos enviados en colaboración durante el período comprendido en la presente tesis

Título: Tuning the nitrogen content of Carbon dots from N-rich up to oxidized Carbon Nitride nanoflakes.

Autores: Darío D. Ferreyra, Damián Rodríguez Sartori, Sergio D. Ezquerro Riega, Hernán B. Rodríguez, Mónica C. González.

Título: BSA-capped gold nanoclusters as potential theragnostic for skin diseases: photoactivation, skin penetration, in vitro, and in vivo toxicity.

Autores: Cristian R. Lillo, M. Natalia Calienni, Belén Rivas Aiello, M. Jimena Prieto, Damián Rodríguez Sartori, Jimena Tuninetti, Sergio Moya, Mónica C. González, Jorge Montanari y Galo J. A. A. Soler-Illia.

Artículos en redacción

Título: Effect of humic acid on alumina nanoparticles: modification on planktonic and biofilm state in *P. aeruginosa*.

Autores: Damián Rodríguez Sartori, Alejandro Miñán, Mónica C. González y Mónica Fernández Lorenzo.

Título: Physicochemical changes of commercial carbon nanotubes after solar irradiation. Impact on microbiologically active environments.

Autores: Damián Rodríguez Sartori, Marcos Bertuola, Alejandro Miñán, Antonio Arquez, Mónica C. González, Mónica Fernández Lorenzo.

Presentaciones a congresos

Nombre del evento: “XVII encuentro de superficies y materiales nanoestructurados”

Carácter participación: presentación del póster “Quantum dots de Silicio con capacidades fotocatalíticas para aplicaciones en sistemas biológicos”
Eduardo Gonik, Damián Rodríguez Sartori, Alejandro Miñán, Mónica Fernández Lorenzo y Mónica C. González.

Fecha y lugar: 30 de mayo al 1 de junio 2018, La Plata, Buenos Aires.

Nombre del evento: “XVII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurado (Nano2017-Bariloche)”.

Carácter participación: presentación del póster “Inmovilización de nanopartículas de silicio conjugadas con polietilenglicol en films generados mediante un método de tipo sol gel”

Autores: Damián Rodríguez Sartori, Eduardo Gonik, Alejandro Miñán Mónica Fernández Lorenzo y Mónica González.

Fecha: 22 al 24 de mayo de 2017, San Carlos de Bariloche, Rio Negro.

Nombre del evento: “III Reunión de fotobiólogos Moleculares Argentinos”.
Carácter participación: presentación del póster “Desarrollo de nanoclusters de Au conjugados con BSA para su aplicación como marcadores fluorescentes y potenciales agentes fotosensibilizadores.” Autores: Cristian Lillo, Damián Rodríguez Sartori, Galo Soller Ilia, Mónica Fernández Lorenzo y Mónica González.
Fecha y lugar: 29 al 31 de agosto de 2016, Ciudad de Tucumán, Tucumán.

Nombre del evento: “XVI Encuentro: Conferencia NANO2016”
Carácter participación: presentación del póster “Interacción de nanotubos multicapa comerciales con la luz” Autores: Damián Rodríguez Sartori, María Laura Dell’ Arciprete, Mónica Fernández Lorenzo y Mónica González.
Fecha y lugar: 11 al 13 de mayo de 2016, Capital Federal, Buenos Aires.

Nombre del evento: XVI Encuentro: Conferencia NANO2016
Carácter participación: presentación del poster “Efecto catalítico de nanotubos de carbono comerciales en degradación de naranja II por peroxidisulfato” Autores: María Laura Dell’ Arciprete, Marina Granada, Damián Rodríguez Sartori, Mónica Fernández Lorenzo y Mónica González.
Fecha y lugar: 11 al 13 de mayo de 2016, Buenos Aires, Capital Federal

Nombre del evento: XV Encuentro: Superficies y Materiales Nanoestructurados NANO2015
Carácter participación: presentación del póster “Evaluación de la actividad biofilm de nanopartículas de silicio funcionalizadas con polietilenglicol y soportadas en placa de vidrio” Autores: Damián Rodríguez Sartori, Cristian Lillo, Mónica Fernández Lorenzo y Mónica González.
Fecha y lugar: 13 al 15 de mayo de 2015, Rosario, Santa Fe.

