



---

Univerzita Palackého  
v Olomouci

**PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC STŘÍBRA A ZLATA A JEJICH  
VYBRANÉ BIOLOGICKÉ, KATALYTICKÉ A SERS APLIKACE**

**Mgr. Petr Suchomel**

**DIZERTAČNÍ PRÁCE**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA**

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci na téma *Příprava nanočástic stříbra a zlata a jejich vybrané biologické, katalytické a SERS aplikace* vypracoval samostatně, pod vedením doc. RNDr. Libora Kvítka, CSc., za použití literárních zdrojů uvedených v seznamu literatury. Experimentální část dizertační práce je vypracována na základě výsledků publikovaných v časopisech, které jsou dostupné jako přílohy. Nemám žádných námitek k využití této disertační práce v rámci autorského zákona č. 121/2000 Sb.

V Olomouci dne 18.4.2017

.....

Mgr. Petr Suchomel

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Petr Suchomel
Název práce	Příprava nanočástic stříbra a zlata a jejich vybrané biologické, katalytické a SERS aplikace
Typ práce	dizertační
Pracoviště	Katedra fyzikální chemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Rok	2017
Počet stran	90
Počet příloh	6
Jazyk	Český
Klíčová slova	stříbro, zlato, nanočástice, příprava, vrstvy, aplikace, biologická aktivita, katalýza, SERS
Anotace:	<p>Na pracovištích katedry fyzikální chemie a RCPTM Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci je dlouhodobě věnována pozornost mimo jiných nanomateriálů taktéž biologické aktivitě nanočástic stříbra. V poslední době je navíc důležitá část výzkumu zaměřena na aplikace nanočástic stříbra a zlata v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS) a v heterogenní katalýze. Těmto výzkumným směrům je věnována tato dizertační práce, která představuje shrnutí vědeckých výsledků dosažených v oblasti přípravy a aplikací nanočástic stříbra a zlata dosažených během mého Ph.D. studia. Hlavním cílem této práce bylo studovat nové metody přípravy nanočástic stříbra a zlata a zároveň ověřit jejich aplikační potenciál v oblastech biologického účinku, katalytických aplikací nebo jako SERS substráty pro analytické aplikace.</p> <p>Vědeckovýzkumná práce související s tematikou Ph.D. studia byla tedy věnována nanočásticím dvou ušlechtilých kovů – stříbra a zlata. V případě stříbra byla pozornost zaměřena na nepříliš běžný směr přípravy nanočástic stříbra přes jeho nerozpustnou sloučeninu – bromid stříbrný a jeho následnou redukci na nanočástice stříbra. V tomto případě byl studován především vliv různých modifikátorů (polymerů a povrchově aktivních látek) na velikost vznikajících nanočástic bromidu stříbrného a na následnou velikost nanočástic stříbra. U nanočástic bromidu stříbrného a stříbra modifikovaných vybranými polymery byla testována jejich biologická aktivita, kde se jasně projevil různý mechanismus účinku těchto dvou forem stříbra na Gram-negativní a Gram-pozitivní bakterie. U nanočástic stříbra připravených v přítomnosti dalších modifikátorů byl studován jejich aplikační potenciál v heterogenní katalýze, kde se projevila jasná závislost mezi velikostí nanočástic a jejich katalytickými schopnostmi. Následující část výzkumu byla věnována sonochemické přípravě vrstev nanočástic stříbra, vlivu různých reakčních podmínek na vznik vrstev nanočástic a ověření možnosti jejich využití jako substráty pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii (SERS). Při přípravě vrstev byla otestována řada redukčních látek a společně se změnami jejich koncentrací a reakčních podmínek, jako byla změna času a sonikace a použití různých reakčních nádob, byla nalezena taková kombinace, která umožnila významně snížit spotřebu stříbra při zachování vysoké hodnoty zesílení Ramanova signálu. Takto připravené vrstvy nanočástic se vyznačovaly výbornou homogenitou a časovou stálostí, což jsou jedny ze základních podmínek reálného použití. Navíc se nalezená metoda ukázala jako velmi dobře reprodukovatelná a v rámci konkurenčních postupů jako nenáročná na preciznost provedení postupu. Popsaná metoda přípravy byla následně nejen publikována v odborném periodiku, ale též byla v České republice ochráněna udělením užitečného vzoru a patentu a v zahraničí bylo</p>

zahájeno patentové řízení podáním PCT přihlášky. Druhá část výzkumu v rámci přípravy disertační práce byla zaměřena na inovativní metodu přípravy nanočástic zlata, umožňující jednoduché řízení jejich velikosti přidavkem povrchově aktivní látky Tween 80. Využití této povrchově aktivní látky umožňovalo řídit velikost připravených nanočástic v rozsahu 6-26 nm a navíc výrazně zlepšovalo monodisperzitu připravených disperzí oproti reakčnímu systému bez povrchově aktivní látky. Další výhodou použité povrchově aktivní látky na rozdíl od dříve publikovaných studií spočívá v tom, že její přítomnost v reakčním systému nesnižuje katalytickou aktivitu připravených nanočástic, jak prokázala modelová studie redukce 4-nitrofenolu tetrahydridoboritanem sodným. Oproti jiným studiím zaměřeným na tuto modelovou reakci a využívajícím nanočástice zlata se navíc ukazuje, že využití této povrchově aktivní látky zjednodušuje mechanismus průběhu reakce, protože místo obvykle pozorovaného Langmuir-Hinshelwoodova mechanismu heterogenně katalyzované reakce byla v tomto případě pozorována závislost odpovídající mechanismu Eley-Ridealovu.



## BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author	Petr Suchomel
Title	Preparation of Silver and Gold Nanoparticles and Their Selected Biological, Catalytic and SERS Applications
Type	dissertation
Department	Department of Physical Chemistry
Supervisor	doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc.
Published	2017
Pages	90
Annexes	6
Language	Czech
Keywords	silver, gold, nanoparticles, synthesis, layers, application, biologic activity, catalysis, SERS
Annotation:	<p>Department of Physical Chemistry and Regional Centre of Advanced Technologies and Materials at Palacký University Olomouc are among other areas focused on research in the field of preparation and biological activity of silver nanoparticles. However, important part of research is also focused on applications of silver and gold nanoparticles in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) and heterogeneous catalysis in recent years. This dissertation is therefore devoted to these research areas and presents summary of the results achieved during Ph.D. study. The main objectives of this thesis were to study new methods of preparation of silver and gold nanoparticles and evaluate their application potential in the fields of biological activity, catalysis or as SERS substrates for analytical chemistry</p> <p>Research connected to Ph.D. study was mainly dedicated to two noble metals – silver and gold. In the case of silver, the attention was focused on nearly undescribed two step synthesis based on the preparation of silver bromide nanoparticles and their subsequent reduction to silver nanoparticles. The main interest was devoted to the influence of various modifiers (polymers and surfactants) on the size of silver bromide and silver nanoparticles. Silver bromide and silver nanoparticles modified by selected polymers were evaluated for their biological activity, where different action mechanism against Gram-negative and Gram-positive bacteria was observed. Silver nanoparticles prepared in the presence of remaining modifiers were studied for their catalytic activity. Next research was focused on sonochemical preparation of silver layers, influence of different reaction conditions on their formation and validation of their potential use as SERS substrates. There were tested several reducing agents and different reaction conditions, such as changes in sonication time, reaction beaker material, and the best combination, which allowed reduction of silver consumption and preparation of stable silver layers with outstanding characteristics and high Raman signal enhancement, was found. Developed method was moreover well reproducible and really fast compared to commonly used techniques. Described preparation of silver layers was subsequently not only published in impact journal, but moreover it was protected by Czech patent and utility model and it was initiated PCT procedure. The second part of research was dedicated to innovative preparation of gold nanoparticles, which allowed easy size control by addition of various concentration of surfactant Tween 80. It was possible to manage size of prepared gold nanoparticles from 6 up to 26 nm and there was shown, that addition of Tween 80 significantly reduced polydispersity of gold nanoparticles. Tween 80 as modifier did not reduced catalytic activity of prepared gold nanoparticles, which was proved by model</p>

reaction based on reduction of 4-nitrophenol by sodium borohydride. Compared to other published studies focused on described model reaction, use of Tween 80 simplified the mechanism of reaction. Instead of ordinary observed Langmuir-Hinshelwood mechanism of heterogeneous catalysis, there was observed Eley-Rideal mechanism of reaction catalyzed by prepared gold nanoparticles.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Je mi ctí na tomto místě poděkovat celému týmu Katedry fyzikální chemie, Regionálního centra pokročilých materiálů a Ústavu mikrobiologie na Univerzitě Palackého v Olomouci za spolupráci a pomoc během celého studia. Hlavní dík patří především Liboru Kvítkovi, Robertu Pruckovi a Aleši Panáčkovi za inspiraci, komentáře, připomínky a neocenitelnou spolupráci, kterých si nesmírně vážím. Bylo mi velkým potěšením poznat a spolupracovat s celou řadou skvělých lidí z řad kolegů a spolužáků z Ph.D. studia, se kterými jsem sdílel všední i nevšední zážitky a kterých si opravdu srdečně vážím. Děkuji také celému týmu Vědeckotechnického parku Univerzity Palackého v Olomouci za podporu, obzvláště v posledních fázích mého studia.

Především však děkuji své rodině, hlavně ženě Terezce a dceři Julince, za obrovskou podporu, pochopení a toleranci, bez nichž bych nemohl svému studiu věnovat potřebný čas a energii.

## OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Teoretická část .....	11
2.1	Nanočástice stříbra a jeho sloučenin .....	11
2.1.1	Příprava koloidních disperzí stříbra a jeho sloučenin.....	11
2.1.2	Příprava vrstev nanočástic stříbra.....	14
2.1.3	Využití koloidních disperzí stříbra, jeho sloučenin a vrstev nanočástic stříbra ..	19
2.2	Nanočástice zlata .....	22
2.2.1	Příprava nanočástic zlata .....	23
2.2.2	Využití nanočástic zlata.....	26
3	Experimentální část.....	28
3.1	Příprava nanočástic bromidu stříbrného v přítomnosti vybraných polymerů a jejich následná redukce na nanočástice stříbra.....	28
3.1.1	Antibakteriální a antifungální aktivita nanočástic AgBr a Ag .....	38
3.2	Příprava nanočástic stříbra v přítomnosti dalších modifikátorů.....	42
3.2.1	Katalytická aktivita nanočástic Ag .....	44
3.3	Sonochemická příprava vrstev nanočástic stříbra .....	48
3.3.1	Použití nanovrstev Ag jako SERS substrát .....	55
3.4	Příprava zlatých nanočástic .....	58
3.4.1	Katalytická aktivita zlatých nanočástic .....	64
4	Závěr .....	70
5	Summary .....	72
6	Reference .....	74
7	Přílohy.....	90

# 1 ÚVOD

Když v prosinci roku 1959 uvedl Richard Feynman svou přednášku nazvanou „*There's Plenty of Room at the Bottom*“, nevěnoval jí prakticky nikdo z předních vědeckých představitelů té doby pozornost, jakou si zasloužila. Na konci osmdesátých a na začátku devadesátých let dvacátého století však byla tato myšlenka znovuobjevena a lze díky tomu bezesporu říci, že tak Feynman položil základy moderního přístupu k nanotechnologiím. Od té doby prochází obor nanotechnologií dynamickým rozvojem a každým rokem přináší objevy umožňující další pokrok nejen ve vědeckém, ale i v civilním životě.

Souhrnným názvem nanotechnologie se dle *National Nanotechnology Initiative* označují vědy pracující s objekty, u nichž se alespoň jeden rozměr pohybuje v rozmezí 1–100 nm. Nanočástice tedy tvoří podskupinu tzv. koloidních částic, jimiž označujeme objekty s alespoň jedním rozměrem pod 1  $\mu\text{m}$ . Takto malé částice se díky své velikosti, a často i morfologii, vyznačují specifickými vlastnostmi, které nejsou pozorovatelné u stejných materiálů nacházejících se v makroskopické formě. Jedná se především o unikátní magnetické, elektrické, optické, katalytické, biologické a další vlastnosti, díky nimž nacházejí nanomateriály uplatnění nejen v oblasti základního výzkumu, ale v současnosti už i v mnohých průmyslových, environmentálních, medicínských a jiných odvětvích.

Z chemického a materiálového pohledu patří v rámci nanotechnologií jedno z velmi důležitých míst kovovým nanočásticím, především pak nanočásticím ušlechtilých kovů. Unikátní postavení mezi ušlechtilými kovy zauímají bezesporu nanočástice stříbra a zlata, jež jsou relativně snadno připravitelné, stabilní a vykazují vhodné vlastnosti využitelné v heterogenní katalýze, povrchem zesílené Ramanově spektroskopii, senzorech nebo v širokém spektru biologických aplikací. S rozvojem technik a technologií vedoucích k přípravě kovových nanočástic se však poslední dobou pozornost upírá nejen k nanočásticím stříbra a zlata, ale své místo na poli výzkumu i aplikací nacházejí též nanočástice dalších ušlechtilých kovů, jako jsou měď, platina, palladium, či ruthenium.

Na pracovištích Katedry fyzikální chemie a RCPTM Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci je dlouhodobě věnována pozornost přípravě a biologické aktivitě mnohých typů nanočástic včetně nanočástic stříbra a zlata. V poslední době je navíc důležitá část výzkumu věnována aplikacím nanočástic stříbra a zlata v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS) a v heterogenní katalýze. Těmto výzkumným směrům je

věnována i předkládaná dizertační práce. Ta tematicky rozdělena na dvě základní části. První část je věnována nanočásticím na bázi stříbra. Jednu podkapitolu tvoří příprava nanočástic bromidu stříbrného a jeho následná redukce na kovové nanočástice, biologická aktivita částic bromidu stříbrného a stříbra a katalytická aktivita nanočástic stříbra. Druhá podkapitola je věnována sonochemické přípravě vrstev nanočástic stříbra a jejich aplikaci jako SERS substráty. Druhá část předkládané práce je věnována přípravě nanočástic zlata, řízení jejich velikosti a aplikačnímu potenciálu zlatých nanočástic v heterogenní katalýze.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Nanočástice stříbra a jeho sloučenin

Stříbrné nanočástice a nanočástice stříbrných sloučenin, jako jsou  $\text{Ag}_2\text{O}$ ,  $\text{AgOH}$ , nebo  $\text{AgX}$  (kde  $\text{X}=\text{Cl}$ ,  $\text{Br}$ , nebo  $\text{I}$ ) představují z hlediska nanočásticové chemie velmi obsáhlou a důležitou kapitolu<sup>1</sup>. Nanočástice těchto materiálů jsou populární nejen díky relativně snadné přípravě a ve srovnání s jinými vzácnými kovy nízké ceně, ale především díky jejich vysokému aplikačnímu potenciálu v chemickém a materiálovém průmyslu a v neposlední řadě také díky svým unikátním biologickým vlastnostem<sup>2</sup>. Nejčastěji jsou nanočástice stříbra a jeho sloučenin připravovány ve formě kapalných disperzí. Ty však představují pouze jednu z možností uchování a následného využití nanočástic. Ve značném množství případů je totiž reálná použitelnost nanočástic v koloidních disperzích výrazně omezena jejich přirozenými vlastnostmi, souvisejícími s jejich termodynamickou nestabilitou. Procesy vedoucí ke snížení povrchové energie rozptýlených částic (zejména agregace) vedou k degradaci koloidní disperze a k zániku nanoskopické fáze, která propůjčuje materiálu své unikátní vlastnosti. Z toho důvodu je třeba nanočástice vhodně stabilizovat s ohledem na požadavky příslušné aplikace. Nejrozšířenější a zároveň velmi výhodný způsob stabilizace nanočástic je jejich ukotvení na pevný makroskopický substrát, jako jsou např. sklo, kov, guma, bavlna apod., a to buď ve formě jednotlivých nanočástic nebo jako tenké vrstvy, které jsou právě z nanočástic poskládány<sup>3-9</sup>. Obecně se za tenké vrstvy považují vrstvy o tloušťce 1–100 nm<sup>10</sup>. Takové materiály mají z komplexního měřítka vlastnosti makroskopických pevných objektů, takže je možné s nimi snadno manipulovat bez nutnosti použití speciálních nástrojů a přístrojů. Vykazují však navíc díky své nanomateriálové podstatě i unikátní vlastnosti spojené s nanorozměrem jednotlivých částic.

#### 2.1.1 Příprava koloidních disperzí stříbra a jeho sloučenin

Metody přípravy nanočástic lze obecně rozdělit do dvou kategorií. Jedná se o top-down (dispergační) a bottom-up (kondenzační) metody. V případě top-down metod jsou makroskopické částice rozptylovány v menší částice. Z praktického hlediska mají v případě přípravy nanočástic stříbra alespoň minimální význam pouze rozprašování v elektrickém oblouku a laserová ablace.

Oproti tomu bottom-up metody, tedy metody, při nichž vzniká z roztoku nová fáze, při přípravě nanočástic stříbra zcela jasně dominují, a to především díky širokým možnostem ovlivnění zásadních charakteristik výsledných koloidních disperzí stříbra, jako jsou velikost částic, jejich morfologie, polydisperzita, nebo stabilita. To se děje nejčastěji změnou některého z vnějších parametrů, jakými jsou koncentrace a poměr reakčních složek, pH, teplota nebo iontová síla roztoku. Další možností, která je současně i hojně využívaná, je volba vhodného redukčního činidla, ať už z pohledu jeho redox potenciálu, nebo z pohledu jeho účinku v různých reakčních podmínkách (např. v určitém rozmezí pH). V neposlední řadě je pak možné využít vlivu polymerních, či povrchově aktivních látek, jejichž přítomnost dokáže výrazně ovlivnit právě velikost, morfologii, polydisperzitu a stabilitu vznikajících koloidních disperzí.

Dnes již klasickou metodou přípravy nanočástic stříbra je postup navržený Creightonem, Blatchfordem a Albrechtem<sup>11</sup>. Jejich řešení je založeno na přidavku vodného roztoku  $\text{AgNO}_3$  do intenzivně míchaného ledově vychlazeného roztoku  $\text{NaBH}_4$ . Popsaným postupem lze připravit disperze stříbra obsahující částice o velikosti 5–20 nm, které vydrží stabilní po dobu několika měsíců. Od doby publikování byl daný postup mnohokrát modifikován a upravován s cílem lépe řídit velikost vznikajících částic. V drtivé většině případů je modifikace založena na změně poměru  $\text{AgNO}_3$  a  $\text{NaBH}_4$ , změně teploty reakční směsi, nebo přidavku vhodného modifikátoru<sup>12–17</sup>. Kromě  $\text{NaBH}_4$  lze přirozeně použít i jiné anorganické redukční látky. Obvykle jsou pro přípravu nanočástic stříbra používány např. hydrazin či hydroxylamin<sup>18–22</sup>.

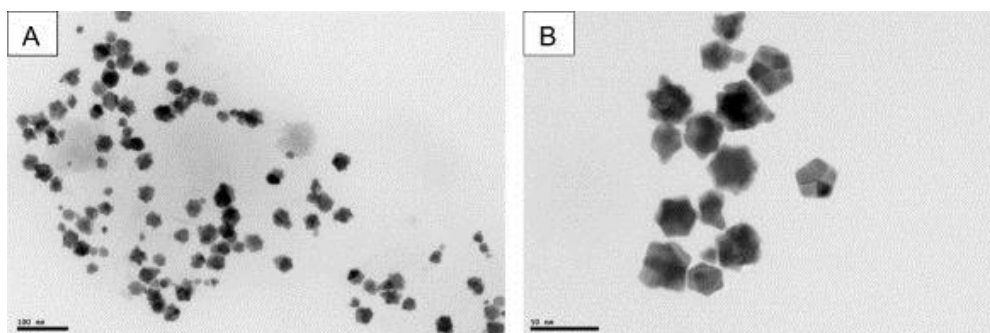
Mimo anorganické redukční látky lze pro účely přípravy nanočástic stříbra použít i organická redukční činidla. Často používaná je dnes již také klasická metoda podle Lee a Meisela<sup>23</sup>, kde je využíváno redukčních účinků citrátu sodného. Konkrétně je přidáván roztok citrátu sodného do vroucího roztoku dusičnanu stříbrného. Reakční směs je následně ještě hodinu po přidavku udržována ve varu. Výsledná disperze pak obsahuje nanočástice stříbra o průměrné velikosti 60–80 nm. Disperze nanočástic stříbra lze též připravit redukcí dusičnanu stříbrného kyselinou askorbovou, formaldehydem nebo jednoduchými cukry<sup>24–29</sup>.

Kromě základních bottom-up přístupů, kdy je na kovové nanočástice přímo redukována stříbrná sůl, je možné, a ve spoustě případů i žádoucí, využít dvoukrokových syntéz, ve kterých je v prvním kroku připravena vhodná stříbrná sloučenina, která je až

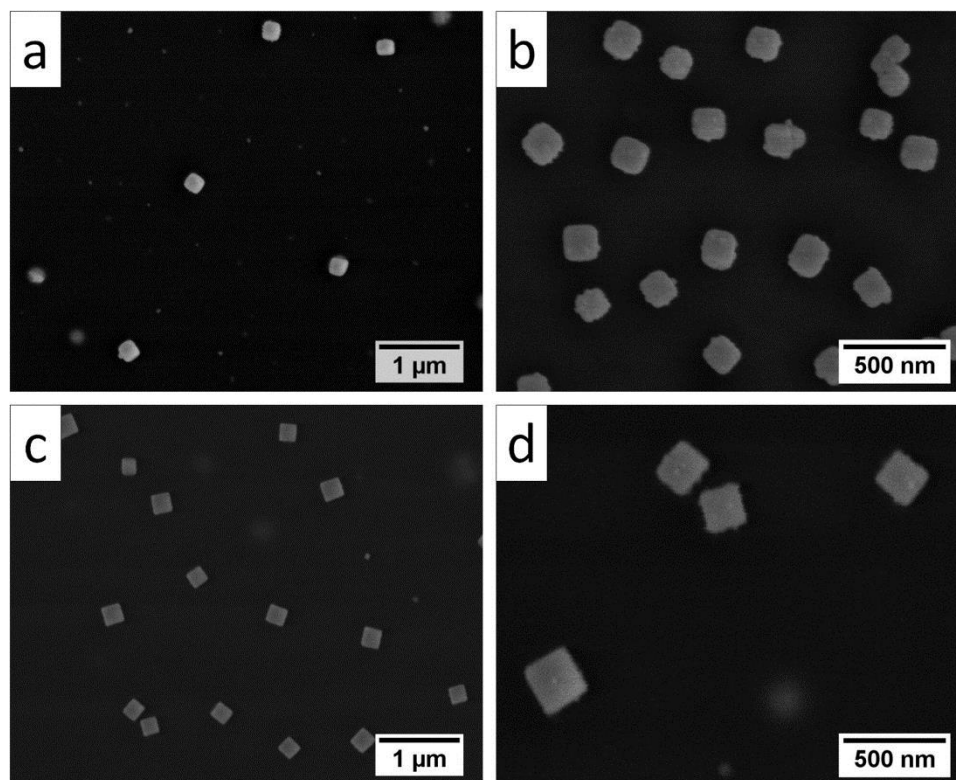


v následujícím kroku redukována na stříbrné nanočástice s požadovanými vlastnostmi. Potenciální meziprodukt, který je následně redukovan, může být jak rozpustný, tak i nerozpustný v rozpouštědle, ve kterém je disperze připravována (tzv. disperzní prostředí). Příkladem rozpustné sloučeniny, kterou je vhodné jako meziprodukt využít, je diammin stříbrný komplex –  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$ , který je následně možné redukovat i poměrně slabými redukčními činidly, jako jsou např. redukující sacharidy. Lze tak dobře řídit velikost vznikajících nanočástic, případně jejich morfologii<sup>30–32</sup> (obrázek 1).

Dalším vhodným meziproduktem pro přípravu nanočástic stříbra může být např. siřičitanový komplex –  $[\text{Ag}(\text{SO}_3)_2]^{3-}$ , který je následně možno redukovat širokou paletou redukčních činidel<sup>33</sup>. Jinou možností je připravit jako meziprodukt v disperzním prostředí nerozpustnou sloučeninu stříbra. K tvorbě nové fáze tím nedochází až po přidání redukčního činidla, ale přidavkem srážecího (precipitačního) činidla již v prvním kroku. Použitelnými sloučeninami vznikajícími po přidavku precipitačního činidla jsou například  $\text{Ag}_2\text{O}$ <sup>34,35</sup>,  $\text{Ag}_2\text{S}$ <sup>36–38</sup>,  $\text{AgOH}$ <sup>39</sup> a především  $\text{AgX}$ , kde X reprezentuje chlor, brom, nebo jod<sup>40–44</sup>. Halogenidy, jako nejpočetnější zástupce nerozpustných sloučenin stříbra, je možno připravovat ve formě nejrůznějších tvarů a velikostí, což může být velmi výhodné pro následnou přípravu kovových nanočástic stříbra. V případě chloridu stříbrného tak byla ukázána možnost připravit krychlové částice s hranami v rozmezí velikostí 120–150 nm<sup>45</sup> (obrázek 2), nebo nanodráty poskládané z částic o velikosti desítek nanometrů<sup>46</sup>. Nanočástice bromidu stříbrného mohou být připraveny ve formě kuliček o průměru jednotek nanometrů<sup>47</sup>, kulovitých částic o velikostech 70–140 nm<sup>48</sup>, porézních částic s průměrnou velikostí 150–200 nm a póry o velikosti 5–10 nm<sup>49</sup>, nebo např. bipyramid či polyedrů<sup>50</sup>. Jodid stříbrný lze pak připravit např. ve formě destiček<sup>51</sup>, nebo kulovitých



**Obrázek 1:** Nekulové nanočástice stříbra připravené redukcí diamminstříbrného komplexu<sup>32</sup>.



**Obrázek 2:** SEM snímky krychlových nanočástic chloridu stříbrného<sup>45</sup>.

nanočástic s rozměry od desítek do stovek nanometrů<sup>52,53</sup>. Oproti ostatním nerozpustným sloučeninám stříbra se navíc halogenidy vyznačují tím, že je možno je kromě klasických chemických metod redukovat i prostřednictvím UV záření, což může být v určitých situacích velmi výhodné<sup>54–56</sup>.

### 2.1.2 Příprava vrstev nanočástic stříbra

Techniky vedoucí k tvorbě stříbrných vrstev a vrstev obecně lze formálně rozdělit do dvou základních skupin, a to na techniky fyzikální a techniky chemické. Přirozeně je pak v praxi možné (a často velmi výhodné) setkat se i s kombinací jednotlivých postupů, tedy obecně s metodami fyzikálně-chemickými.

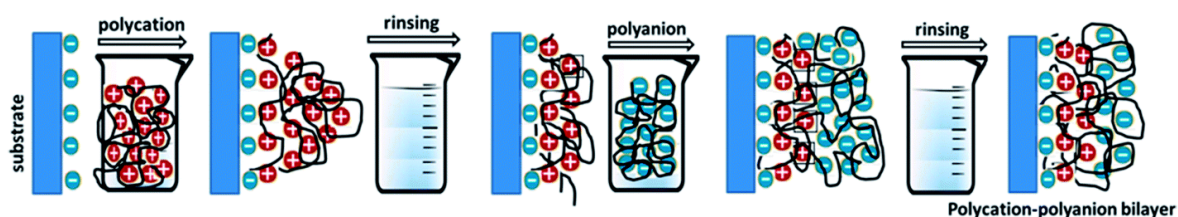
Jako reprezentanty fyzikálních metod jsou nejčastěji uváděny vakuové napařování a napařování. Vakuové napařování je založeno na převedení napařovaného materiálu do plynného stavu a jeho transportu vakuem k povrchu substrátu, na který má být deponován. Povrch substrátu je přitom mnohem chladnější, vlivem čehož dochází ke kondenzaci par a formování tenké vrstvy<sup>10,57,58</sup>. Principem napařování je umístění napařovaného

materiálu mezi dvě elektrody (na katodu), na kterých je vloženo vysoké napětí (řádově několik kV). To zapříčiňuje pohyb iontů pracovního plynu, který značnou rychlostí dopadá na katodu, a tedy i na naprašovaný materiál, z něhož vyráží částice, které následně dopadající na povrch substrátu, na němž tvoří tenkou vrstvu. Naprašování probíhá oproti naprašování v inertní atmosféře, kterou tvoří nejčastěji argon<sup>10,59,60</sup>.

Mezi nejčastěji používané chemické techniky patří bezesporu chemická depozice z plynné fáze<sup>10</sup>. Ta je, jak značí název, založena na principu reagujících plynných složek. Substrát, na němž má být tenká vrstva vytvořena, je za vysoké teploty vystaven účinkům jednoho nebo více prekurzorů (nacházejících se v plynném stavu), které na povrchu substrátu reagují a tím tvoří požadovanou vrstvu. Jako takové prekurzory mohou sloužit například stříbrné komplexní sloučeniny, halogenidy či organické soli<sup>61–66</sup>.

Mezi fyzikálně-chemické metody patří litografické metody, layer-by-layer techniky, nebo metoda Langmuir-Blodgettové. U litografických metod dochází k depozici nanočástic na tzv. litografickou masku. Jedná se o podklad s dobrou afinitou ke stříbru (resp. k deponovanému materiálu obecně), který zároveň ochotně sám o sobě (self-assembly) tvoří tenké vrstvy. Další podmínkou je, že lze tento materiál následně snadno odstranit bez toho, aby byla poškozena nově vzniklá kovová nanovrstva. Všechny výše zmíněné podmínky splňují polystyrenové částice, které snadno tvoří filmy, lze na ně dobře nanášet kovové nanočástice (většinou stříbro či zlato) a po vytvoření požadované nanovrstvy je lze snadno rozpustit vhodným organickým rozpouštědlem<sup>67–71</sup>.

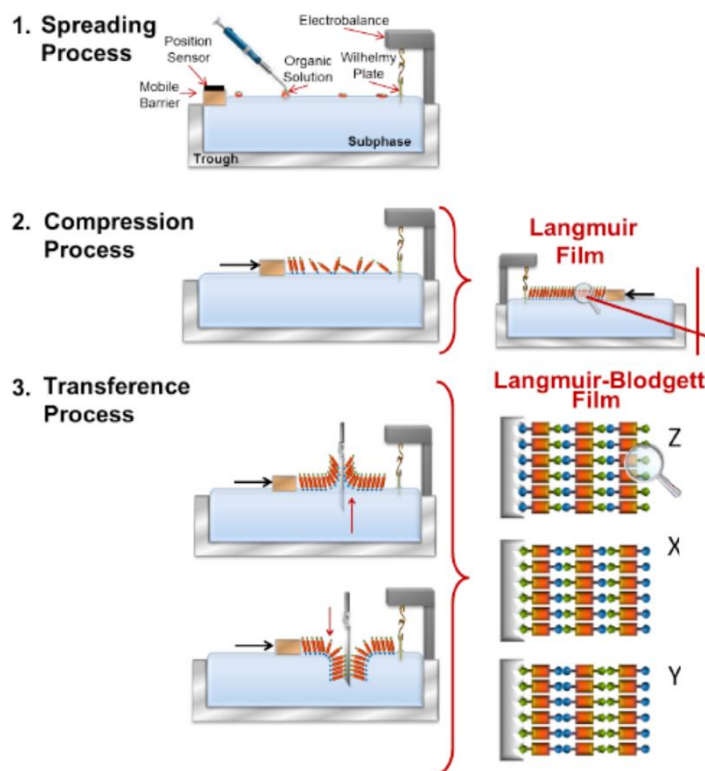
Layer-by-Layer metody tvoří asi nejčastěji užívanou techniku přípravy vrstev nanočástic stříbra. Spočívají, jak název napovídá, v nanášení jednotlivých vrstev, které se navzájem přitahují. Podstatou tohoto přitahování jsou slabé ne vazebné interakce. Substrát (např. sklíčko) je střídavě namáčen do jednotlivých roztoků nebo disperzí, čímž dochází k jejich postupnému vrstvení (obrázek 3). V případě nanočástic stříbra, které tvoří jednu



**Obrázek 3:** Schéma přípravy vrstev technikou Layer-by-Layer<sup>78</sup>.

z vrstev, jsou do kontaktní vrstvy často používány kationické polyelektrolyty jako je poly(diallyldimethylammonium) chlorid (PDDA)<sup>72,73</sup> nebo polyetylenimin (PEI)<sup>74</sup>. Layer-by-Layer techniky se však vyznačují velmi vysokými nároky na perfektní očištění, ošetření a aktivaci povrchu substrátu (skla), jež je nutno provádět silně korozivními roztoky jako jsou směs peroxidu vodíku s hydroxidem amonným či peroxidu vodíku s kyselinou sírovou (piraňa roztok). Teprve po důkladném očištění je možno přistoupit ke kroku namáčení do jednotlivých roztoků, resp. disperzí, které však musí být již připraveny předem. To, v kombinaci s faktem, že namáčení v jednotlivých roztocích či disperzích trvá od několika minut až po několik hodin, značí, že se jedná o časově poměrně náročné techniky. Kromě slabých elektrostatických interakcí mohou být při Layer-by-Layer depozici uplatněny i silnější, kovalentní, interakce. K těm dochází např. v případě použití 3-aminopropyltriethoxysilanu (APTES) jako mezivrstvy<sup>75-77</sup>. Před samotným ponořením sklíčka do APTES je nutno jej opět důkladně očistit a aktivovat pomocí piraňa roztoku, čímž se na povrchu vytvoří -OH skupiny. Přes ně je následně APTES kovalentně navázán na povrch substrátu. Na povrchu vrstvy APTES se pak díky afinitě stříbra k dusíku pomocí aminoskupin vážou přes volný elektronový pár předem připravené nanočástice kovového stříbra. Stejně jako v případě použití elektrolytů se také jedná o časově poměrně náročnou metodu.

Metoda Langmuir-Blodgettové je založena na tvorbě jedné či více monovrstev nanášených z kapalně vrstvy (filmu na povrchu kapaliny) na pevný substrát, který je z této vrstvy vytahován nebo do ní ponořován (obrázek 4). S každým následujícím vytažením nebo ponořením je na pevném substrátu vytvořena jedna další monovrstva. Film, ze kterého jsou monovrstvy nanášeny, je vytvářen na tzv. Langmuirových vahách, což je zařízení umožňující plánované zmenšení povrchu, čímž dochází k tvorbě Langmuirova filmu. Tedy monovrstvě stejně orientovaných amfifilních molekul, kdy je jejich polární část (funkční skupina) ponořena pod hladinu, zatímco její nepolární konec (uhlovodíkový řetěz) je orientován nad hladinu<sup>79,80</sup>. V případě tvorby vrstev kovových nanočástic je třeba nanočástice vhodným způsobem upravit. To lze provést hydrofobizací (obalením) nanočástic pomocí povrchově aktivních látek (PAL) a jejich následným nanesením na kapalnou fázi<sup>81</sup>. Jinou možností je použití kapalně fáze jako samotný zdroj nanočástic.

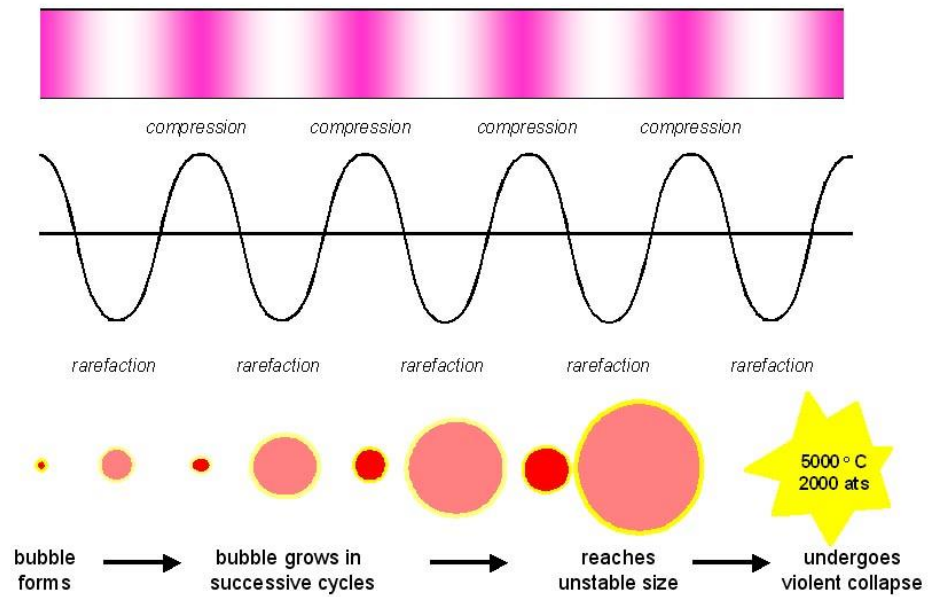


**Obrázek 4:** Schéma přípravy tenkých vrstev metodou Langmuir-Blodgettové<sup>83</sup>.

V tomto případě je nutno pečlivě zvolit takovou PAL, která svými funkčními skupinami upoutá nanočástice do plovoucí vrstvy, a tím umožní jejich nanášení na pevný substrát<sup>82</sup>.

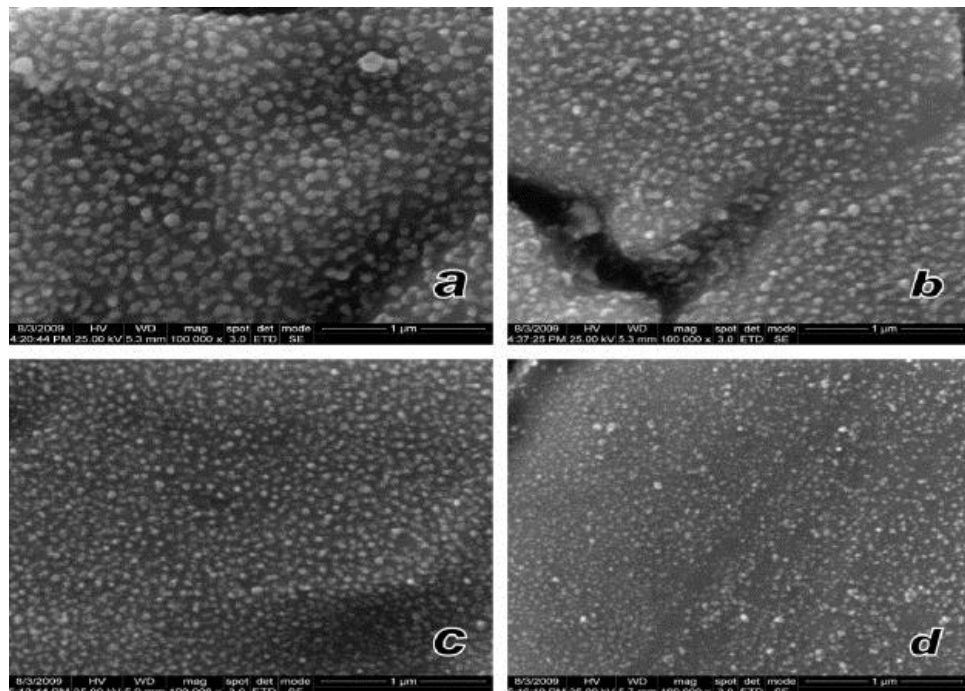
V neposlední řadě je možno připravovat vrstvy nanočástic stříbra s využitím sonochemie, tedy kombinace fyzikálního a chemického přístupu. Sonochemické metody ve značné míře eliminují nevýhody popsané výše. Lze jimi připravovat vrstvy poskládané z relativně malých nanočástic. Tyto metody jsou poměrně jednoduché, rychlé a často jsou i, v porovnání s výše popsanými technikami, ekonomicky a ekologicky příznivější. Výhody sonochemie vyplývají z jejího principu, kdy je reaktivita reakční směsi zvyšována tzv. akustickou kavitací<sup>84</sup>. Použitím výkonného ultrazvuku vznikají v kapalině kavity, jejichž kolaps spojený s implozí produkuje enormní množství energie (obrázek 5). Ta, v kombinaci s velmi vysokými lokálními teplotami a tlaky, vede k přibližování samotných molekul a ke vzniku nanočástic<sup>86</sup>. V případě, že kavity kolabují v blízkosti pevného povrchu (například skla), dochází k produkci mikroproudů a rázových vln<sup>87</sup>. Ty vlivem

## ACOUSTIC CAVITATION



**Obrázek 5:** Vznik a kolaps kavit v průběhu sonikace<sup>85</sup>.

nesymetrického proudění vystřelují ve vysokých rychlostech nově vznikající nanočástice na povrch pevného substrátu, kde dochází k jejich zachytávání<sup>88</sup>. Navíc bylo zjištěno,



**Obrázek 6:** Sonochemicky deponované nanočástice stříbra na ocelovém povrchu pořízené technikou skenovací elektronové mikroskopie<sup>86</sup>.

že v heterogenních systémech nebo v přítomnosti pevného povrchu několikasetnásobně vzrůstá rychlost nukleace, díky čemuž je využití sonochemie v porovnání s nesonikačními metodami podstatně efektivnější<sup>89</sup>. Využitím sonikace, jako hlavní síly k přípravě nanočástic a jejich depozice na pevné substráty, se dlouhodobě zabývá např. skupina prof. Gedankena. Ta ukázala, že lze sonochemicky v závislosti na postupu přípravy, přítomnosti či absenci stabilizátorů apod. připravovat vrstvy na skleněném podkladu poskládané ze stříbrných nanočástic o velikosti od 50 nm až po cca 500 nm<sup>90</sup>. Nanočástice stříbra lze sonochemicky deponovat nejen na sklo, ale i na další materiály, jako jsou například ocel (obrázek 6), polymethylmetakrylát, apod.<sup>86,91</sup>.

### 2.1.3 Využití koloidních disperzí stříbra, jeho sloučenin a vrstev nanočástic stříbra

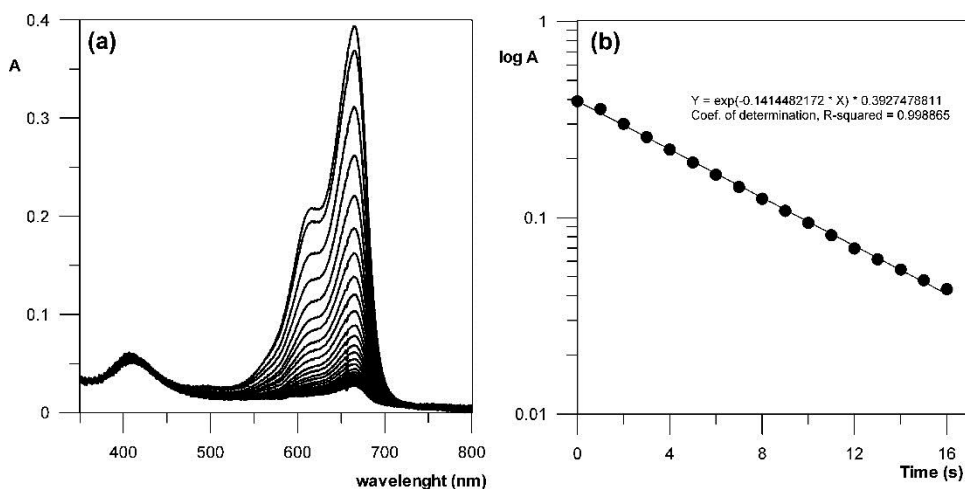
Koloidní disperze stříbra a disperze nerozpustných stříbrných sloučenin se vyznačují bohatým portfoliem vlastností umožňujících multioborové využití těchto materiálů. Mezi takové unikátní vlastnosti patří především elektrické a optické vlastnosti, katalytická aktivita a v neposlední řadě také aktivita biologická.

Unikátní elektrické a optické vlastnosti se projevují výrazným absorpčním maximem vznikajícím při interakci nanočástic stříbra s elektromagnetickým zářením. Tento jev se nazývá povrchová plasmonová resonance (Surface Plasmon Resonance – SPR). Poloha a tvar absorpčního pásu výrazně závisí na velikosti a morfologii částic a jejich vzájemných interakcích<sup>92</sup>. Mimo to je SPR též projevem dielektrických vlastností příslušného kovu a okolí částice<sup>93</sup>. Díky popsaným závislostem lze sestavit velmi citlivé nanosenzory, které i na nepatrnou změnu okolí reagují posunem nebo změnou tvaru absorpčního maxima. Kromě volných nanočástic stříbra je možné a současně i vhodné využít nanočástice ukotvené na pevných substrátech, ať už ve formě samostatně se vyskytujících nanočástic, tak vrstev<sup>94–96</sup>. Jako příklad užití nanoAg pro účely SPR lze uvést v literatuře dobře popsaný příklad použití trojbokých částic stříbra k detekci systému biotin-streptavidin. V tomto případě reaguje detekční systém s nanočásticemi stříbra modifikovanými biotinem na přítomnost streptavidinu červeným posunem o 27 nm<sup>97</sup>. Rovněž byly popsány nanosenzory založené na SPR pro detekci např. antibiotinu<sup>98</sup>, peroxidu vodíku<sup>99,100</sup> nebo glukózy<sup>101,102</sup>.

Nanočástice stříbra, a ušlechtilých kovů obecně, se díky velkému povrchu a vysoké povrchové energii výborně hodí k použití v oblasti heterogenní katalýzy. Mezi hlavní

faktory ovlivňující katalytickou aktivitu patří rozměr nanočástic a jejich stabilita, struktura povrchu apod. Obecně se se zmenšující velikostí částic výrazně zvětšuje jejich povrch, a tedy aktivní plocha katalyzátoru, což přímo souvisí s nárůstem katalytické aktivity. Nanočástice stříbra zaujímají díky své relativně nízké ceně významné místo v oblasti heterogenní katalýzy. Navíc se jejich použití ukázalo jako možné nejen při katalytické redukci, ale též v určitých případech při katalyzované oxidaci. Využití nanočástic stříbra jako redukčního katalyzátoru je většinou studováno na několika modelových reakcích. Patří mezi ně redukce rhodaminu 6G<sup>103,104</sup> nebo redukce metylenové modři (obrázek 7)<sup>105</sup>.

Nejčastěji využívanou modelovou reakcí je však katalytická redukce 4-nitrofenolu tetrahydridboritanem sodným<sup>106,107</sup>. V alkalickém prostředí (pH přibližně 10) nabývá 4-nitrofenol sytě žlutého zabarvení, které se projevuje výrazným absorpčním píkem při vlnové délce 400 nm. 4-nitrofenol je redukován za vzniku jediného produktu – 4-aminofenolu, který typicky absorbuje při 300 nm. Monitoring reakce je tak velmi jednoduše umožněn technikou UV-Vis spektroskopie<sup>108</sup>. Navíc je od roku 1976 dle Agentury na ochranu životního prostředí (EPA, USA) 4-nitrofenol zařazen na seznam prioritních znečišťujících látek<sup>109</sup>. Je tedy výhodné studovat katalytickou aktivitu právě na tomto polutantu. Jak bylo zmíněno, nanočástice stříbra se kromě heterogenní redukce též hodí pro účely katalytické oxidace, jejímž typickým příkladem je oxidace etylenu na etylenoxid<sup>110</sup>. V případě nerozpustných sloučenin stříbra jsou pro katalýzu obecně nejvíce využívány nanočástice halogenidů stříbra, které mají výborné fotokatalytické vlastnosti. Nanočástice halogenidů stříbra lze tak použít např. pro fotokatalytickou konverzi oxidu



**Obrázek 7:** Průběh redukce metylenové modři tetrahydridboritanem sodným, katalyzované nanočásticemi stříbra, zaznamenaný technikou UV-Vis spektrometrie<sup>105</sup>.



dusnatého<sup>111</sup>, fotodegradaci různých barviv a dalších nebezpečných polutantů<sup>112–114</sup> nebo pro fotokatalytický vývoj vodíku<sup>115,116</sup>.