Nombre del evento: XV Encuentro: Superficies y Materiales Nanoestructurados NANO2015
Carácter participación: presentación del póster “Efecto de la estrategia de PEGilación de nanopartículas de silicio sobre la generación de especies reactivas del oxígeno”
Autores: Lillo, Cristian; Rodríguez Sartori, Damián, Kotler, Mónica; González, Mónica C.
Fecha y lugar: 13 al 15 de mayo de 2015, Rosario, Santa Fe.

Estadías en el exterior

Lugar: Politécnico di Torino, Departamento de ciencia y tecnología (Torino, Italia) y Universidad de Torino, departamento de Química (Torino, Italia).

Motivo del viaje: estudio e investigación en el marco del proyecto MSCA-RISE-2014: Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE) Mat4TReat, Grant Agreement no: 645551.

Fecha: 26/9 a 26/12 de 2016.

Lugar: Universidad Politecnica de Valencia (Alcoy, España)

Motivo del viaje: estudio e investigación en el marco del proyecto MSCA-RISE-2014: Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE) Mat4TReat, Grant Agreement no: 645551.

Fecha: 24/9 a 24/10 de 2017.

Lugar: Politécnico di Torino, Departamento de ciencia y tecnología (Torino, Italia) y Universidad de Torino, departamento de Química (Torino, Italia).

Motivo del viaje: estudio e investigación en el marco del proyecto MSCA-RISE-2014: Marie Skłodowska-Curie Research and Innovation Staff Exchange (RISE) Mat4TReat, Grant Agreement no: 645551.

Fecha: 24/10 a 24/12 de 2017.

*“Él, hoy vive sin apuros,
duerme en una cama de papel,
allí escribe su futuro, y se siente muy seguro,
mire usted”*

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, la Dra. Mónica C. González y la Dra. Mónica A. Fernández, por aceptarme en el grupo de trabajo permitiendo mi desarrollo tanto académico como personal. Las charlas, discusiones y proyectos han sumado muchísimo a mi vida, y es por eso que estaré eternamente agradecido.

A mi familia, el pilar de mi vida. Sobre todo, a mis padres que siempre me bancaron en mil locuras y me dejaron equivocarme sabiendo que eso iba a ayudarme a crecer. A mis hermanas, que siempre serán mi tesoro máspreciado. A mis abuelas, con sus personalidades totalmente distintas y complementarias. Particularmente a mi ejemplo de todo lo que quiero ser cuando sea grande, a mi abuelo Isidro. A mis tíos y primos. Siempre formarán parte de mi vida.

A mis amigos de Roca, estaré siempre agradecido por la infancia y adolescencia que aún disfrutamos cuando voy de viaje para allá. A mis amigos de la facultad, que siempre se reían con las cosas que decía en la cursada, y se enojaban cuando se hacia la hora y yo la estiraba preguntando alguna cosa. A mis amigos de Handball, definitivamente conocerlos y compartir tanto fue un privilegio que pude tener en mi vida. A mis amigos de Italia, Carlitos, Cristian, Andrea y Yafrey, vivir esa experiencia con su acompañamiento fue increíble. A Sara, por el aguante en España y la compañía en Italia.

Al LEAR, gracias por todas las tardes de contención, mate, chistes, charlas y experimentos en conjunto. Más que nada, elegí este grupo para trabajar por la enorme calidad humana y el ambiente hermoso que había en él.

A la tía Vir y todo el equipo que me acompañó los primeros años en la cátedra de Introducción a la Química y Química General, lo que he aprendido con ellos no tiene nombre. A toda la cátedra de Química Inorgánica, en donde continuó mi formación como docente, con un plantel realmente destacable.

A los Dres. Paola Calza, Antonio Árquez y Marco Sangermano, gracias por abrirme las puertas de sus laboratorios, los viajes han implicado un gran crecimiento tanto personal como profesional.

Al CONICET, por el otorgamiento de la beca doctoral y a todo el INIFTA por ser la institución que me recibió para mi formación.