Další vhodnou vlastností kovových nanočástic, především stříbrných a zlatých, je povrchové zesílení Ramanova signálu při adsorpci molekuly na koloidní částici, případně na zdrsňeném povrchu kovu. Popsaný jev se nazývá povrchem zesílený Ramanův rozptyl (SERS) a je hojně využíván v analytické chemii k detekci velmi malých koncentrací látek. Samotné zesílení je dáno dvěma základními příspěvky. Elektromagnetický příspěvek, který je dominantní, je založen na existenci povrchového plasmonu, díky němuž dochází ke značnému zesílení elektromagnetického pole v blízkosti kovové nanočástice. Takový mechanismus není závislý na chemické podstatě okolí a předpovídá tak stejné zesílení signálu pro všechny molekuly<sup>92,117</sup>. Druhý příspěvek je spojen s chemisorpcí molekuly na kovový povrch a pochází z interakce detekované molekuly s emitovanými elektrony vytvořenými excitací povrchových elektronů kovu<sup>118,119</sup>. Má-li navíc excitační zdroj vhodnou vlnovou délku, může docházet k rezonanci poskytující dodatečné zesílení. Pak se jedná o tzv. povrchem zesílený rezonanční Ramanův rozptyl (SERRS). Detekční limity, které techniky SERS a SERRS umožňují, se pohybují v oblastech piko až femtomolárních koncentrací<sup>120</sup>. Díky tomu již bylo ukázáno, že je možno detekovat i jednotlivé molekuly adsorbované na jednotlivých částicích stříbra (tzv. single molecule spectroscopy)<sup>118,121,122</sup>. Studie z posledních let naznačují, že nejvyššího faktoru zesílení (až  $10^{15}$ ) dosahuje jen velmi omezená část částic nabývajících správných tvarů a velikostí, tzv. „hot particles“<sup>121</sup>. Optimální velikost částic stříbra závisí na vlnové délce používaného laseru a pohybuje se v rozmezí od 70 do 200 nm pro vlnové délky od 488 nm do 647 nm<sup>123</sup>. Dle závislosti velikosti „hot particles“ na vlnové délce je tudíž předpokládáno, že pro běžně používané lasery s vlnovou délkou 785 nm a 1064 nm by mělo být maximálního zesílení dosahováno na částicích s velikostí okolo 400 nm<sup>124–126</sup>. Takto velké částice jsou však značně nestálé a v krátkém časovém intervalu podléhají agregaci a sedimentaci. Danému nepříznivému chování je možno poměrně snadno předejít nahrazením koloidních disperzí tenkými vrstvami zformovanými právě z částic s větší průměrnou velikostí<sup>127</sup>. V tomto případě jsou částice stříbra zachytávány na vhodný pevný substrát, kterým může být například běžné či křemenné sklo<sup>128,129</sup>. Schopnosti nanočástic stříbra zesílit Ramanův signál je tak možno využít např. pro detekci extrémně nízkých koncentrací pesticidů<sup>130–133</sup>, pro odhalování reziduí výbušnin<sup>134–136</sup>, drog<sup>137</sup>, či jako účinné biosensory<sup>138–140</sup>.

Jednou z bezesporu nejdiskutovanějších vlastností nanočástic stříbra a jeho sloučenin, a tím i jedním z nejstudovanějších odvětví aplikačního potenciálu stříbra, je jejich dobře známá biologická aktivita<sup>141,142</sup>. V současné době je aktuálním problémem zvyšující se počet bakteriálních kmenů rezistentních vůči běžně dostupným antibiotikům. Ačkoliv již byla pozorována schopnost bakterií vypěstovat si rezistenci vůči iontovému stříbru, která pochází především ze schopnosti jej aktivně vylučovat pomocí specifických mechanismů<sup>143,144</sup>, v případě nanočástic kovového stříbra zatím podobná rezistence pozorována nebyla. Proto se nanomateriály na bázi stříbra jeví jako jedna z možných variant jak antibiotika nahradit, případně, prostřednictvím synergického efektu posílit jejich účinnost<sup>145–147</sup>. Mechanismus antimikrobiálního působení stříbra zatím, i přes intenzivní zkoumání mnoha vědeckých týmů, není přesně znám. Předpokládá se, že se na rozdíl od klasických antibiotik nejedná pouze o jeden specifický účinek, ale že je působení nanočástic vůči bakteriím dáno souborem několika různých příspěvků. Nanomateriály na bázi stříbra jsou schopny např. narušovat metabolické procesy<sup>148,149</sup>, interagovat s DNA bakterií<sup>150</sup>, způsobovat oxidativní stres<sup>151–153</sup>, výrazně zvyšovat permeabilitu cytoplasmatické membrány, čímž je ovlivněn transport skrz ni<sup>25,154</sup>, apod. Díky tomuto současnému působení na více úrovních vykazují stříbro obsahující nanočástice mimořádnou aktivitu nejen vůči citlivým kmenům, ale též vůči bakteriálním kmenům vysoce rezistentním ke klasickým antibiotikům<sup>155,156</sup>. Kromě použití stříbra namísto antibiotik, případně použití nanomateriálů na bázi stříbra společně s antibiotiky v rámci synergického účinku, se nanočástice stříbra ukazují jako velmi vhodný materiál k povrchové úpravě nejrůznějších přístrojů, nástrojů a pomůcek v medicíně, kde úspěšně předcházejí bakteriální kontaminaci. Díky tomu nacházejí vrstvy nanočástic stříbra široké uplatnění v povrchové úpravě textilií, katetrů, implantátů, protéz apod.<sup>157–161</sup>.

## 2.2 Nanočástice zlata

Zlaté nanočástice reprezentují další širokou skupinu nanočástic vzácných kovů s vysokým aplikačním potenciálem. Snadností přípravy a stabilitou dokonce převyšují již diskutované nanočástice stříbra. I aplikačním potenciálem se mohou zmíněným nanočásticím stříbra minimálně rovnat. Zlaté nanočástice nacházejí uplatnění jak v heterogenní katalýze, tak v SERS nebo bioanalytických aplikacích jako vhodný materiál pro zobrazovací techniky a detekci biologicky důležitých molekul<sup>162–166</sup>.

### 2.2.1 Příprava nanočástic zlata

V drtivé většině jsou nanočástice zlata připravovány bottom-up technikami, tedy technikami redukce rozpustných iontů zlata za tvorby nové fáze. Kromě toho je možno nanočástice stříbra připravovat i laserovou ablací<sup>167</sup>, případně elektrochemickým vytrháváním nanočástic ze zlaté elektrody<sup>168</sup>. Jedná se však o okrajové techniky, které jsou dnes čím dál více opouštěny právě ve prospěch přípravy nanočástic z roztoku. Výchozí látkou, a tedy donorem iontů zlata, bývá u bottom-up přístupů nejčastěji chlorid zlatitý, resp. hydráty kyseliny tetrachlorozlatité. Tuto sůl je možno, stejně jako v případě stříbrných solí, redukovat širokou paletou redukčních činidel. Volba vhodné redukční látky pak společně s přidavkem stabilizátorů či modifikátorů, změnou teploty a dalších reakčních podmínek vede ke vzniku různě velkých nanočástic zlata s různou morfologií, rozdílnou mírou stability a samozřejmě i různou aplikovatelností. Jednou ze základních charakteristik nanočástic zlata je přirozeně jejich velikost. Příprava nanočástic zlata o definovaných velikostech tak v oblasti jejich výzkumu představuje jednu ze základních výzev.

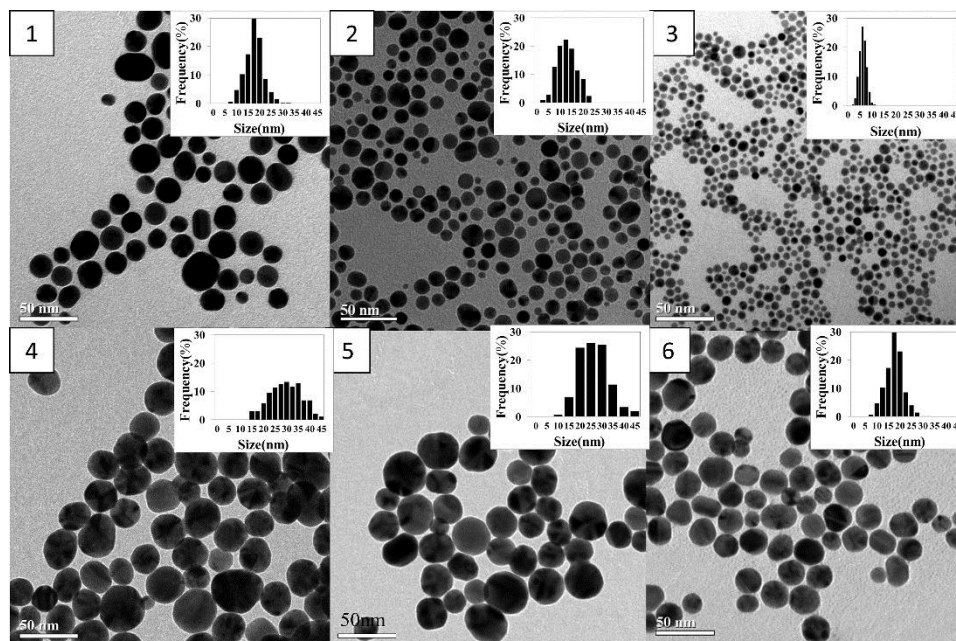
Podobně jako v případě nanočástic stříbra lze pro přípravu zlatých nanočástic použít široké palety redukčních činidel. Jednou ze základních redukčních látek je v případě zlata citrát sodný, jehož použití bylo publikováno již v roce 1951<sup>169</sup>. Jednoduchým přivedením zlatitého prekurzoru k varu a jeho smícháním společně s citrátem sodným lze tak připravit zlaté nanočástice o velikosti v řádu desítek nanometrů<sup>170</sup>. Li et al. dosáhli taktéž použitím citrátu vzniku poměrně malých nanočástic o velikosti 13 nm s velmi nízkou polydisperzitou (standardní odchylka 0,3 nm). Postup je založen na přidavku roztoku kyseliny tetrachlorozlatité do vroucího roztoku citrátu sodného. Směs je následně udržována ve varu dalších 15 minut, během nichž dojde ke změně barvy na sytě červenou značící přítomnost právě malých nanočástic zlata<sup>171</sup>.

Kromě zmíněného citrátu je hojně užívanou redukční látkou tetrahydridoboritan sodný, který se díky svým silným redukčním účinkům výborně hodí pro přípravu velmi malých nanočástic, jak ukazuje studie Shimmin et al., jež využili tetrahydridoboritanu sodného k přípravě nanočástic o velikostech jednotek nanometrů<sup>172</sup>. Namísto toho Niidome et al. připravili v přítomnosti modifikátoru 2-aminoethanthiolu částice o průměrné velikosti 35 nm<sup>173</sup>. Kromě dvou zmíněných základních redukčních látek je možno k přípravě nanočástic zlata použít i další redukční činidla jako jsou např. hydrazin<sup>174</sup>, polydiallyldimethylammonium chlorid<sup>175</sup>, kyselina gallová<sup>176</sup>, sacharid glukomannan<sup>177</sup>

nebo dnes velmi populární green syntézy využívající např. katechin<sup>178</sup>, taniny<sup>179</sup>, nebo další rostlinné extrakty<sup>180,181</sup>.

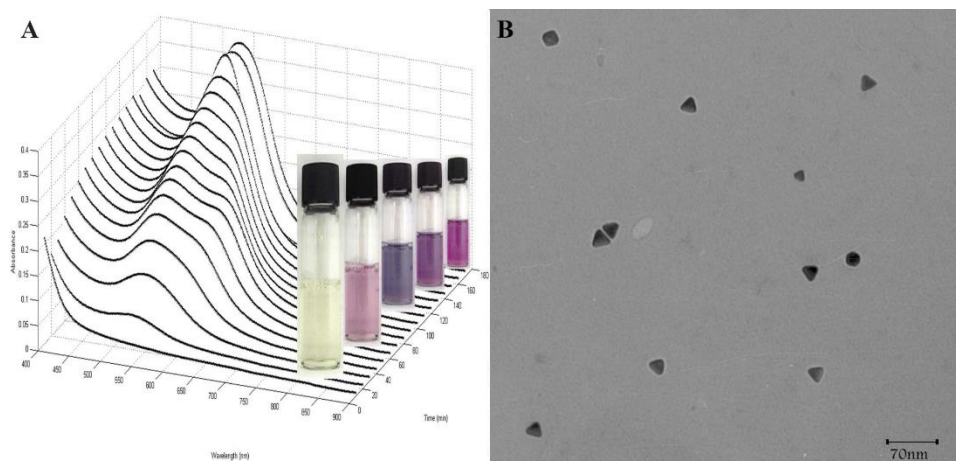
Přírozeně je pro širokou škálu aplikací vhodnější nalézt takové techniky, které umožňují kontrolovanou přípravu různě velkých nanočástic s minimálním zásahem do procesu syntézy. Vlastnosti takto připravených různě velkých nanočástic pak lze s ohledem na specifické aplikace vhodně porovnávat. Jednu z prvních prací věnující se přípravě různě velkých nanočástic zlata představili Brinas et al., kteří nanočástice zlata připravili jednoduchou redukcí kys. tetrahydrogenzlatité tetrahydridoboritanem sodným za přítomnosti glutathionu. Výslednou velikost vznikajících nanočástic lze řídit jednoduchou změnou pH. Je tak možno připravit nanočástice v rozmezí velikostí 2–6 nm<sup>182</sup>. Obdobným postupem, tedy přípravou nanočástic zlata chráněných thiolovými skupinami se zabývali také Ohyama et al. Velikost zlatých nanočástic lze v tomto případě řídit různým poměrem koncentrace zlatitých iontů vůči thioacetylovým skupinám. Takto je možné také připravit zlaté nanočástice o velikosti 2–6 nm<sup>183</sup>. Velikost vznikajících nanočástic zlata lze snadno řídit také změnou koncentračních poměrů v již zmíněné redukcí citrátem sodným. Po vhodné úpravě pH tak lze získat nanočástice zlata s velikostní distribucí od 20 do 50 nm<sup>184</sup>. Jinou možností, jak řídit velikost vznikajících nanočástic zlata, je změna rozpouštědla, resp. jeho části. V případě přípravy nanočástic zlata v organických rozpouštědlech je tak možné připravit výměnou chloroformu za benzen nanočástice zlata o velikostech 1–6 nm<sup>185</sup>. Větší nanočástice zlata, a především nanočástice ve větším rozsahu velikostí, konkrétně o velikostech 7–25 nm, lze připravit v průtočném systému, kde je typický prekurzor kys. tetrahydrogenzlatité redukována přidavkem kyseliny askorbové. Velikost vznikajících částic je řízena změnou poměru koncentrací kyseliny tetrachlorozlatité a kys. askorbové, změnou pH (obrázek 8) a změnou rychlosti průtoku<sup>186</sup>. Změny poměru zlatitých iontů a redukčního činidla lze využít také při redukcí zlatité soli dimethylaminoboranem. V takovém případě je možno dosáhnout nanočástic v rozmezí velikostí 10–30 nm<sup>187</sup>.

Kromě velikosti lze vhodnou volbou parametrů a aditiv řídit také tvar vznikajících nanočástic. V rámci možnosti přípravy různých tvarů zaujímají specifické místo geometrické tvary s ostrými hranami, jako jsou trojúhelníky či jiné mnohoúhelníky, které se výborně hodí k aplikacím v SPR. Dle Chu et al. lze připravit trojúhelníkové a šestiúhelníkové částice redukcí kys. tetrachlorozlatité citrátem sodným za přítomnosti



**Obrázek 8:** TEM snímky různě velikých nanočástic zlata připravených při různém pH a rozdílné koncentraci zlata<sup>186</sup>.

cetyltrimethylamonium bromidu a za zvýšené teploty. Výsledných velikostí a tvarů nanočástic lze snadno dosáhnout pouhou změnou poměru koncentrací reakčních složek, teploty a času reakce<sup>188</sup>. Hormozi-Nezhad et al. využili pro přípravu nanočástic zlata různých geometrických tvarů vlivu Tween 20 a 80. Dané povrchově aktivní látky působí jednak redukčním účinkem a jednak stabilizují vznikající nanočástice. Především v případě



**Obrázek 9:** UV-Vis absorpční spektra redukce zlatitých iontů na trojúhelníkové nanočástice zlata (A) a jejich snímek pořízený technikou transmisní elektronové mikroskopie.

použití Tween 20 pak vznikají symetrické trojúhelníkové nanočástice (obrázek 9), které jsou navíc velmi stabilní právě díky přidavku povrchově aktivní látky<sup>189</sup>.

### 2.2.2 Využití nanočástic zlata

Zlaté nanočástice nacházejí praktické využití především v oborech spojených s detekcí biologicky významných molekul v tzv. biosensingu a bioimagingu, v genové terapii, jako nosiče léčiv, analytických aplikacích a v neposlední řadě také jako heterogenní katalyzátory.

Biosensing metody jsou velmi často spojeny s elektrochemickým stanovením biologicky významných látek, které je umožněno, případně zesíleno, zlatými nanočásticemi nanesenými na mikroelektrodách. Zmíněné mikroelektrody jsou následně velmi dobře využitelné pro amperometrická měření. Amperometricky lze snadno detekovat např. peroxid vodíku, nebo prostřednictvím glukóza oxidázy také samotnou glukózu<sup>190</sup>. Jinou aplikaci představili Lie et al., kteří využili nanoelektrod pokrytých nanočásticemi zlata k selektivní detekci cerebrálního dopaminu ve striatu laboratorních potkanů<sup>191</sup>. Další vhodnou techniku využívající nanočástice zlata, která je výhodně aplikovatelná v biosensing oblastech, je povrchová plasmonová rezonance (SPR). V případě SPR jsou nanočástice zlata aktivovány biologickými receptory. Jejich následná interakce s cílovými molekulami (antigeny) se projevuje změnami v plasmonovém spektru<sup>192</sup>. Takto je možno použít nanočástice zlata např. pro detekci streptavidinu<sup>193</sup>, pro zesílení SPR signálu při detekci bakterií jako je *Escherichia coli*<sup>194</sup>, nebo pro detekci různých mykotoxinů v potravinách<sup>195</sup>.

V oblasti bioimagingu se se zlatými nanočásticemi počítá jako s vhodným materiálem pro značení a zobrazování buněk postižených rakovinou. Nanočástice zlata tak lze vhodně využít k cílenému CT/MR zobrazování rakovinou postižených buněk<sup>196</sup>, nebo jako slibný fluorescenční materiál k jejich značení a zobrazování<sup>197</sup>. Často se využívá také strategie založené na agregační nestabilitě zlatých nanočástic, která je velmi snadno pozorovatelná kolorimetrickými technikami. Lze tak detekovat například oligonukleotidy<sup>198,199</sup> nebo, kromě organických molekul a biomolekul, také nebezpečné polutanty, jako jsou ionty  $\text{Cd}^{2+}$ <sup>200</sup>. Obecně podléhají nemodifikované nanočástice zlata za zvýšené iontové síly (např. po přidavku chloridu sodného) poměrně snadno agregaci. Tomu lze, např. v případě zmíněné techniky stanovení  $\text{Cd}^{2+}$ , předejít přidavkem glutathionu (GSH).  $\text{Cd}^{2+}$  však

odnímá GSH zlatým nanočásticím a tvoří s nimi komplexy. To opět snižuje stabilitu zlatých nanočástic, které agregují, což je velmi snadno pozorovatelné právě kolorimetricky<sup>200</sup>.

Na pomezí biosensingu, bioimagingu a ostatních analytických aplikací stojí povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), v níž jsou zlaté nanočástice vedle nanočástic stříbrných hlavním materiálem používaným pro zesílení Ramanova signálu. V oblastech biosensingu a bioimagingu představuje SERS na zlatých nanočásticích jednu z dynamicky se rozvíjejících technik i díky své potenciální schopnosti tzv. single-molecule detection<sup>201</sup>. Zlaté nanočástice lze tak využít pro velmi citlivou a specifickou detekci a charakterizaci makrobiomolekul jako jsou DNA či RNA<sup>202</sup>, jejich sekvencí nebo proteinů<sup>203</sup>. Zlaté nanočástice lze také využít pro SERS detekci a následné zobrazení biomarkerů na buňkách rakoviny prsu<sup>204</sup>. Kromě zmíněných aplikací lze SERS na zlatých nanočásticích použít k detekci a rozdělení bakterií. Takto lze dělit bakterie nejen na Gram-negativní a Gram-pozitivní, ale díky vysoké citlivosti a tzv. otisku prstu (fingerprint) lze u bakterií stanovit i jejich druhy a kmeny<sup>205</sup>. Z analytických aplikací mimo odvětví biosensing a bioimaging lze jmenovat např. stanovení rhodaminu 6G<sup>206,207</sup>, těžkých kovů<sup>208–211</sup> nebo výbušnin<sup>212–214</sup>.

Kromě biologických aplikací jsou přirozeně nanočástice zlata, stejně jako nanočástice ostatních ušlechtilých kovů, vhodnými kandidáty pro heterogenní katalýzu. Zlaté nanočástice jsou vhodným materiálem podporujícím jak redukční, tak oxidační procesy. Mezi základní reakce katalyzované nanočásticemi zlata patří především hydrogenace nenasycených uhlovodíků (např. acetylenu a jeho derivátů) či hydrogenace nitrosloučenin<sup>215–219</sup>. V rámci katalytických oxidací nacházejí zlaté nanočástice uplatnění především při oxidaci oxidu uhelnatého<sup>220–223</sup>, silanů<sup>224–226</sup> nebo v tzv. „advanced oxidation processes“ využívaných v environmentálních technologiích<sup>227,228</sup>.

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V průběhu Ph.D. studia byl výzkum zaměřen několika směry. Jednalo se především o způsoby přípravy nanočástic bromidu stříbrného, stříbra, stříbrných vrstev a nanočástic zlata. Všechny připravené materiály byly následně na základě svých různých vlastností testovány pro různé aplikace. V případě přípravy nanočástic bromidu stříbrného, resp. nanočástic kovového stříbra, které bylo připravováno redukcí připraveného bromidu stříbrného, byl studován vliv různých modifikátorů na velikost vznikajících nanočástic. Podle použitých modifikátorů byly nanočástice rozděleny do dvou kategorií, kdy byla jedna kategorie ověřována pro svou biologickou aktivitu a druhá část byla testována jako heterogenní katalyzátory. V případě vrstev nanočástic stříbra, které byly připravovány sonochemicky, byl studován vliv různých redukčních látek a experimentálního uspořádání na kvalitu vrstev a následně jejich potenciální aplikace jako substráty pro SERS. Zlaté nanočástice pak byly připravovány za přítomnosti různě koncentrovaného modifikátoru Tween 80, což umožnilo přípravu různě velkých nanočástic stříbra, které byly následně testovány pro svou katalytickou aktivitu ve smyslu porovnání katalytické aktivity vzhledem k velikosti aktivního povrchu.

#### 3.1 Příprava nanočástic bromidu stříbrného v přítomnosti vybraných polymerů a jejich následná redukce na nanočástice stříbra

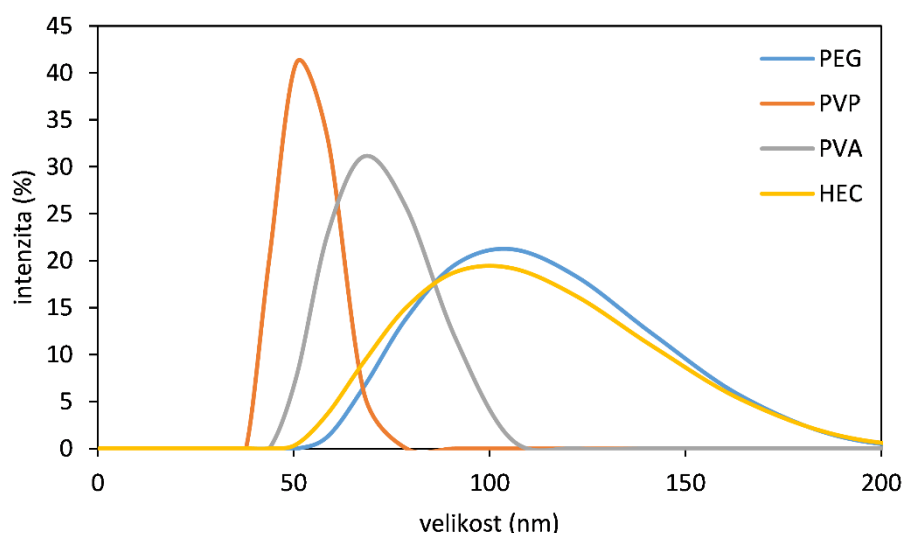
Jak bylo zmíněno v teoretické části, existuje široká paleta možností, jak lze připravit nanočástice stříbra. V rámci Ph.D. studia byla v oblasti disperzí nanočástic stříbra studována možnost přípravy nanočástic bromidu stříbrného a jeho následná redukce na nanočástice kovového stříbra. Daná metodika navíc umožňuje studovat nejen vlastnosti výsledných nanočástic stříbra, ale též meziprojektu, tedy bromidu stříbrného. Ten může být, jak bylo ukázáno v teoretické části, také sám o sobě materiálem s výhodným aplikačním potenciálem.

Příprava nanočástic bromidu stříbrného v přítomnosti vybraných polymerů a jeho následná redukce na nanočástice kovového stříbra byla popsána ve studii Suchomel P. et al. *PLoS One*, 2015<sup>229</sup>. Koloidní disperze bromidu stříbrného byly připravovány srážením dusičnanu stříbrného bromidem draselným. Pro účely stabilizace a řízení velikosti vznikajících částic byly při přípravě do disperze přidávány syntetické polymery PEG – polyetylenglykol (Mr = 10 000, Sigma-Aldrich, p.a.), PVP – polyvinylpyrrolidon (Mr = 360 000, Sigma-

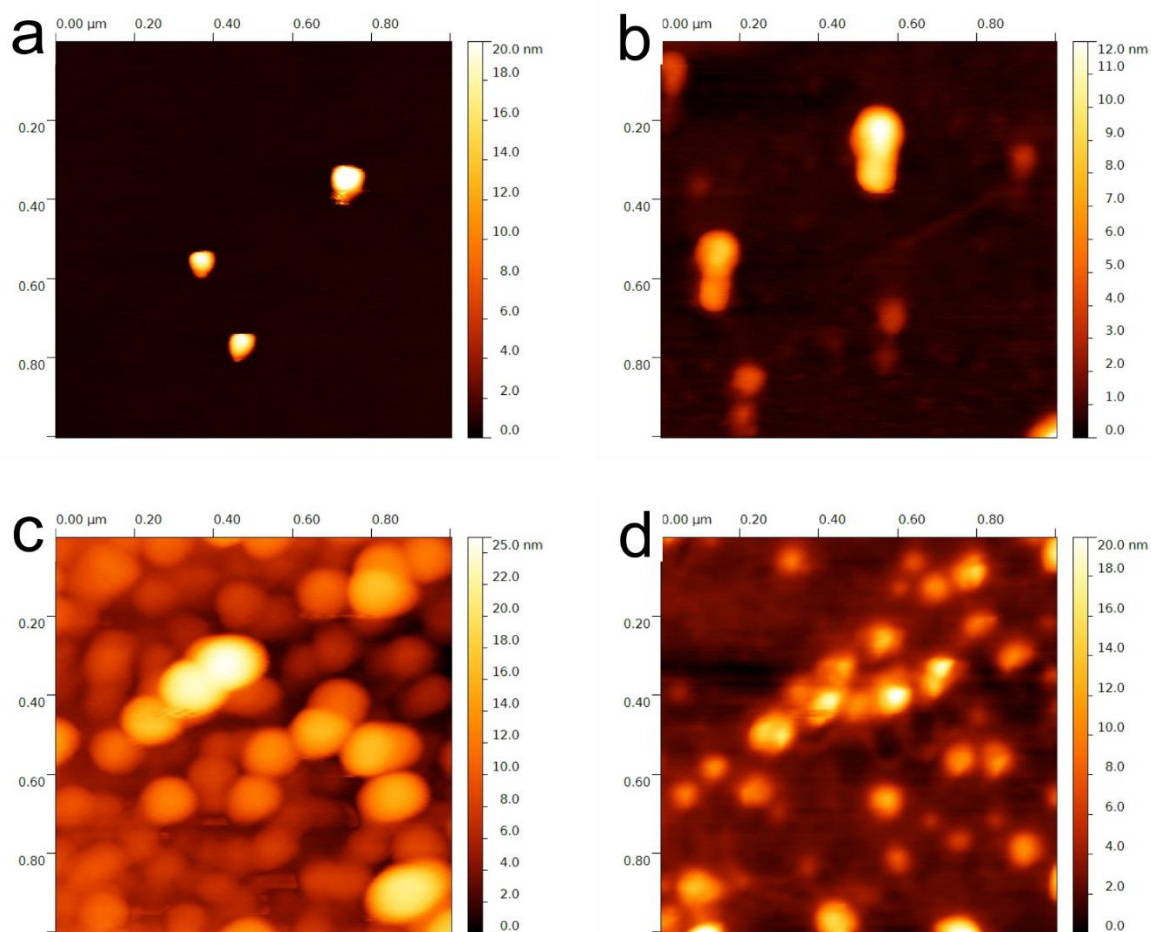


Aldrich, p.a.) a PVA – polyvinylalkohol ( $M_r = 85\,000\text{--}146\,000$ , Sigma-Aldrich, 98-99 % hydrolyzovaný), nebo přírodní polymerní látka HEC – hydroxyethylcelulóza ( $M_r = 90\,000$ , Sigma-Aldrich, p.a.). Na magnetickou míchačku byla umístěna kádinka s 5 ml roztoku dusičnanu stříbrného (Sigma-Aldrich, p.a.) o koncentraci  $5\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , který byl následně zředěn 5 ml destilované vody. Do roztoku byla za intenzivního míchání vlita směs 5 ml KBr (Lachema, p.a.) o koncentraci  $10\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  společně s 10 ml 0.25% (w/w) roztoku modifikátoru. Výsledné koncentrace reakčních složek v systému tedy byly  $1\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro dusičnan stříbrný, resp. ionty stříbra,  $2\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$  pro bromid draselný a 0,1 % (w/w) pro jednotlivé modifikátory. Po pěti minutách intenzivního míchání, kdy již byla dokončena tvorba nanočástic bromidu stříbrného, byly odebrány vzorky pro charakterizaci a pro jejich další testování z pohledu jejich biologické aktivity.

Koloidní disperze bromidu stříbrného byly v první fázi charakterizovány technikou dynamického rozptylu světla (DLS, Zeta Plus, Brookhaven Instr. Co., USA). Velikostní distribuce ukázala, že se v systému nachází částice o velikosti 50–105 nm (obrázek 10). Tato data bylo nutno doplňkově ověřit některou z dostupných zobrazovacích technik, které umožňují reálný popis částic. Částice bromidu stříbrného jsou přirozeně citlivé na elektromagnetické záření (fotolyzují), a z toho důvodu nebylo možné naměřená data



**Obrázek 10:** Distribuce částic bromidu stříbrného připravených v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC pořizená prostřednictvím dynamického rozptylu světla (DLS).



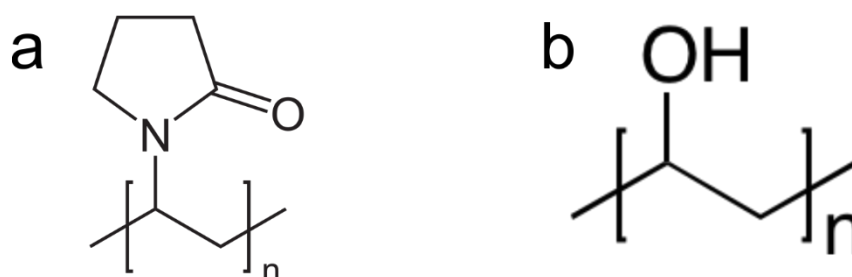
**Obrázek 11:** Snímky nanočástic bromidu stříbrného připravených v přítomnosti polymerů PEG (a), PVP (b), PVA (c) a HEC (d), pořízené technikou mikroskopie atomárních sil (AFM).

potvrdit nejčastěji používanou technikou transmisní elektronové mikroskopie, protože svazek elektronů způsoboval okamžitou redukci částic. Pro potvrzení naměřené velikosti částic a pro zjištění morfologie tak byla jako primární technika zvolena mikroskopie atomárních sil (AFM, NTEGRA Aura, NT-MDT, Russia) (obrázek 11). Pro účely AFM analýzy byly vzorky nanášeny na standardně používanou folii, na níž byly za tmy vysušeny při 50 °C. Snímky pořízené mikroskopií atomárních sil odhalily, že částice bromidu stříbrného neměly sférický tvar, ale nabývaly tvaru rotačního elipsoidu. Dle použití jednotlivých modifikátorů dosahovaly částice výšky v rozmezí od 10 do 20 nm a průměru od 60 do 130 nm (tabulka 1).

**Tabulka 1:** Velikost částic bromidu stříbrného připravených v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC, pořízená prostřednictvím dynamického rozptylu světla (DLS) a mikroskopie atomárních sil (AFM).

polymer	DLS (nm)	AFM (nm)	
		výška	průměr
PEG	105	18	64
		výška	průměr
PVP	50	10	120
		výška	průměr
PVA	70	11	130
		výška	průměr
HEC	100	12	70
		výška	průměr

Vznik rozdílně velkých částic bromidu stříbrného v přítomnosti různých modifikátorů pramenil z povahy jejich interakce s iontovým stříbrem v roztoku při vzniku nové fáze. Dle míry interakce tak bylo možno rozdělit použité polymerní modifikátory do dvou skupin. Jednu tvořily PVP a PVA, polymery jejichž funkční skupiny, tedy –OH pro PVA a =O pro PVP, jsou lokalizovány mimo polymerní řetězec (obrázek 12). PVP navíc ve své struktuře obsahuje atom dusíku, díky němuž může vzhledem k iontovému stříbru vystupovat jako Lewisova báze. Ionty  $\text{Ag}^+$  se tak váží na zmíněné funkční skupiny, resp. s nimi tvoří komplexy<sup>230–234</sup>. Komplexace iontů  $\text{Ag}^+$  zpomaluje vznik nových zárodečných center během precipitace, čímž dochází ke vzniku menšího počtu těchto center v reakčním systému. Tento efekt přirozeně ústí v tvorbu menšího počtu větších částic<sup>235</sup>.

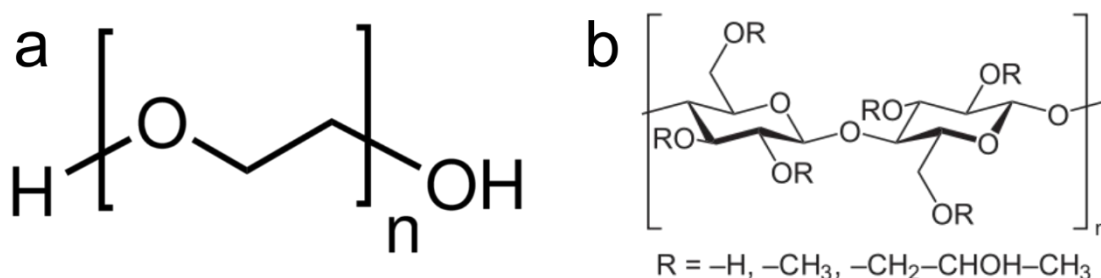


**Obrázek 12:** Strukturální vzorec PVP (a) a PVA (b).

V případě použitých polymerů PEG a HEC byla situace odlišná. I když tyto dva polymery ve své struktuře také obsahují kyslíkový heteroatom, s iontovým stříbrem neinteragují zdaleka tak silně a na rozdíl od PVP a PVA netvoří s  $\text{Ag}^+$  komplexy, které by iontové stříbro vázaly. Tato neochota interakce daných polymerů s  $\text{Ag}^+$  pramení z toho, že jsou jejich kyslíkové heteroatomy umístěny v polymerním řetězci, a nemohou tedy tak snadno participovat na koordinační vazbě (obrázek 13).

Použité dva polymery tedy díky minimální interakci s  $\text{Ag}^+$  neblokovaly vznik nové fáze, jako v případě použití PVP a PVA, a tím docházelo ke vzniku většího počtu nukleačních center. To vedlo ke vzniku většího počtu částic, které musely být přirozeně z důvodu stejného množství použitého stříbra menší. Tento předpoklad velmi dobře korespondoval s výsledky získanými pomocí mikroskopie atomárních sil. V případě výsledků pořízených dynamickým rozptylem světla již nebyla situace tak jednoznačná. Jak bylo ukázáno (tabulka 1), objevovala se mezi výsledky z DLS a AFM značná neshoda. Nespolehlivost DLS však bylo možno velmi snadno vysvětlit opět pomocí afinity jednotlivých polymerů ke stříbru. Zatímco PVP a PVA byly díky své afinitě ke stříbru silně adsorbovány na povrch částic bromidu stříbrného, díky čemuž vykazovaly dostatečný stabilizační efekt, v případě PEG a HEC nebyla adsorpce zdaleka tak silná, a částice bromidu stříbrného tak tvořily agregáty, které se pro DLS jeví jako větší částice.

Připravené částice bromidu stříbrného byly následně zredukovány tetrahydridboritanem sodným (Sigma-Aldrich, p.a.) na nanočástice kovového stříbra. K 25 ml koloidní disperze bromidu stříbrného bylo za intenzivního míchání přidáno 5 ml čerstvě připraveného roztoku tetrahydridboritanu sodného o koncentraci  $60 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Konečná koncentrace redukční látky v disperzi tedy dosahovala koncentrace  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Proces redukce byl ukončen po 30 minutách míchání, kdy změna barvy disperze na žlutou až hnědou

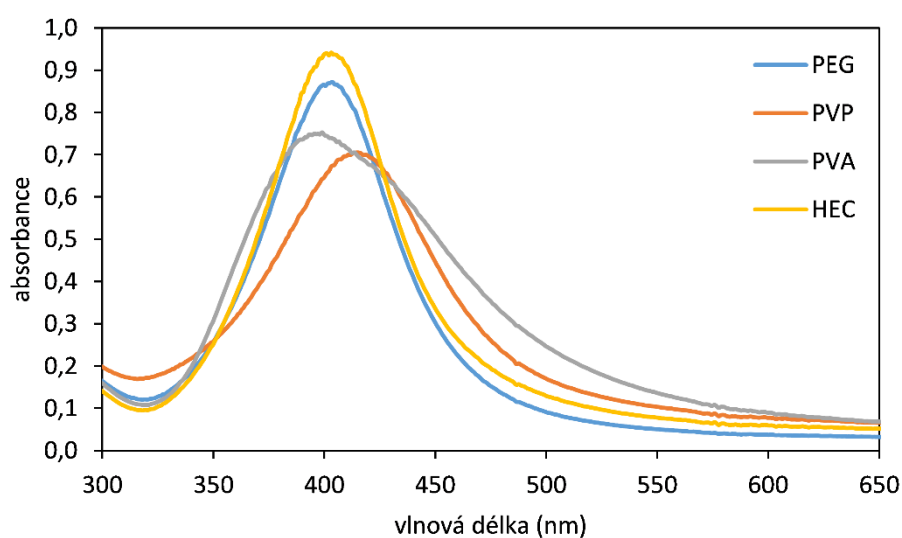


**Obrázek 13:** Strukturní vzorec PEG (a) a HEC (b).

(v závislosti na použitém polymeru) indikovala přítomnost stříbrných nanočástic. Připravené disperze nanočástic stříbra byly následně charakterizovány technikami UV-Vis spektroskopie (Specord S600, Analytic Jena AG, Germany), dynamického rozptylu světla (DLS, Zeta Plus, Brookhaven Instr. Co., USA) a v neposlední řadě také pomocí transmisní elektronové mikroskopie (JEM 2010, Jeol Ltd., Japan).

UV-Vis spektra jednotlivých vzorků vykazovaly pro nanočástice stříbra charakteristická absorpční maxima okolo vlnové délky 400 nm (obrázek 14). Ty naznačovaly přítomnost stříbrných nanočástic o velikosti přibližně 10 nm<sup>236</sup>. V případě PVP byl zřetelný posun absorpčního maxima na hodnotu přibližně 410 nm, který indikoval vznik větších částic než v případě PEG a HEC. Nanočástice stříbra připravené za použití PVA vykazovaly kromě primárního píku, který se nacházel mírně pod hodnotou 400 nm, také sekundární pík v oblasti okolo 420 nm. Takové spektrum naznačovalo existenci polydisperzního systému obsahujícího nejen velmi malé částice s velikostí pod 10 nm (pík v oblasti pod 400 nm), ale také frakci větších částic absorbujících ve vyšších vlnových délkách.

Paralelně s UV-Vis spektroskopií byla provedena charakterizace prostřednictvím dynamického rozptylu světla, jejíž výsledky s UV-Vis velmi dobře korespondovaly (tabulka 2). Dle DLS měření se nejmenší nanočástice stříbra nacházely v systému modifikovaném PEG a nabývaly velikosti 7 nm. Nepatrně větší částice s velikostí 9 nm, se vyskytovaly v disperzi, která byla modifikována HEC. V případě použití PVP a PVA pak



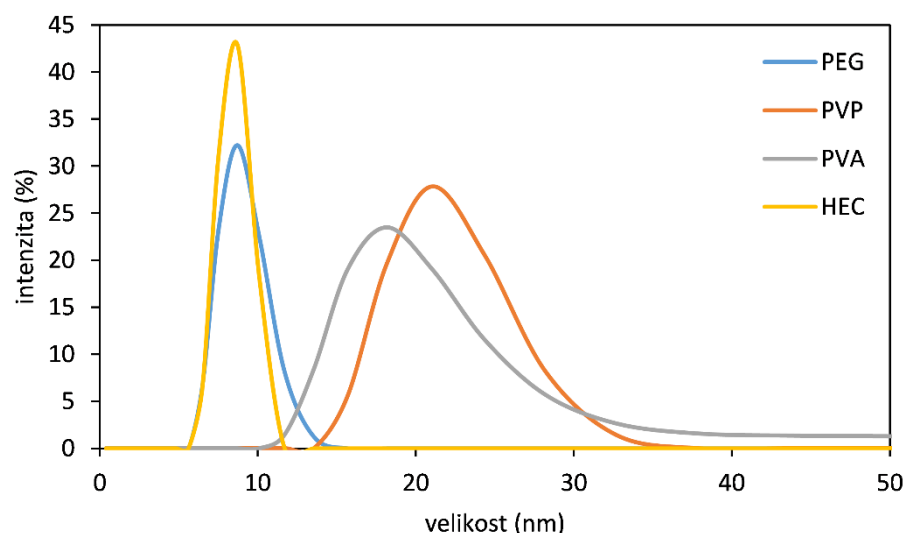
**Obrázek 14:** UV-Vis spektra 10× zředěných disperzí nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC.

**Tabulka 2:** Velikost (nm) / polydisperzita nanočástic připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC, pořízená prostřednictvím dynamického rozptylu světla (DLS) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM).

polymer	DLS	TEM
<b>PEG</b>	9 / 0,464	7 / 0,343
<b>PVP</b>	21 / 0,195	20 / 0,292
<b>PVA</b>	18 / 0,482	18 / 0,537
<b>HEC</b>	9 / 0,512	9 / 0,456

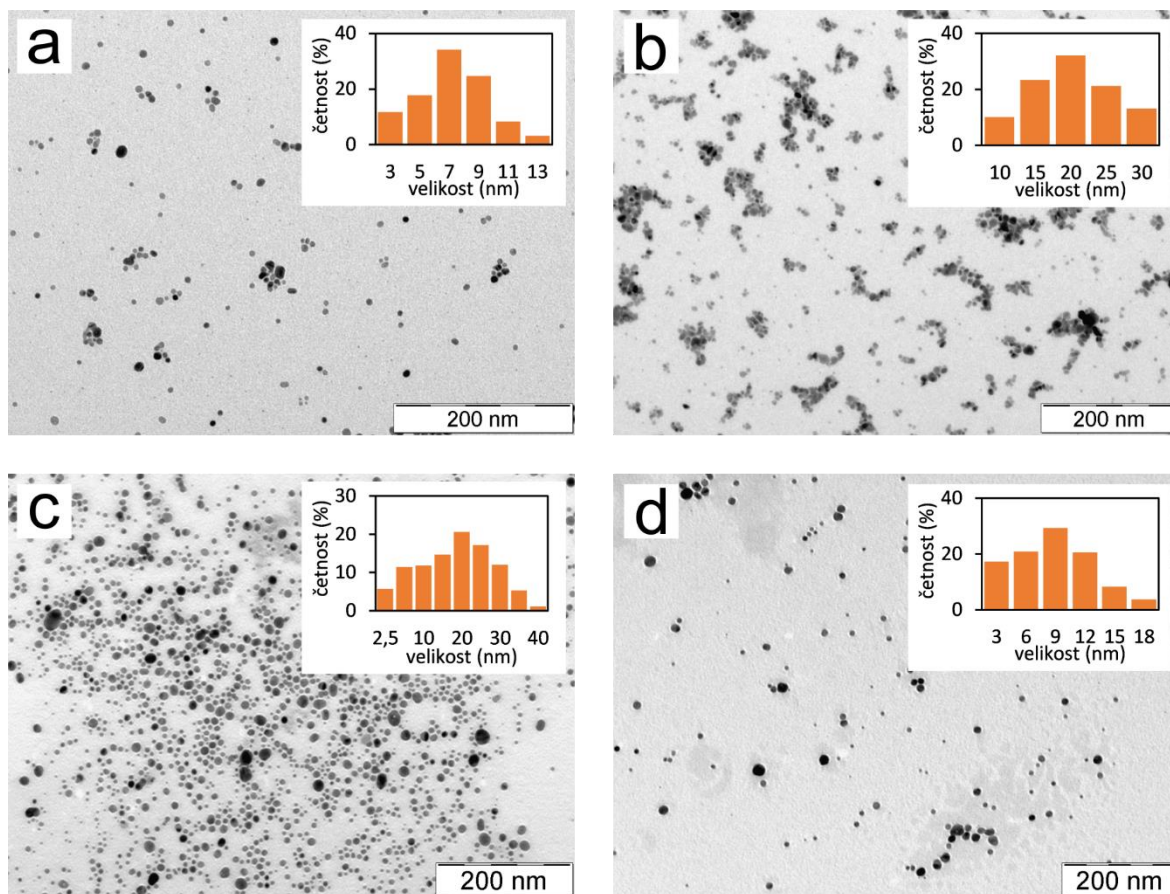
docházelo ke vzniku větších nanočástic stříbra, konkrétně 20 nm pro PVP a 18 nm pro PVA (obrázek 15). Hodnoty velikostí částic zjištěné dynamickým rozptylem světla byly následně ověřeny přímým pozorováním nanočástic prostřednictvím transmisní elektronové mikroskopie.

TEM snímky, resp. obrazová analýza z nich provedená, potvrdily přítomnost velmi malých částic pod 10 nm v případě použití modifikátorů PEG a HEC, a přítomnost větších nanočástic s průměrnou velikostí okolo 20 nm v případě použití PVP a PVA (obrázek 16). Kromě jednoduché obrazové analýzy a rozdělení částic do velikostních tříd byla prostřednictvím váženého průměru spočítána jejich průměrná velikost, a navíc byla spočtena i polydisperzita ( $Pd$ ) jednotlivých koloidních systémů podle rovnice 1,



**Obrázek 15:** Distribuce nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC pořízená prostřednictvím dynamického rozptylu světla (DLS).





**Obrázek 16:** Snímky a velikostní distribuce nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti polymerů PEG (a), PVP (b), PVA (c) a HEC (d), pořízené technikou transmisní elektronové mikroskopie (TEM).

**Rovnice 1:**

$$P_d = \frac{s}{\bar{d}}$$

kde  $s$  reprezentuje výběrovou směrodatnou odchylku a  $\bar{d}$  značí průměrnou velikost částic.

Výběrová směrodatná odchylka byla vypočítána dle rovnice 2,

**Rovnice 2:**

$$s = \left( \frac{1}{N-1} \sum h_i (d_i - \bar{d})^2 \right)^{\frac{1}{2}}$$

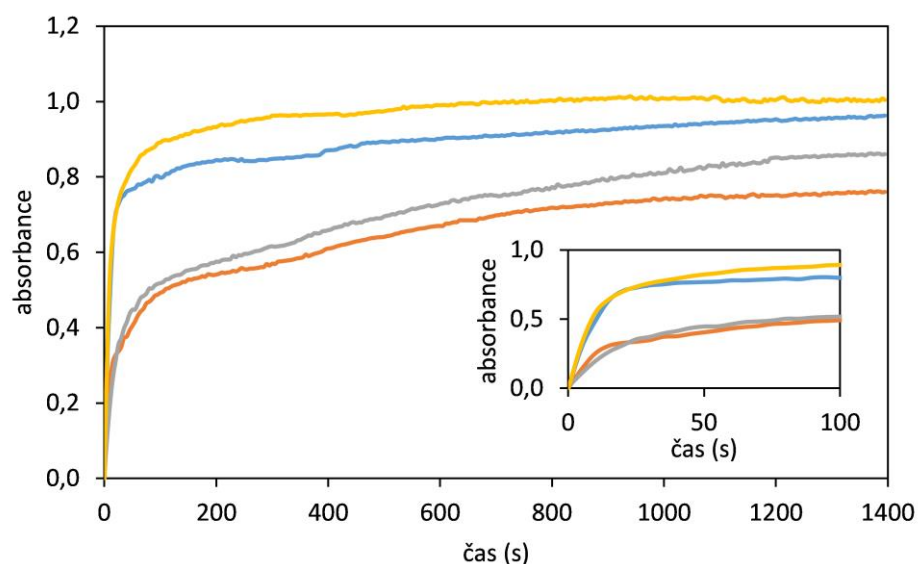
kde  $N$  je celkový počet částic,  $h_i$  reprezentuje četnost  $i$ -té třídy a  $d_i$  je průměrná velikost částic v  $i$ -té třídě.

Polydisperzita získaná prostřednictvím obrazové analýzy odpovídala polydisperzitě naměřené dynamickým rozptylem světla. V případě PVA navíc TEM snímky společně s vysokou hodnotou polydisperzity (0,537) potvrdily předpoklad vycházející z UV-Vis spekter a to, že se v systému nacházely jak větší částice přes 20 nm, tak i velmi malé částice o velikosti pod 10 nm.

V rámci redukce částic bromidu stříbrného na nanočástice stříbra bylo pozorováno, že redukce probíhala v přítomnosti různých polymerů různě dlouho. Pomocí UV-Vis spektrometrie byla proto pro každý systém pořízena spektra monitorující průběh redukce a byl vyhodnocen růst absorpčního maxima reprezentujícího právě nanočástice stříbra (obrázek 17). Kinetická měření jasně ukázala, že se v závislosti na použitém polymeru mění rychlost reakce a že lze na základě této rychlosti opět rozdělit polymery do dvou skupin. V případě PEG a HEC probíhala redukce rychleji, zatímco v případě použití PVP a PVA probíhala redukce ztelně pomaleji. Jak je patrné, tyto dvě skupiny odpovídaly jednak rozdělení polymerů podle velikosti vznikajících nanočástic stříbra (tabulka 2) a jednak síle interakce polymeru s ionty  $\text{Ag}^+$  diskutované výše. Je zřejmé, že je mezi těmito vlastnostmi přímé propojení. Protože PVP a PVA vykazují ke stříbru vyšší afinitu, dochází k blokování povrchu částic bromidu stříbrného, a tedy i ke zpomalování procesu redukce. Na zablokovaném povrchu částice bromidu stříbrného tak může k redukci docházet jen na jeho omezené části, což vede ke vzniku menšího počtu větších nanočástic stříbra. Oproti tomu PEG a HEC, které se popsanou afinitou nevyznačují, neblokují takovým způsobem povrch částic  $\text{AgBr}$  a tedy k redukci dochází na více místech, čímž vzniká větší počet malých nanočástic stříbra.

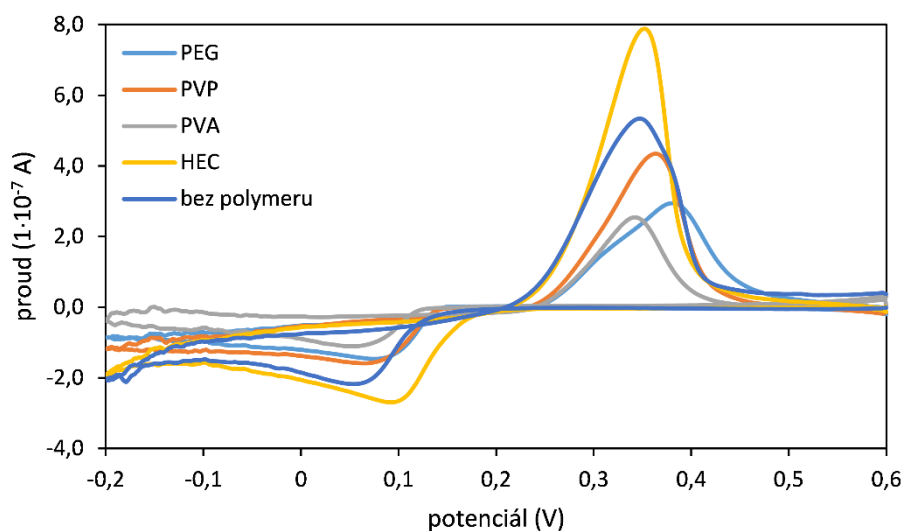
Popsaný vliv polymerů na redukci částic bromidu stříbrného byl potvrzen provedením elektrochemické redukce iontů  $\text{Ag}^+$  za přítomnosti daných polymerů. Elektrochemická studie byla provedena technikou cyklické voltametrie na platinové elektrodě při rychlosti polarizace elektrody  $0,1 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ . Ukázalo se, že všechny testované polymery s výjimkou HEC negativně ovlivňovaly elektrochemickou redukci  $\text{Ag}^+$ , což bylo v porovnání s redukcí iontů  $\text{Ag}^+$  bez přídavku polymeru reflektováno snížením redukčního proudu a posunem



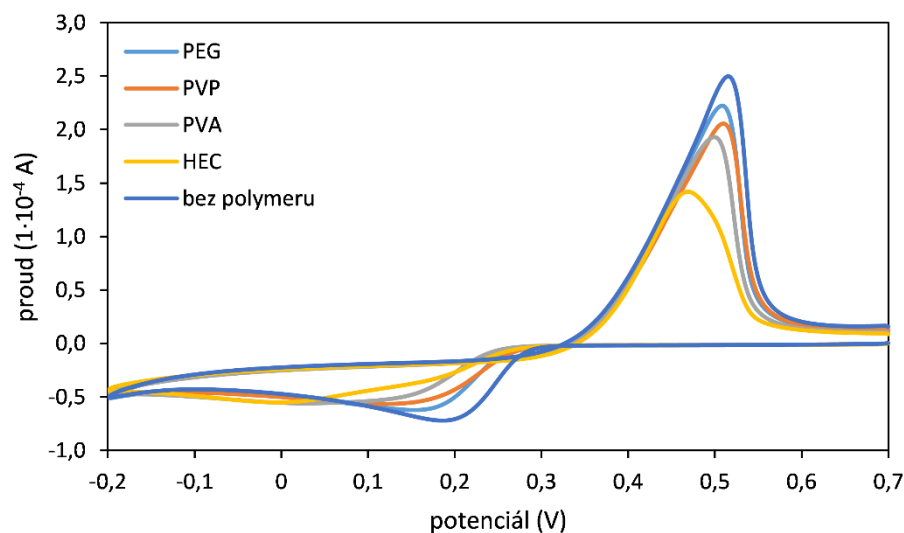


**Obrázek 17:** Vývoj absorpčního maxima v průběhu redukce disperzí částic bromidu stříbrného připravených v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC na nanočástice stříbra.

katodického píku k zápornějším hodnotám (obrázek 18). Tento efekt je obvykle spojen právě se vznikem komplexů, tedy komplexu  $\text{Ag}^+$  s konkrétním polymerem. U HEC byl navíc při procesu elektrochemické přeměny  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  pozorován i specifický (katalytický) efekt. HEC v tomto případě vystupovala jako slabé redukční činidlo, což způsobovalo



**Obrázek 18:** Cyklický voltamogram stříbrných iontů v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC při skenovací rychlosti  $0,1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ .



**Obrázek 19:** Cyklický voltamogram stříbrných iontů v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC při skenovací rychlosti  $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$ .

vznik složitějšího voltamogramu. To se projevilo především při rychlosti polarizace elektrody  $1 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$  (obrázek 19). Při této skenovací rychlosti byl v oblasti obráceného směru polarizace dobře pozorovatelný druhý redukční pík způsobený elektrokatalytickým efektem HEC. Navíc byl pozorovatelný i prudký nárůst anodického proudu z důvodu oxidace HEC.

### 3.1.1 Antibakteriální a antifungální aktivita nanočástic AgBr a Ag

Připravené částice bromidu stříbrného, společně s nanočásticemi kovového stříbra byly následně otestovány pro svou antibakteriální a antifungální aktivitu na Ústavu mikrobiologie LF UP. Biologická účinnost připravených materiálů byla testována standardní mikrodiluční metodou umožňující stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC), tedy nejnižší možné koncentrace, která ještě zamezuje růstu testovaných bakteriálních kmenů a kvasinek. Pro testování byly použity nezředěné a nijak neupravené koloidy, tedy koloidy o koncentraci stříbra  $108 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro disperze AgBr, resp.  $89,6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro disperze kovového stříbra. Ty byly na mikrotitrační destičce ředěny kultivačním médiem geometrickou řadou  $2 \times$  až  $128 \times$ . Navíc byly jako slepé vzorky otestovány roztoky všech polymerů o příslušných koncentracích, aby byla vyloučena biologická aktivita jich samotných. Jako kultivační médium byl použit agar Müller-Hinton (Difco Becton Dickinson). Biologická aktivita byla testována jak na referenčních kmenech

bakterií: *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 (značeno dle České sbírky mikroorganismů), tak na kmenech izolovaných z krve pacientů hospitalizovaných ve Fakultní nemocnici Olomouc (FNOL): *Pseudomonas Aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* (VRE), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL) *Candida albicans* I, *Candida albicans* II, *Candida tropicalis* a *Candida parapsilosis*. Kultivační médium bylo naočkováno příslušnou bakterií či kvasinkou o koncentraci  $10^5$ – $10^6$  CFU·cm<sup>-3</sup>. Po 24 hodinách inkubace při 37 °C byla vyhodnocena MIC jako nejnižší koncentrace stříbra, při níž docházelo k viditelné inhibici mikroorganismu.

Antibakteriální a antifungální aktivita připravených koloidních disperzí AgBr a Ag byla testována na 9 kmenech bakterií a 4 kmenech kvasinek. Průměrné výsledky ze 3 nezávislých měření jsou uvedeny v tabulce 3. Všechny hodnoty byly přepočítány na celkovou koncentraci stříbra v daných vzorcích. Získané hodnoty MIC pohybující se v rozmezí hodnot 0,8 a 20,2 mg·dm<sup>-3</sup> ukázaly, že oba materiály, jak AgBr, tak Ag, vykazovaly vysokou biologickou aktivitu srovnatelnou s jinými publikovanými výsledky<sup>156,237</sup>. Navíc se všechny nalezené hodnoty MIC nacházely pod hodnotami cytotoxicity materiálů obsahujících stříbro uváděnými v literatuře<sup>238</sup>.

Ačkoliv se na první pohled zdají hodnoty MIC podobné, bylo mezi nimi možno nalézt zajímavé trendy pozorovatelné u obou použitých koloidů. Částice AgBr byly zjevně mnohem aktivnější v případě kmenů *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* (divoký kmen izolovaný ve FNOL) a *Klebsiella pneumoniae* (ESBL – divoký kmen izolovaný ve FNOL). Na druhou stranu koloidní disperze Ag vykazovaly vyšší aktivitu oproti oběma druhům kmenu *Staphylococcus aureus*. Navíc lze ještě zajímavější rozdíl pozorovat v případě antibakteriálních aktivit částic modifikovaných různými polymery. Suverénně nejlepší biologickou aktivitu vykazovaly nanočástice stříbra modifikované HEC. Konkrétně v 7 ze 13 testovaných kmenů vykazovaly dané nanočástice stříbra nejnižší hodnoty MIC. Také se ukázalo, že kombinace nanočástic stříbra s HEC vykazovala ve všech případech vyšší aktivitu než iontové stříbro, které bylo testováno jako referenční vzorek. S přihlédnutím k aktivitě iontového stříbra bylo možné dle biologických aktivit rozdělit naměřené vzorky studovaných kombinací kovových nanočástic s polymery

**Tabulka 3:** Minimální inhibiční koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) částic bromidu stříbrného, nanočástic stříbra a stříbrných iontů.

	PEG		PVP		PVA		HEC		×
	AgBr	Ag <sup>0</sup>	AgBr	Ag <sup>0</sup>	AgBr	Ag <sup>0</sup>	AgBr	Ag <sup>0</sup>	Ag <sup>+</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 (+)	13,5	5,1	13,5	20,2	13,5	20,2	13,5	5,1	13,5
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 (+)	13,5	5,1	13,5	10,1	13,5	5,1	13,5	2,5	13,5
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954 (-)	3,4	5,1	6,7	5,1	6,7	5,1	6,7	2,5	3,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 (-)	0,8	2,8	0,8	2,5	0,8	2,5	0,8	2,5	3,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	0,8	2,5	0,8	2,5	1,7	2,5	1,7	2,5	3,4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	1,7	2,5	3,4	2,5	3,4	2,5	3,4	1,3	6,7
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (+)	13,5	5,1	13,5	10,1	13,5	5,1	13,5	2,5	13,5
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE) (+)	13,5	5,1	6,7	10,1	6,7	5,1	6,7	5,1	13,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ESBL) (-)	3,4	5,1	3,4	5,1	3,4	2,5	3,4	5,1	3,4
<b>antifungální efekt</b>									
<i>Candida albicans</i> I	1,7	2,5	1,7	2,5	1,7	2,5	1,7	1,3	1,7
<i>Candida albicans</i> II	1,7	1,3	3,4	2,5	1,7	2,5	1,7	2,5	3,4
<i>Candida tropicalis</i>	3,4	2,5	1,7	2,5	1,7	1,3	1,7	1,3	1,7
<i>Candida parapsilosis</i>	1,7	2,5	1,7	2,5	1,7	2,5	1,7	1,3	1,7

do dvou skupin. Zatímco u valné většiny případů bylo možno pozorovat vyšší antibakteriální aktivitu pro kovové nanočástice než pro iontové stříbro, v případě antifungální aktivity vůči testovaným kvasinkám poskytovaly kovové částice a iontové stříbro srovnatelné hodnoty. Tento rozdíl byl bezesporu spojen s rozdílným způsobem interakce použitých materiálů s testovanými mikroorganismy. V případě bakterií, tedy prokaryotických mikroorganismů, se jako efektivnější způsob antimikrobiálního působení jeví destrukce buněčné stěny působením částic AgBr a Ag, než penetrace iontového stříbra buněčnou stěnou a následná degradace bioaktivních molekul buňky. Tento fenomén popsaly též další vědecké týmy, které k jeho pozorování použily transmisní elektronovou mikroskopii<sup>239–241</sup>. Na druhou stranu, v případě testování aktivity vůči kvasinkám, jež patří mezi eukaryotní mikroorganismy, se jeví oba mechanismy, tedy penetrace buněčné stěny a její destrukce, prakticky stejně účinné.

Detailnější pohled na získané výsledky také ukázal, že nanočástice kovového stříbra vykazovaly nejvyšší antibakteriální aktivitu vůči Gram-pozitivním bakteriím (*Staphylococcus* a *Enterococcus*). V tomto případě reagují nanočástice stříbra se silnou vrstvou peptidoglykanu a rozrušují buněčnou stěnu<sup>239</sup>, zatímco tato vrstva zabraňuje

**Tabulka 4:** Koncentrace ( $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) iontového stříbra v koloidních disperzích bromidu stříbrného a stříbra připravených v přítomnosti polymerů PEG, PVP, PVA a HEC.

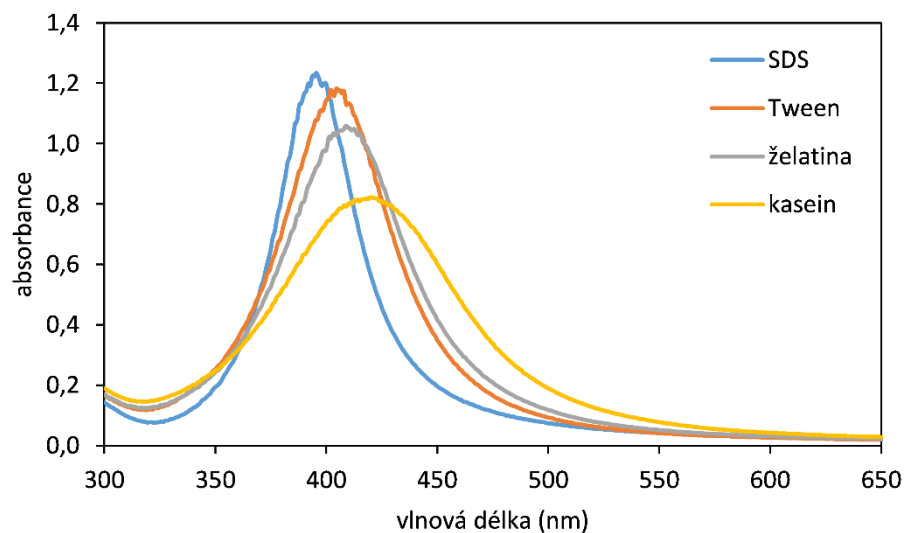
	PEG	PVP	PVA	HEC
<b>AgBr</b>	$4,93\cdot 10^{-5}$	$2,75\cdot 10^{-5}$	$4,06\cdot 10^{-5}$	$7,28\cdot 10^{-5}$
<b>Ag</b>	$7,30\cdot 10^{-6}$	$1,42\cdot 10^{-5}$	$1,31\cdot 10^{-5}$	$2,65\cdot 10^{-6}$

penetraci iontového stříbra (pocházejícího z obou – rozpustné i nerozpustné soli), a tím nedochází k tak devastujícím účinkům. Popsaný mechanismus potvrdily právě znatelně nižší hodnoty MIC pro kovové nanočástice v porovnání s iontovým stříbrem i s částicemi AgBr pro většinu Gram-pozitivních bakteriálních kmenů. Na druhou stranu v případě Gram-negativních bakterií není interakce nanočástic kovového stříbra s vnější liposacharidovou vrstvou v porovnání s penetrací stěny iontovým stříbrem zdaleka tak efektivní, resp. tenká buněčná stěna Gram-negativních bakterií nepředstavuje pro ionty stříbra takovou bariéru jako mnohem silnější stěna Gram-pozitivních bakterií, a ty tedy mohou pronikat do buňky, kde dochází k degradaci bioaktivních molekul<sup>242</sup>. Bylo předpokládáno, že bromid stříbrný z části uvolňuje iontové stříbro, které se může podílet na jeho biologických vlastnostech. K ověření tohoto předpokladu bylo pomocí ISE elektrody změřeno uvolňování stříbra z bromidu stříbrného (tabulka 4). Naměřené hodnoty se v případě AgBr pohybovaly okolo hodnoty  $5\cdot 10^{-5} \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , zatímco v případě nanočástic Ag se hodnota koncentrace volného iontového stříbra pohybovala okolo  $1\cdot 10^{-5} \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , tedy  $5\times$  nižší.

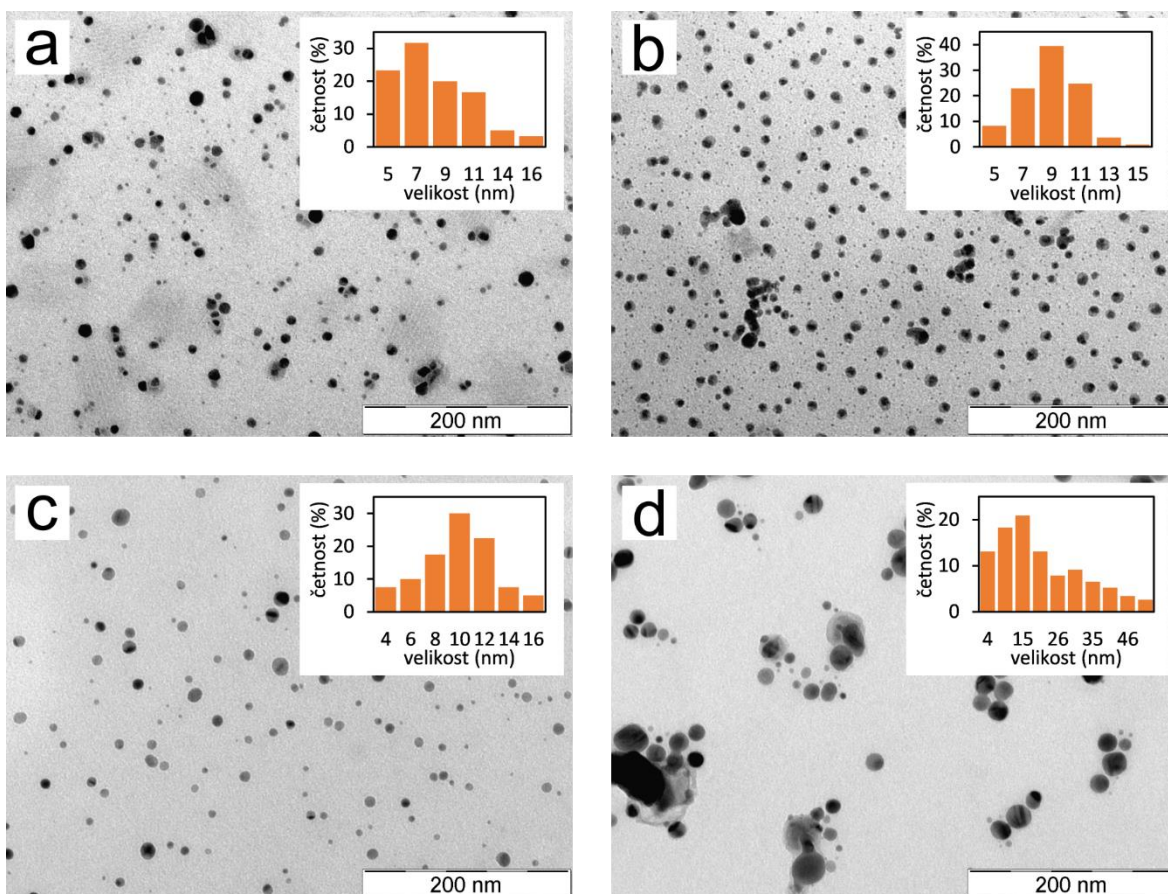
Z toho důvodu má v případě použití bromidu stříbrného mnohem větší vliv na antibakteriální aktivitu i volné iontové stříbro než v případě použití nanočástic kovového stříbra. V důsledku toho vykazovaly všechny Gram-negativní bakteriální kmeny společně s testovanými kmeny kvasinek (jejichž cytoplasmatická membrána má podobnou lipidovou strukturu jako vnější část buněčné stěny Gram-negativních bakterií) vyšší sensitivitu vůči bromidu stříbrnému. MIC bromidu stříbrného pro Gram-negativní kmeny bakterií a kmeny testovaných kvasinek navíc nabývaly velmi podobných hodnot, což naznačuje, že byly pro danou studii rozdíly ve stavbě vnější části buněčné membrány (existence membránových proteinů v případě Gram-negativních bakterií) zcela zanedbatelné.

### 3.2 Příprava nanočástic stříbra v přítomnosti dalších modifikátorů

Kromě polymerních látek popsanych v kapitole 3.1 bylo testováno i použití dalších modifikátorů. Danou problematikou se zabývala studie Suchomel P. et al. *Nanocon 2013, 5th international conference, 2014*<sup>243</sup>. Konkrétně byly použity povrchově aktivní látky SDS – dodecylsírán sodný (Lachema, p.a.) a Tween 80 – polyoxyetylen-sorbitan-monooleát (Sigma-Aldrich, p.a.) a dva přírodní polymery - želatina (Penta, p.a.) a kasein (Lachema, p.a.). Nanočástice stříbra byly stejně jako v kapitole 3.1 připraveny dvoukrokovou syntézou, kdy byly v prvním kroku připraveny disperze bromidu stříbrného modifikovaného výše zmíněnými látkami, které byly následně ve druhém kroku zredukovány na nanočástice kovového stříbra. Při přípravě byla na magnetickou míchačku umístěna kádinka s 5 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci  $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , který byl následně zředěn 5 ml destilované vody. Do roztoku byla za intenzivního míchání vlita směs 5 ml KBr o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  společně s 10 ml roztoku SDS či Tween 80 o koncentraci  $1,25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , nebo 0,25% (w/w) roztoku kaseinu či želatiny. Výsledné koncentrace reakčních složek v systému tedy byly  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro dusičnan stříbrný, resp. ionty stříbra,  $2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro bromid draselný,  $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro SDS a Tween 80 a 0,1 % (w/w) pro jednotlivé polymery. Po pěti minutách intenzivního míchání, kdy již byla ukončena tvorba nanočástic bromidu stříbrného, bylo do disperze přidáno 5 ml čerstvě připraveného roztoku tetrahydridoboritanu sodného o koncentraci  $60 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , čímž byly částice bromidu stříbrného zredukovány na nanočástice kovového stříbra. Proces redukce byl ukončen po následujících 30 minutách míchání, kdy už nedocházelo k vizuální změně barvy připravených disperzí. Po přípravě disperzí nanočástic stříbra byly odebrány vzorky na okamžitou charakterizaci prostřednictvím UV-Vis spektrometrie (obrázek 20), pro jejíž účely byly z důvodu vysoké absorpce vzorky desetinásobně zředěny destilovanou vodou. Existence absorpčního píku okolo vlnové délky 400 nm potvrdila přítomnost stříbrných nanočástic. Dle známé závislosti polohy absorpčního maxima na vlnové délce<sup>236</sup> bylo možno usuzovat, že se nejmenší částice nacházely v disperzi modifikované SDS, velikost následně rostla přes disperze modifikované Tween 80, želatinou až po kasein. Kromě rozdílné velikosti bylo též možné na základě pořízených UV-Vis spekter usuzovat na rozdíly v polydisperzitě. Především v případě kaseinu bylo ze značné šířky píku zřejmé, že byla koloidní disperze podstatně polydisperznější než v případě ostatních 3 modifikátorů.



**Obrázek 20:** UV-Vis spektra 10× zředěných disperzí nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti modifikátorů SDS, Tween 80, želatiny a kaseinu.



**Obrázek 21:** Snímky a velikostní distribuce nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti SDS (a), Tween 80 (b), želatiny (c) a kaseinu (d), pořízené technikou transmisní elektronové mikroskopie (TEM).

**Tabulka 5:** Velikost a polydisperzita nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti SDS, Tween, želatiny a kaseinu, vypočtená ze snímků pořízených transmisí elektronovou mikroskopií (TEM).

polymer	velikost (nm) / polydisperzita
SDS	8 / 0,346
Tween 80	9 / 0,229
želatina	10 / 0,344
kasein	20 / 0,607

U všech koloidních disperzí byla následně provedena přímá charakterizace velikosti nanočástic stříbra transmisí elektronovou mikroskopií (obrázek 21), z níž byla navíc provedena obrazová analýza (tabulka 5) a vypočtena polydisperzita dle rovnice 1 uvedené v kapitole 3.1. Výsledky potvrdily předpoklad z UV-Vis spektroskopie a ukázaly, že lze touto metodou připravit nanočástice v rozmezí 8-20 nm. Také potvrdily předpoklad, že v případě kaseinu dochází v porovnání s ostatními modifikátory ke vzniku výrazně polydisperznějšího systému.

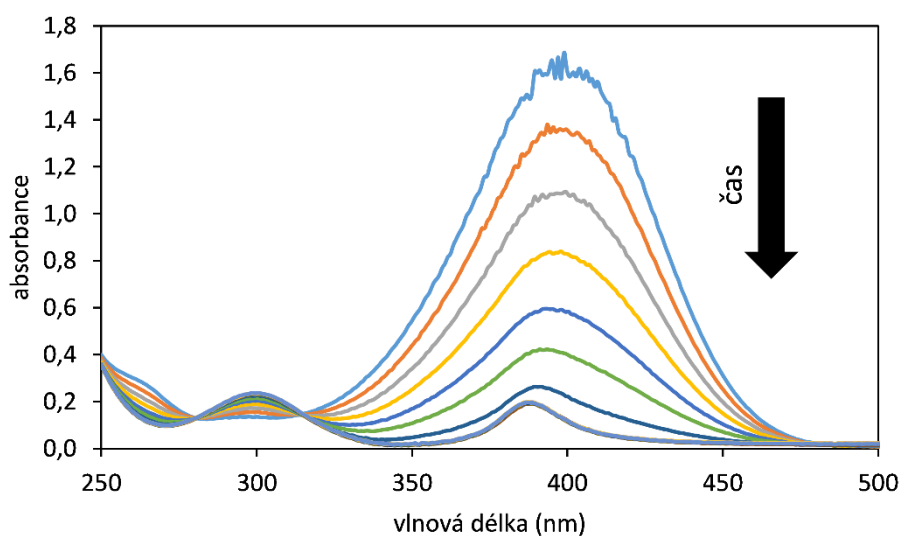
### 3.2.1 Katalytická aktivita nanočástic Ag

Připravené nanočástice stříbra byly v rámci studia aplikačního potenciálu podrobeny testování katalytické aktivity na modelové reakci redukce 4-nitrofenolu tetrahydridoboritanem sodným v alkalickém prostředí. Výhoda zvolené reakce spočívá především v možnosti snadného monitoringu úbytku 4-nitrofenolu a zároveň rostoucí koncentrace 4-aminofenolu UV-Vis spektrometrií. 4-nitrofenol je charakteristický absorpčním píkem vyskytující se při vlnové délce rovné 400 nm, zatímco 4-aminofenol je reprezentován píkem v oblasti 300 nm. Samotný průběh reakce je tak možno sledovat právě úbytkem daného absorpčního maxima 400 nm, tedy úbytkem koncentrace 4 nitrofenolu. Samotný kinetický experiment probíhal ve standardní křemenné kyvetě, do které byly odměřeny 2 ml 4-nitrofenolu (Lachema, p.a.) o koncentraci  $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Následně bylo přidáno 0,465 ml destilované vody a 0,035 ml koloidní disperze stříbra. Jako slepý (srovnávací vzorek) byl proveden experiment bez přídavku koloidního stříbra. Přídavek stříbra byl tedy přirozeně nahrazen destilovanou vodou. Takto připravený roztok byl promíchán a následně do něj bylo přidáno 0,5 ml roztoku tetrahydridoboritanu sodného o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Výsledný roztok byl intenzivně promíchán, ihned vsunut do



UV-Vis spektrometru a bylo započato kinetické měření. Ve všech případech vyznačovaly kinetické křivky stejné charakteristiky (především tvar) a lišily se pouze sklonem reprezentujícím rychlost úbytku 4-nitrofenolu z reakční směsi. Lze proto pro všechny případy uvést jedno typické kinetické měření (obrázek 22). K poklesu absorpčního maxima, a tedy k redukci 4-nitrofenolu, nedocházelo ihned po smíchání reakční směsi s tetrahydridoboritanem sodným, ale ve všech případech byla pozorována tzv. indukční doba (induction period), která je obvykle přisuzována času potřebnému k difuzi a adsorpci molekul 4-nitrofenolu na povrch nanočástic stříbra<sup>244</sup> a k restrukturalizaci povrchu nanočástice umožňující jeho aktivní katalytické působení<sup>245,246</sup>. Průměrně dosahovala indukční doba cca 360 s, po kterých teprve došlo k prvnímu poklesu absorpčního maxima (čas  $t_0$ ). Pro přehlednost a zároveň pro správný výpočet kinetických veličin byla všechna spektra před časem  $t_0$  odstraněna a za počátek reakce byl tedy považován právě tento čas.

Reakce katalyzovaná na povrchu nanočástic stříbra (resp. na povrchu nanočástic ušlechtilých kovů obecně) se skládá z několika základních kroků. Prvním je reakce tetrahydridoboritanu sodného (resp. aniontu  $\text{BH}_4^-$ ) s povrchem kovové nanočástice, při níž dochází k přenosu elektronů na povrch nanočástice<sup>247,248</sup>. Následující krok je spojen s difuzí molekul 4-nitrofenolu a její adsorpcí na povrch nanočástice. Elektrony pocházející z hydrolyzy aniontů  $\text{BH}_4^-$  následně redukuje molekuly 4-nitrofenolu na 4-aminofenol, jenž se ve finálním kroku desorbuje z povrchu nanočástice a difunduje zpět do systému. Protože



**Obrázek 22:** UV-Vis spektra 4-nitrofenolu zaznamenaná každých 60 s v průběhu redukce katalyzované nanočásticemi stříbra připravenými v přítomnosti SDS.

jsou procesy difuze, adsorpce a desorpce rychlé a reverzibilní, představuje rychlost-určující krok redukce 4-nitrofenolu<sup>249</sup>. Zmíněný mechanismus lze tedy z pohledu kinetiky popsat Langmuir-Hinshelwoodovým mechanismem heterogenní katalýzy popsaným rovnicí 3,

**Rovnice 3:**

$$v = -\frac{dC_A}{dt} = -\frac{dC_B}{dt} = \frac{kK_AK_BC_AC_B}{(1 + K_AC_A + K_BC_B)^2} S^2$$

kde  $v$  je rychlost reakce,  $k$  reprezentuje zdánlivou rychlostní konstantu,  $S$  je povrch katalyzátoru,  $K_A$  a  $K_B$  značí adsorpční koeficienty a  $C_A$  a  $C_B$  jsou koncentrace reakčních složek v systému. Index "A" pak patří 4-nitrofenolu, zatímco "B" značí tetrahydridoboritan sodný. Koncentrace 4-nitrofenolu je oproti koncentraci tetrahydridoboritanu sodného velmi nízká, a tedy  $K_AC_A \ll K_BC_B$ . Tím pádem lze rovnici 3 zjednodušit na rovnici 4,

**Rovnice 4:**

$$v = \frac{kK_AK_BC_AC_B}{(1 + K_BC_B)^2} S^2$$

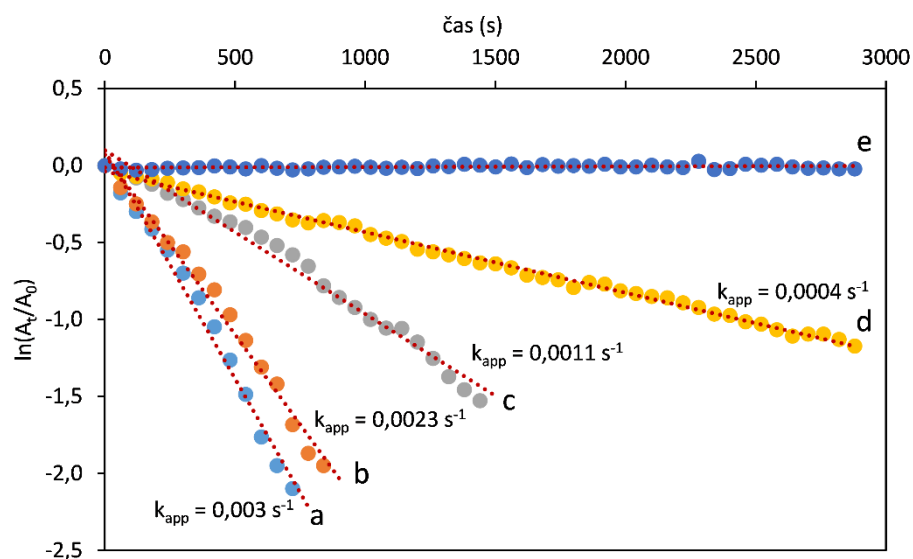
Substituce všech konstant kromě  $C_A$  za  $K_{app}$  vede následně k dobře známé rovnici kinetiky prvního řádu (rovnice 5).

**Rovnice 5:**

$$v = k_{app}C_A$$

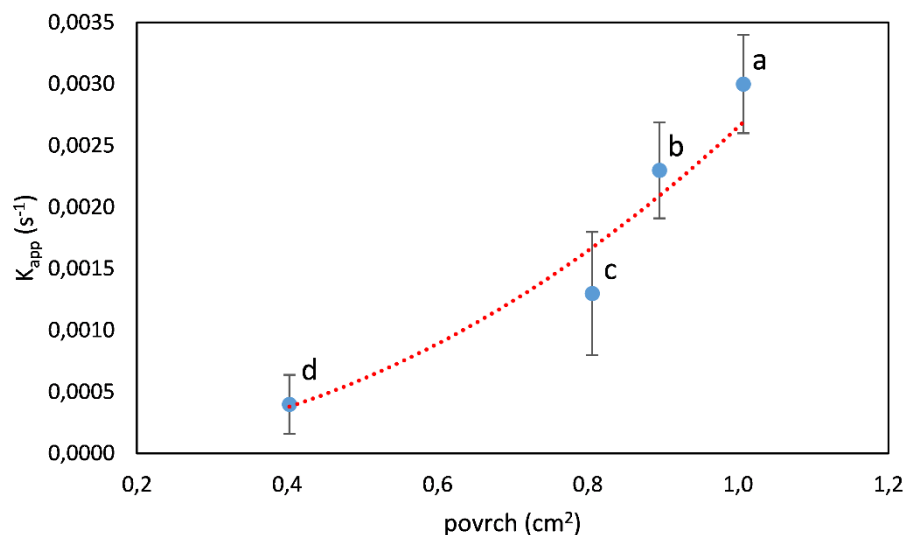
Díky tomu lze zdánlivou rychlostní konstantu redukce 4-nitrofenolu jednoduše získat jako funkci změny absorbance při vlnové délce 400 nm v čase<sup>105</sup>. Konkrétně byla zdánlivá rychlostní konstanta jednotlivých katalyzovaných reakcí získána dle Wundera et al. ze směrnice lineární závislosti  $\ln(A/A_0)$  na čase<sup>244</sup>, tedy  $\ln(A/A_0) = -k_{app}t$  (obrázek 23).

Z obrázku je patrné, že ve slepém vzorku, tedy systému bez nanočástic stříbra k redukci nedocházelo v rámci reakční doby menší než 3000 s, zatímco v přítomnosti nanočástic stříbra redukce úspěšně probíhala a její výsledná rychlost byla, jak je zřejmé, závislá na velikosti použitých nanočástic stříbra. Zdánlivá rychlostní konstanta (a tedy rychlost reakce) tak rostla od hodnoty 0,0004 s<sup>-1</sup> pro systém obsahující nanočástice stříbra



**Obrázek 23:** Kinetické křivky redukce 4-nitrofenolu katalyzované nanočásticemi stříbra připravenými redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti SDS (a), Tween 80 (b), želatiny (c) a kaseinu (d) a křivka reprezentující nekatalyzovaný systém (e).

modifikované kaseinem, přes  $0,0011 \text{ s}^{-1}$  pro nanočástice modifikované želatinou a  $0,0023 \text{ s}^{-1}$  pro nanočástice připravené v přítomnosti Tween 80 až po hodnotu  $0,003 \text{ s}^{-1}$  patřící systému katalyzovanému nejmenšími z použitých nanočástic, tedy nanočásticemi stříbra modifikovanými dodecylsíránem sodným (SDS). Jak je patrné z rovnice 4, reakční rychlost závisí kvadraticky na celkovém povrchu katalyzátoru. Proto byla vynesena závislost zdánlivé rychlostní konstanty na celkovém povrchu nanočástic v systému (obrázek 24), která potvrdila, že zdánlivá rychlostní konstanta rostla kvadraticky vzhledem k celkovému povrchu a tedy že katalyzovaná reakce probíhala mechanismem Langmuir-Hinshelwoodovým. Se zmenšujícím se průměrem nanočástic tedy rostl jejich povrch, což se odrazilo ve zvyšující se rychlosti reakce (hodnotě zdánlivé rychlostní konstanty). V případě použitých modifikátorů se velikost připravených nanočástic stříbra pohybovala v rozmezí 8-20 nm, což jsou velikosti, kdy je podle literatury dodržena jednoznačná závislost katalytické aktivity na celkovém povrchu katalyzátoru (při zachování konstantní koncentrace stříbra v systému). Tato závislost nebyla narušena ani použitými stabilizátory. Lze tedy předpokládat, že tyto nejsou schopny efektivně blokovat povrch proti přístupu malých molekul (jako je 4-nitrofenol), a bránit tak jejich katalytické aktivitě při redoxních reakcích s takovými molekulami. Jedná se o důležité zjištění z pohledu skutečnosti, že použité stabilizátory výrazně zvyšují agregátní stabilitu



**Obrázek 24:** Závislost reakčních rychlostí redukce 4-nitrofenolu tetrahydridoboritanem sodným na velikosti celkového povrchu nanočástic stříbra připravených redukcí nanočástic AgBr v přítomnosti SDS (a), Tween 80 (b), želatiny (c) a kaseinu (d).

nanočástic stříbra, a mohou tak udržet i jejich vysokou katalytickou aktivitu v prostředích, které mohou u nestabilizovaných částic vyvolat jejich agregaci a tedy i výrazné snížení katalytické aktivity.

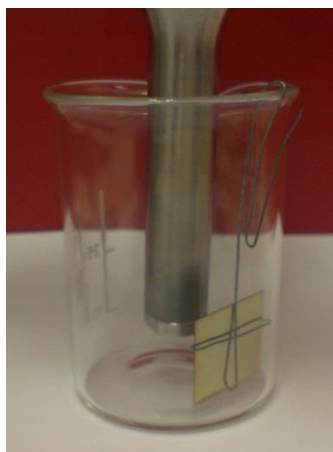
### 3.3 Sonochemická příprava vrstev nanočástic stříbra

Přípravou vrstev nanočástic stříbra na skleněném substrátu se zabývala studie Suchomel P. et al. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2016. Vrstvy nanočástic stříbra na skleněných krycích sklíčkách (Menzel-Gläser, 18×18 mm), byly připravovány redukcí dusičnanu stříbrného, resp. diaminstříbrného komplexu, slabými redukčními činidly, za současného působení výkonného ultrazvuku – sonikátoru (Q700, QSonica LLC, USA). V rámci provedené studie bylo testováno několik modifikací vedoucích k ovlivnění struktury a kvality výsledných vrstev. V závislosti na materiálu použité redukční nádoby, již představovala 50ml kádinka ze skla nebo polypropylenu, byly testovány 2 koncentrace reakčních složek. Z důvodu možného ovlivnění výsledných vrstev byl také studován vliv různých redukčních činidel. Byly to konkrétně polyoly - polyetylen glykol (Sigma–Aldrich, p.a.) a glycerol (Sigma–Aldrich, p.a.), a redukující sacharidy - maltóza (Sigma–Aldrich, p.a.), glukóza (Sigma–Aldrich, p.a.) a laktóza (Sigma–Aldrich, p.a.). V prvních testech byl navíc do

systemu přidán polymer polyvinylpyrrolidon (PVP, Mr = 40 000, Sigma–Aldrich, p.a.), který se v jiných studiích osvědčil jako vhodný modifikátor a stabilizátor<sup>90</sup>.

Před samotnou depozicí byla skleněná sklíčka důkladně umyta saponátem a následně opláchnuta destilovanou vodou. Ošetřená sklíčka byla pomocí drátěné konstrukce vertikálně zavěšena do kádinky (obrázek 25), do níž bylo přidáno 5 ml, případně 1 ml roztoku dusičnanu stříbrného o koncentraci  $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Roztok dusičnanu stříbrného byl zředěn odpovídajícím množstvím vody (tak, aby byl výsledný objem po přidavku všech reakčních komponent při zanedbání objemové odchylky 25 ml). Následně bylo přidáno 2,5 ml, nebo 1 ml redukčního činidla v případě PEG a glycerolu, nebo roztoku redukujícího sacharidu o koncentraci  $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Po smíchání výše zmíněných komponent byl doprostřed kádinky zasunut sonikační hrot takovým způsobem, aby byl ponořen cca 1 cm do roztoku. Na přístroji QSonica byla nastavena amplituda na hodnotu 30 % a byla zahájena sonikace. Několik málo sekund po zahájení samotné sonikace, kdy došlo k dokonalému promíchání roztoku, bylo do systému nastříknuto 1,5 ml, případně 0,3 ml roztoku hydroxidu amonného (1:9). V případě testů s přidavkem PVP bylo do systému před sonikací přidáno 0,5 ml roztoku PVP o koncentraci  $0,375 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Příprava nanočástic stříbra a jejich depozice na skleněný povrch byla ukončena po 5,5 minutách sonikace. Skleněná krycí sklíčka pokrytá vrstvou nanočástic stříbra byla vytažena z drátěných držáků, omyta destilovanou vodou a osušena proudem vzduchu.

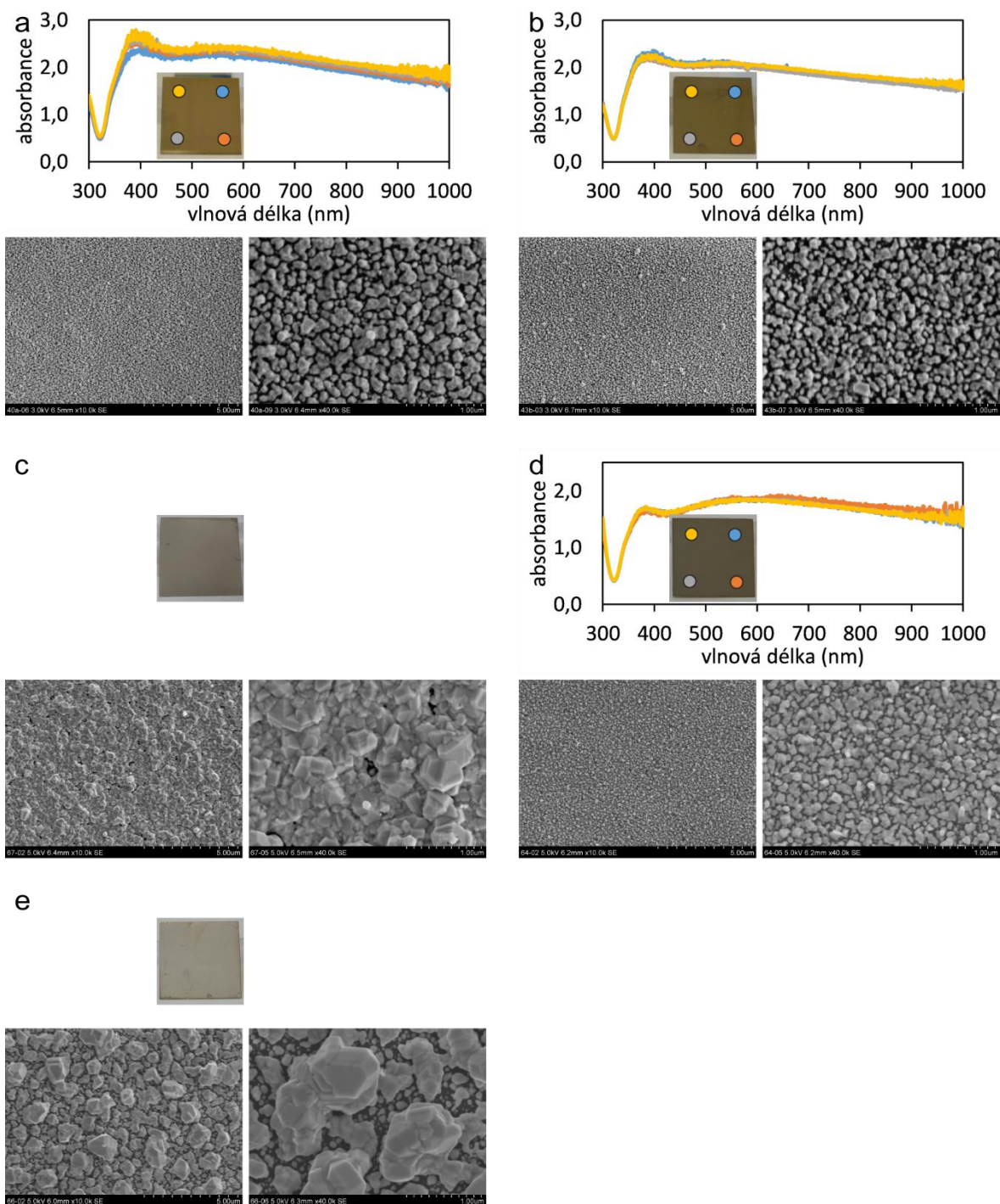
V první fázi byly studovány možnosti přípravy vrstev ve skleněné kádince, kde byly jako redukční činidla použity etylenglykol (Sigma–Aldrich, p.a.) a glycerol (Sigma–Aldrich, p.a.). Navíc byla v případě použití etylenglykolu studována možnost stabilizace a modifikace vrstev nanočástic stříbra pomocí PVP. Při testech prováděných ve skleněné reakční nádobě bylo, na základě předchozích experimentů, redukováno 5 ml dusičnanu stříbrného pomocí 2,5 ml redukčního činidla za přidavku 1,5 ml roztoku amoniaku (Sigma–Aldrich, 28–30 %). Přídavek destilované vody do reakční směsi tedy činil 16 ml, resp. 15,5 ml v případě testování přidavku PVP. Jako první systém byla zvolena redukce dusičnanu stříbrného etylenglykolem právě v přítomnosti PVP. Existenci nanočástic stříbra naznačovala ihned po přípravě nazlátlá barva deponovaných sklíček (obrázek 26a). Relevantně ověřena pak byla pomocí UV–Vis spektrometrie, kde byl nalezen pík v oblasti okolo 400 nm, který je právě pro nanočástice stříbra typický (obrázek 26a). UV–Vis spektra byla navíc pořízena u každého sklíčka na 4 různých místech tak, aby byla ověřena



**Obrázek 25:** Zavěšení sklíčka v kádince pro sonochemickou přípravu nanočásticových vrstev stříbra.

homogenita jednotlivých připravených vrstev. Barevné body na jednotlivých fotografiích korespondují s barvami jednotlivých spekter a představují přibližné místo jejich pořízení. Struktura vzniklých vrstev byla následně zobrazena technikou skenovací elektronové mikroskopie (SEM, SU6600, Hitachi, Japan) a odhalila přítomnost nanočástic stříbra o průměrné velikosti okolo 100 nm. Přítomnost PVP (stejně jako jiných modifikátorů) však může negativně ovlivňovat praktickou použitelnost připravených vrstev, které mohou být tímto modifikátorem (v případě PVP polymerem) pasivovány, nebo mohou, při použití v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii (SERS) způsobovat vznik redundantních signálů, což se i v rámci testů projevilo (obrázek 28a).

Z toho důvodu byly provedeny experimenty, při kterých byl přídavek PVP vynechán. Všechny ostatní parametry a koncentrace pak zůstaly na stejných hodnotách. Po vynechání PVP došlo k přípravě velmi podobných vrstev (jako v případě použití PVP) sestavených z mírně menších nanočástic s průměrnou velikostí okolo 80 nm (obrázek 26b). Dobrá homogenita připravených vrstev je pak patrná jak z pořízených UV–Vis spekter, tak ze samotných TEM snímků. Použití etylenglykolu by však v praxi nemuselo být zcela vhodné z důvodu jeho v literatuře popsání chronické toxicity a teratogenity<sup>250,251</sup>. Zbytky etylenglykolu navíc v připravených vrstvách stříbra, stejně jako PVP, ovlivňují SERS měření a způsobují vznik nadbytečných signálů. Z výše zmíněných důvodů byl jako alternativní redukční činidlo vybrán pro životní prostředí nezávadný glycerol, který je navíc běžně používán v medicíně či farmacii<sup>252</sup>. Jak je vidět na obrázku 26c, použití



**Obrázek 26:** UV-Vis spektra, digitální fotografie a SEM snímky vrstev nanočástic stříbra připravených ve skleněné kádince, redukováných etylenglykolem v přítomnosti PVP (a), etylenglykolem bez přítomnosti PVP (b) a glycerolem bez přítomnosti PVP (c) a v polypropylenové kádince, redukováných etylenglykolem (d) a glycerolem (e). Barevné tečky na digitálních fotografiích zobrazují přibližné místo pořízení UV-Vis spektra, se kterými barevně korespondují.

glycerolu též umožňuje přípravu stříbrných vrstev. Dále se ukázalo, že je při použití glycerolu možno dosáhnout mnohem vyšší výtěžnosti depozice částic na skleněném povrchu. Toto pozorování bylo ověřeno také užitím atomové absorpční spektrometrie (AAS, ContrAA 300, Analytic Jena AG, Germany). Zatímco v případě použití etylenglykolu s přísadkou PVP odpovídalo množství deponovaného stříbra na jednom sklíčku hodnotě 0,75 mg a bez použití PVP hodnotě 0,86 mg, v případě použití glycerolu se zvýšilo množství deponovaného stříbra na jednom sklíčku až na 12 mg (tabulka 6). Popsaná mnohem efektivnější depozice však znemožňuje prosvícení vrstvy UV–Vis spektrometrem, a proto nebylo touto technikou možno ověřit existenci nanočástic stříbra. Nanočásticová povaha vrstvy byla tedy opět ověřena technikou skenovací elektronové mikroskopie, která ukázala, že jsou vrstvy poměrně polydisperzní a nacházejí se v nich částice o velikosti v rozmezí 100–400 nm (obrázek 26c).

Všechny tři popsané postupy přípravy vrstev nanočástic stříbra se však vyznačují výraznou spotřebou dusičnanu stříbrného, zatímco je jeho pouze velmi malá část transformována do vrstev nanočástic. Jedním z důvodů je významné usazování stříbra během sonikace na stěnách skleněné kádinky. Proto bylo pro zvýšení účinnosti depozice nanočástic stříbra na krycí sklíčko přistoupeno ke změně reakční nádoby a skleněná kádinka byla nahrazena kádinkou z polypropylenu. Výměna materiálu kádinky umožnila pětinasobné snížení přísadky dusičnanu stříbrného, došlo tedy ke snížení finální koncentrace dusičnanu stříbrného z  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  na  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Společně s přísadkou dusičnanu stříbrného

**Tabulka 6:** Množství stříbra deponovaného v jednotlivých vrstvách stanovené technikou atomové absorpční spektrometrie.

redukční činidlo / modifikátor / nádoba	množství stříbra (mg)	účinnost depozice (%)
etylenglykol / PVP / skleněná kádinka	0,75	0,56
etylenglykol / × / skleněná kádinka	0,86	0,64
glycerol / × / skleněná kádinka	12,0	8,92
etylenglykol / × / polypropylenová kádinka	0,87	3,23
glycerol / × / polypropylenová kádinka	5,61	20,86
maltóza / × / polypropylenová kádinka	1,01	3,75
laktóza / × / polypropylenová kádinka	1,29	4,81
glukóza / × / polypropylenová kádinka	3,67	13,66

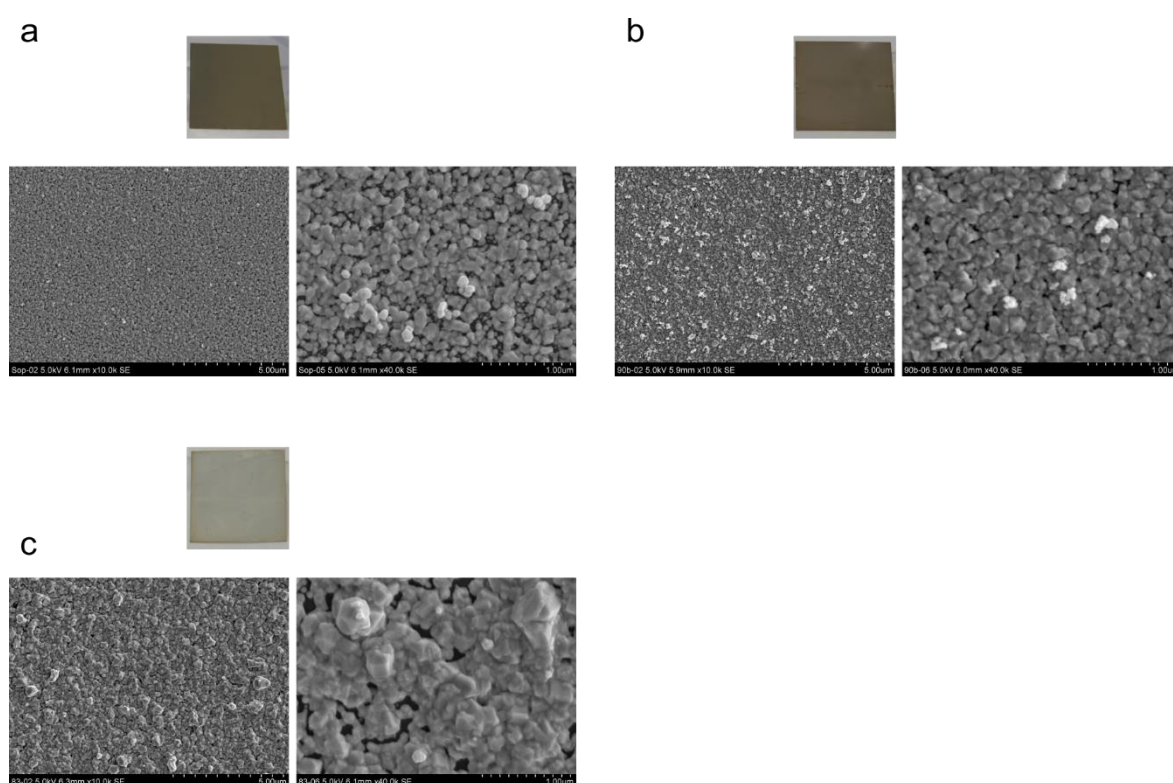


byl snížen i přídavek etylenglykolu, nebo glycerolu z 2,5 ml na 1 ml a množství amoniaku (1:9) bylo zredukováno na 0,3 ml. Po přípravě byla sklíčka s deponovanou vrstvou stříbra opět podrobena charakterizaci s využitím UV-Vis a SEM. Již pohledem na fotografie (obrázek 26c) je zřejmé, že změna reakční nádoby při snížené koncentraci reakčních látek umožňuje tvorbu vrstev stříbra s podobnou kvalitou, jaké bylo dosaženo v předchozích pokusech. V případě použití etylenglykolu byla vrstva dostatečně transmisní, takže bylo možno pořídit UV-Vis spektra, která díky píku v oblasti okolo 400 nm prokázala existenci nanočásticové povahy stříbra. Ta byla následně potvrzena skenovací elektronovou mikroskopií, jež odhalila vrstvu složenou z částic o průměrné velikosti 100 nm. V případě použití glycerolu jako redukční látky došlo k tvorbě podstatně mohutnějších vrstev, které již nebylo možné UV-Vis spektroskopii charakterizovat. Vyšší účinnost depozice byla opět potvrzena i atomovou absorpční spektroskopii, která ukázala, že množství stříbra tvořícího vrstvu na podložním sklíčku dosahovalo hodnoty 5,61 g, což odpovídá cca 20 % stříbra v reakčním systému (tabulka 6). Jedná se tedy z pohledu efektivity o vůbec nejefektivnější ze studovaných postupů. Také barva vzniklých vrstev přešla ze zlatavé po stříbrošedou, což naznačuje, že se vrstva již skládala z větších částic, případně krystalů. To následně potvrdily i snímky ze skenovací elektronové mikroskopie (obrázek 26d), na kterých je patrné, že jsou vrstvy vyskládány z dvou frakcí částic. Jednu tvoří částice o velikosti okolo 100 nm, druhá je pak reprezentována krystaly dosahujícími velikosti až 1  $\mu\text{m}$ .

Ukázalo se tedy, že modifikace procesu přípravy vrstev spočívající ve změně reakční nádoby společně se snížením koncentrace reakčních složek také umožňuje přípravu vrstev. Zároveň dochází k výraznému zvýšení efektivity depozice nanočástic stříbra na povrch krycího sklíčka. Bohužel se ukázalo, že všechny výše popsané metody přípravy vyžadují precizní práci a jsou extrémně náchylné k okolním vlivům, jako jsou koncentrace reakčních komponent, teplota, kvalita destilované vody apod. Z toho důvodu bylo velmi obtížné zaručit z hlediska fyzikálně chemických vlastností dostatečnou reprodukovatelnost.

Z důvodu zvýšení reprodukovatelnosti bylo tedy nutno hledat alternativní varianty sonochemické přípravy vrstev nanočástic stříbra. Jako možná alternativa byla vybrána kombinace sonochemického přístupu s klasickým Tollensovým procesem založeným na redukcí diamminstříbrného komplexu sacharidy s redukčními vlastnostmi<sup>253</sup>. Pro testování byly vybrány tři redukující sacharidy: maltóza (Sigma–Aldrich, p.a.), laktóza (Sigma–Aldrich, p.a.) a glukóza (Sigma–Aldrich, p.a.), které se liší nejen svou strukturou, ale především svým redox potenciálem. Na základě předchozích experimentů byl

do plastové kádinky po zavěšení umytých krycích sklíček přidán 1 ml dusičnanu stříbrného o koncentraci  $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  společně s 22,7 ml destilované vody a 1 ml roztoku redukujícího sacharidu o koncentraci  $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Po zahájení sonikace bylo do systému přidáno 0,3 ml roztoku amoniaku (1:9). Výsledné koncentrace byly tedy  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro dusičnan stříbrný,  $0,01 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro redukující sacharid a  $0,018 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  pro amoniak. Při použití všech třech redukujících sacharidů docházelo bez problémů ke vzniku vrstev s více či méně výrazným žlutým nádechem, které dávaly tušit jejich nanočásticovou povahu (obrázek 27). Podobně, jako při použití glycerolu v předchozích experimentech, se ukázalo, že také vznikají příliš mohutné vrstvy, které není možné prosvítit dostupným UV-Vis spektrometrem, a proto bylo nutno při charakterizaci přistoupit rovnou ke skenovací elektronové mikroskopii. SEM snímky potvrdily, že při použití všech vybraných sacharidů dochází k tvorbě vrstev poskládaných z různě velkých nanočástic. V případě použití maltózy docházelo k tvorbě nejmenších částic, a to konkrétně částic o průměrné velikosti okolo 100 nm (obrázek 27a). V případě redukce laktózou vznikaly vrstvy poskládané z částic o průměrné velikosti 150–180 nm (obrázek 27b) a v případě



**Obrázek 27:** Digitální fotografie a SEM snímky vrstev nanočástic stříbra připravených sonochemicky v polypropylenové kádince, redukováných maltózou (a), laktózou (b) a glukózou (c).

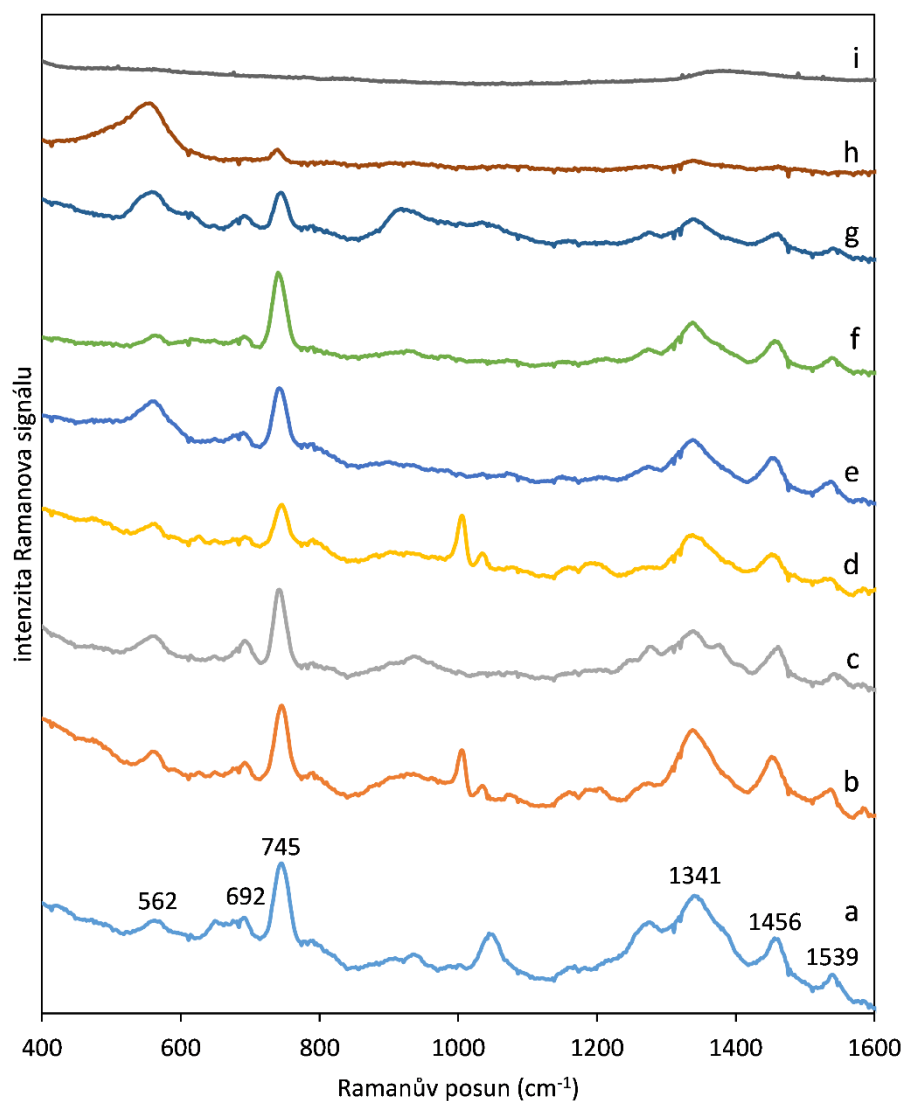
glukózy docházelo k tvorbě a depozici částic s průměrnou velikostí od 200 do 250 nm (obrázek 27c). Větší částice tvořící vrstvu v případě použití glukózy se zároveň projeví i v makroskopickém měřítku, kdy došlo ke změně barvy ze zlatavé do stříbrošedé s lehkým žlutým nádechem. Ukázalo se, že použití redukujících sacharidů je v porovnání s polyoly mnohem výhodnější, a to především pro svou mnohem menší závislost na okolních vlivech, díky níž je možno připravovat vrstvy s dostatečnou reprodukovatelností.

V porovnání s metodikami zmíněnými v kapitole 2.1.2 se jedná o spolehlivou metodu přípravy velmi kvalitních vrstev nanočástic stříbra na skleněném povrchu. Popsaná metoda je zároveň velmi rychlá a samotná tvorba nanočástic a jejich depozice na skleněný povrch prostřednictvím kombinace sonikace a chemické redukce trvá pouze jednotky minut. V porovnání s běžně používanými technikami není navíc sonochemická metoda, především při použití redukujících sacharidů, zdaleka tak náchylná na nečistoty na povrchu substrátu (skla) a nevyžaduje speciální povrchové ošetření či aktivaci, ale stačí pouhé očištění a odmaštění povrchu běžným saponátem.

### **3.3.1 Použití nanovrstev Ag jako SERS substrát**

Vrstvy nanočástic stříbra na skleněných krycích sklíčkách připravené sonochemickou cestou byly následně otestovány jako substráty pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii s laserem o excitační vlnové délce 785 nm (iRaman Plus, BWTEK Inc., USA). Při použití dané vlnové délky je možné zabránit většině fluorescence pozadí u biologických vzorků, díky čemuž se s výhodou používá pro jejich analýzu. Jako modelový analyt byl vybrán adenin (Sigma-Aldrich, 99 %) o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Pro kvantifikaci využitelnosti jednotlivých vrstev byl pro každý vzorek vypočten tzv. faktor povrchového zesílení Ramanova signálu (SERS enhancement factor), který značí poměr hodnoty Ramanova signálu roztoku adeninu o použité koncentraci ( $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) naneseného na studované vrstvě stříbra k hodnotě Ramanova signálu adeninu o koncentraci  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  naneseného na čistém skle (bez přítomnosti stříbra). I když je pro vyhodnocení důležité celé Ramanovo spektrum, lze pro popis účinnosti jednotlivých vrstev provést zjednodušení a faktor povrchového zesílení je možno počítat pouze z nejvýraznějšího píku reprezentujícího adenin, který se nachází v oblasti okolo  $738 \text{ cm}^{-1}$ . Samotné měření probíhalo vždy okamžitě po nanesení kapky adeninu na stříbrnou vrstvu, což je důležité pro samotné praktické využití substrátu.

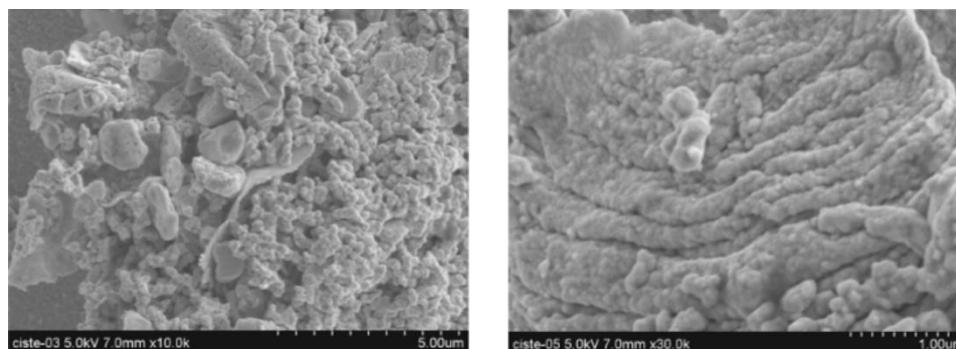
SERS měření potvrdilo očekávaný jev, kdy různě připravené vrstvy nanočástic stříbra vykazují rozdílné hodnoty zesílení Ramanova signálu. Nejlepší výsledky (největší zesílení) byly pozorovány na vrstvách stříbra připravených redukcí etylenglykolem (obrázek 28a) a maltózou (obrázek 28f). Konkrétně tyto vrstvy vykazovaly faktor povrchového zesílení přibližně  $5 \cdot 10^5$ . V obou případech se vrstva skládala z nanočástic o velikosti okolo 100 nm.



**Obrázek 28:** SERS spektra adeninu o koncentraci  $1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  na vrstvách nanočástic stříbra, připravených ve skleněné kádince redukcí etylenglykolem za přítomnosti PVP (a), etylenglykolem bez přítomnosti PVP (b), glycerolem (c) a připravených v polypropylenové kádince redukcí etylenglykolem (d), glycerolem (e), maltózou (f), laktózou (g), glukózou (h), a na vrstvách nanočástic připravených chemickou depozicí (i).

Vrstva připravená za použití etylenglykolu byla však připravena ve skleněné kádince, tedy za vyšší koncentrace stříbra. Při použití vrstvy připravené redukcí etylenglykolem, ovšem v plastové kádince, a tedy za nižších koncentrací srovnatelných s maltózovým postupem, však došlo k výraznému snížení zesílení (obrázek 28d). Navíc se ukázalo, že v případě použití vrstev redukovaných maltózou v oblasti  $900\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$  nebyl pozorován ve spektru jakýkoliv dodatečný pík, zatímco v případě použití vrstev redukovaných etylenglykolem se v oblasti  $1000\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$  objevovaly píky pocházející právě ze zbytků etylenglykolu (obrázek 28b,d). Tyto reziduální píky byly ještě v případě stabilizovaných vrstev dodatečně ovlivněny stabilizátorem polyvinylpyrrolidonem (obrázek 28a). V případě použití ostatních vrstev již nebylo dosahováno tak vysokých hodnot faktoru povrchového zesílení. Bylo tedy možno vysledovat paralelu mezi faktorem zesílení a velikostí částic ve vrstvě, konkrétně účinnost jednotlivých vrstev klesala s rostoucí velikostí částic. Nejnižší účinnost byla pozorována v případě vrstev redukovaných glukózou, které byly poskládány z částic o velikosti  $200\text{--}250\text{ nm}$ . Popsaná závislost nebyla patrná v případě použití glycerolu jako redukčního činidla. V tomto případě obsahovaly připravené vrstvy částice o velikosti až  $400\text{ nm}$  (v případě přípravy ve skleněné kádince), nebo dokonce  $1000\text{ nm}$  (v případě přípravy v plastové kádince). Na druhou stranu tyto vrstvy obsahovaly také frakci malých částic o velikostech okolo  $100\text{ nm}$ , které byly nejspíš zodpovědné za vyšší faktor zesílení, než by byl očekáván.

Protože všechny popsané vrstvy vykazovaly alespoň minimální zesílení Ramanova signálu, mohla by vzniknout představa, že lze pro účely SERS použít jakoukoliv stříbrnou vrstvu. Proto byla pro srovnání otestována vrstva připravená chemickou cestou, konkrétně klasickým Tollensovým procesem (obrázek 29)<sup>254</sup>. Tento kontrolní vzorek byl podroben stejnému stanovení s negativními výsledky, jak je patrné z příslušného spektra



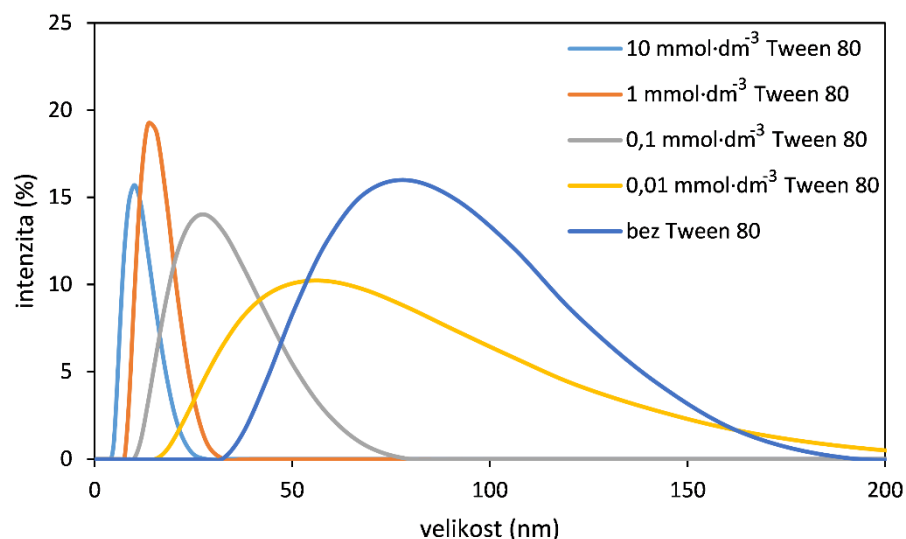
**Obrázek 29:** SEM snímky vrstev stříbra připravených chemickou depozicí<sup>254</sup>.

(obrázek 28i). Je tedy zřejmé, že pro přípravu vrstev nanočástic stříbra použitelných jako SERS substráty je velmi výhodné použít právě sonochemický přístup. Především metoda využívající maltózy jako redukující látky se ukázala být velmi vhodnou pro svou schopnost generovat velký faktor zesílení Ramanova signálu společně s reprodukovatelností přípravy, a v neposlední řadě použitím netoxických látek.

### 3.4 Příprava zlatých nanočástic

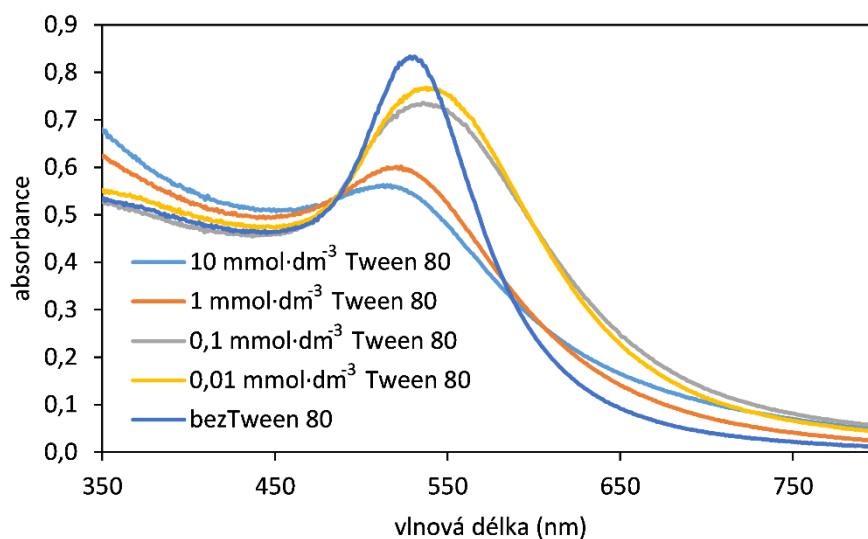
Metodami přípravy nanočástic zlata s různou velikostí se zabývala zatím nepublikovaná studie. Nanočástice zlata byly připravovány redukcí trihydrátu kyseliny tetrachlorozlatité (Merck Millipore, p.a.) maltózou (Sigma-Aldrich, p.a.), tedy sacharidem se slabými redukčními účinky. Redukce byla prováděna za standardních laboratorních podmínek. Velikost výsledných nanočástic zlata byla řízena přidavkem neionické povrchově aktivní látky Tween 80 – polyoxyetylen-sorbitanmonooleát (Sigma-Aldrich, p.a.) o různých koncentracích. Pro srovnání byly připraveny i nanočástice zlata bez přítomnosti povrchově aktivní látky. Konkrétně bylo 5 ml roztoku trihydrátu kyseliny tetrachlorozlatité o koncentraci  $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  zředěno 10 ml roztoku Tween 80 o koncentraci  $0,025\text{-}25 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , nebo 10 ml destilované vody. Výsledná koncentrace povrchově aktivní látky v disperzi tedy nabývala hodnot  $0 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Roztok byl ve 25ml kádince umístěn na magnetickou míchačku, kde byl intenzivně míchán. Redukce byla následně započata přidavkem 10 ml roztoku vzniklého smícháním 5 ml maltózy s 5 ml hydroxidu sodného, oba o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Vznik nanočástic zlata byl doprovázen změnou barvy ze světle žluté (roztok zlatitých iontů) na tmavě červenou nebo fialovou, v závislosti na koncentraci Tween 80.

30 minut po přidavku redukčního činidla, kdy již byla redukce zlatitých iontů a s tím spojená tvorba nanočástic ukončena, byly odebrány vzorky pro charakterizaci technikami UV-Vis spektroskopie, dynamického rozptylu světla a transmisní elektronové mikroskopie. Výsledky DLS měření (obrázek 30) ukázaly, že se v systému v závislosti na koncentraci Tween 80 nacházely nanočástice v rozmezí velikostí 10–80 nm. Konkrétně bylo ukázáno, že se se zvyšující koncentrací Tween 80 významně zmenšuje velikost vznikajících částic zlata.



**Obrázek 30:** Distribuce velikostí nanočástic zlata připravených v přítomnosti Tween 80 o různé koncentraci a bez Tween 80 pořízená prostřednictvím dynamického rozptylu světla (DLS).

Zmíněná závislost velikosti vznikajících nanočástic zlata na koncentraci Tween 80 byla kvalitativně potvrzena pořízením UV-Vis spekter jednotlivých disperzí, které byly pro tyto účely 5× zředěny (obrázek 31). Absorpční maximum spojené s existencí povrchového plasmonu na kovových nanočásticích se, kromě případu nemodifikovaného systému



**Obrázek 31:** UV-Vis spektra 5× zředěných disperzí nanočástic zlata připravených v přítomnosti různých koncentrací Tween 80.

se zvyšující koncentrací Tween 80, znatelně posouvalo k nižším vlnovým délkám, což značí zmenšující se průměr zlatých nanočástic<sup>236</sup>. Maximum nacházející se v 538 nm pro 80nm nanočástice připravené v přítomnosti  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Tween 80, se tak posunulo až na hodnotu 515 nm pro 10nm nanočástice připravené v přítomnosti Tween 80 o koncentraci  $10 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Popsaná změna optických vlastností spojená se změnou velikosti nanočástic zlata se navíc projevovala i změnou barvy koloidních disperzí (obrázek 32).

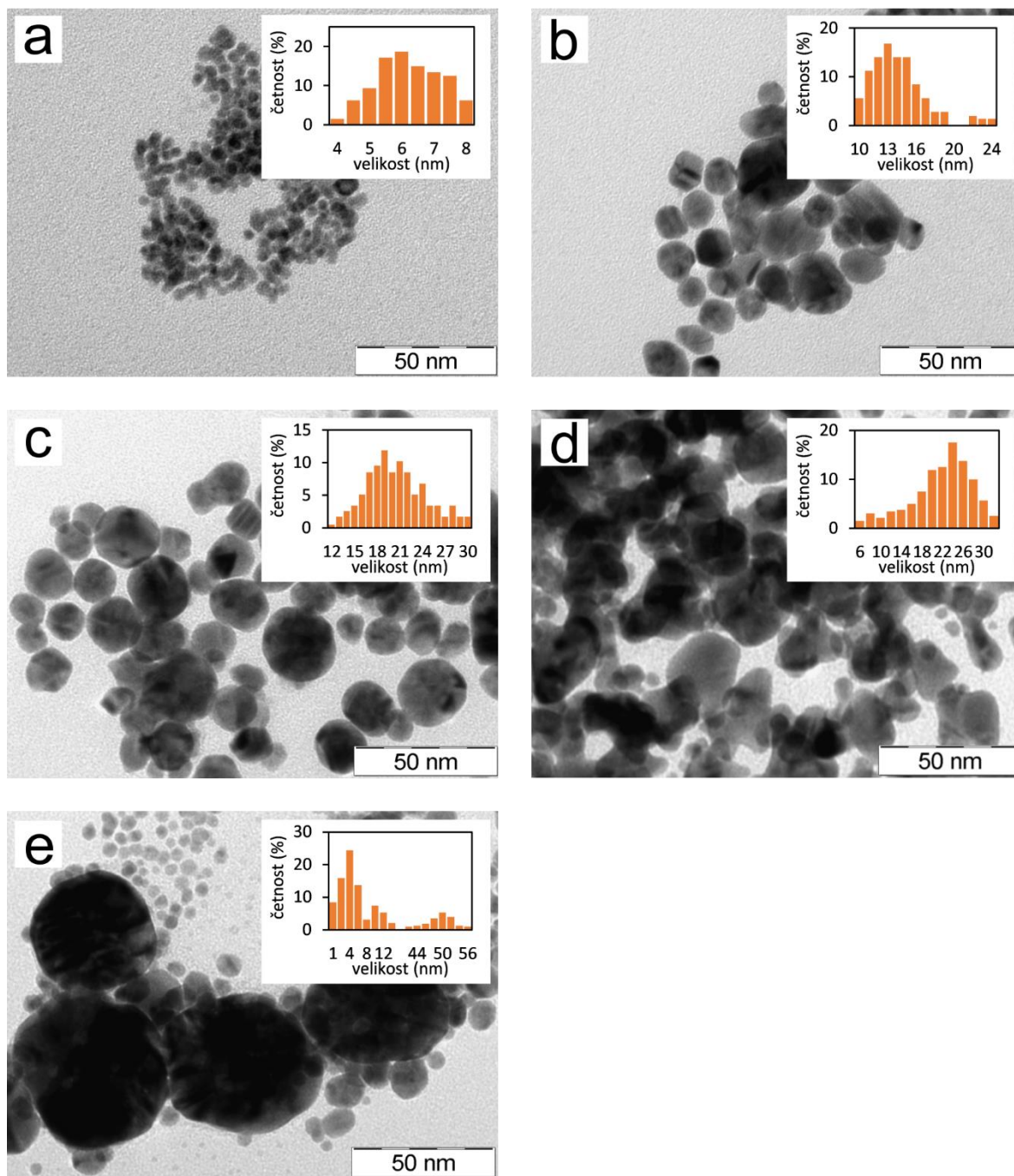
Skutečná velikost připravených nanočástic zlata byla ověřena metodou transmisní elektronové mikroskopie (obrázek 33). TEM snímky odhalily, že v nemodifikovaném systému docházelo k agregaci částic, a dokonce k jejich spojování v nové větší celky, což přirozeně ovlivňovalo výsledky DLS měření a zdánlivě zvětšovalo průměrnou velikost částic v disperzi. Shlukování částic bylo možno pozorovat i v případě disperzí modifikovaných dvěma nejnižšími koncentracemi Tween 80, tedy výslednými koncentracemi  $0,01$  a  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tento fenomén byl pozorovatelný i ve výsledcích DLS měření, kdy se zvyšující se koncentrací Tween 80 docházelo k výraznému zúžení křivky představující distribuci částic v systému. V případě nemodifikovaného systému bylo možno pozorovat existenci několika různě velkých frakcí nanočástic (multimodální rozdělení s dominantním zastoupením částic menších jak 4 nm). Díky tomu bylo také možno vysvětlit polohu maxima UV-Vis spektra nemodifikovaného systému, které se nacházelo v nižších vlnových délkách, než by jinak odpovídalo průměrné velikosti



**Obrázek 32:** Digitální fotografie  $5\times$  zředěných disperzí nanočástic zlata připravených v přítomnosti Tween 80 o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (a),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (b),  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (c),  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (d) a bez přítomnosti Tween 80 (e).



částic naměřené prostřednictvím DLS. Velmi malé částice nacházející se v systému přirozeně posouvaly polohu absorpčního maxima ke kratším vlnovým délkám v porovnání se systémy modifikovanými dvěma nejnižšími koncentracemi Tween 80, které zdaleka tak malé částice neobsahovaly.



**Obrázek 33:** Snímky a velikostní distribuce nanočástic zlata připravených v přítomnosti Tween 80 o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (a),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (b),  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (c),  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (d) a bez přítomnosti Tween 80 (e).

Na základě velikostní distribuce byla, stejně jako v kapitole 3.1, vypočtena průměrná velikost a polydisperzita. TEM snímky společně s obrazovou analýzou jednoznačně potvrdily pozorovanou závislost velikosti vznikajících nanočástic na koncentraci Tween 80 v disperzi (tabulka 7). V případě nanočástic zlata připravených bez přítomnosti Tween 80 docházelo z důvodu multimodálního rozdělení k významné chybě při určování jedné průměrné velikosti a hodnoty polydisperzity. Pro každou ze třech velikostních frakcí byly proto vypočteny samostatné charakteristiky. Kromě řízení velikosti vznikajících nanočástic odhalily TEM snímky ještě další závislost, a to výrazné snížení polydisperzity se zvyšující se koncentrací Tween 80. Číselně se polydisperzita připravených koloidních systémů s přídavkem Tween 80 snížila z hodnoty 0,073 na 0,026 (tabulka 7).

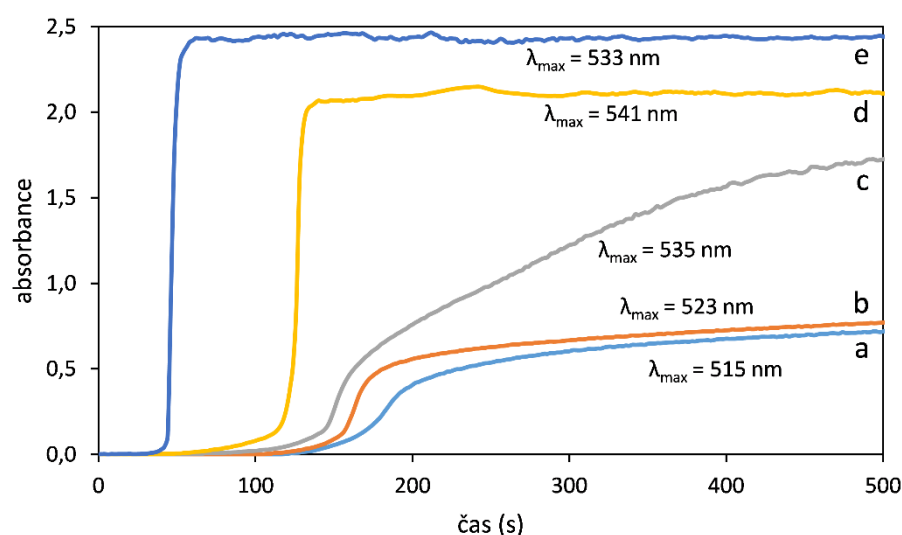
Závislost velikosti a polydisperzity na koncentraci Tween 80 souvisela pravděpodobně s interakcí mezi Tween 80 a zlatými nanočásticemi, která pocházela především z interakce zlata s –OH a =O skupinami<sup>255</sup>. Vyšší koncentrace Tween 80 umožňovala jeho interakci s větším počtem zlatých zárodečných jader, která vznikají v průběhu procesu redukce. Povrch těchto zárodků tak byl s největší pravděpodobností blokován naadsorbovanými molekulami Tween 80, a tím došlo ke zpomalování jejich dalšího růstu. Katalytická redukce zlatitých iontů probíhající na povrchu již vzniklých nanočástic byla tedy v tomto případě zpomalována právě přítomností vrstvy povrchově aktivní látky, a díky tomu se i v tomto stadiu reakce mohl dále uplatnit pomalejší homogenní mechanismus vzniku nové

**Tabulka 7:** Průměrná velikost, její směrodatná odchylka a polydisperzita nanočástic zlata připravených v přítomnosti různých koncentrací Tween 80 a poločas reakce platný pro redukci zlatitých iontů na kovové nanočástice.

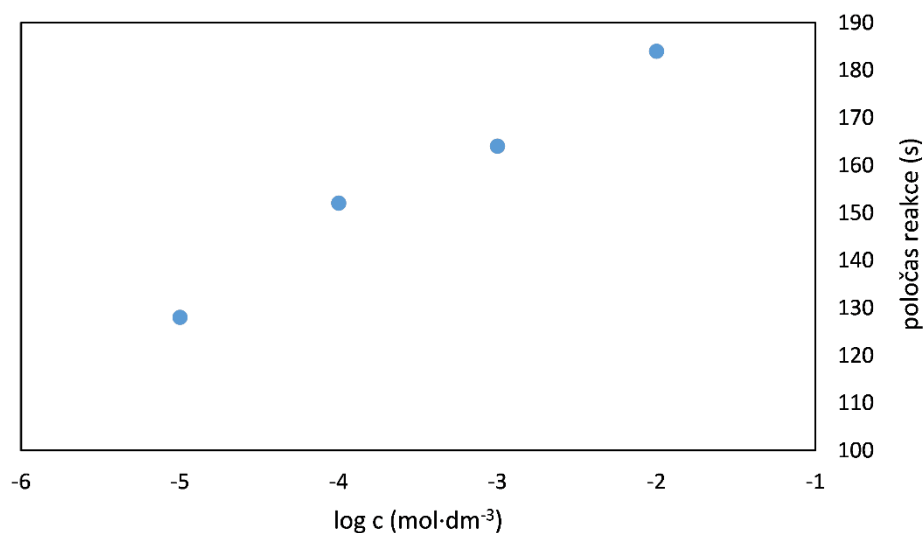
<b>koncentrace Tween 80</b> <b>(mmol·dm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Velikost</b> <b>(nm)</b>	<b>směrodatná</b> <b>odchylka</b>	<b>polydisperzita</b>	<b>poločas</b> <b>reakce</b> <b>(s)</b>
<b>10</b>	6,2	1,00	0,026	184
<b>1</b>	14,1	2,93	0,043	164
<b>0,1</b>	20,0	4,35	0,047	152
<b>0,01</b>	21,8	5,91	0,073	128
<b>0</b> <b>(unimodální rozdělení)</b>	13,4	17,7	---	48
<b>0</b> <b>(bimodální rozdělení)</b>	5,1/49,4	3,48 / 3,50	0,458 / 0,01	48
<b>0</b> <b>(trimodální rozdělení)</b>	3,5 / 10,7 / 49,4	1,71 / 1,86 / 3,50	0,236 / 0,030 / 0,005	48

fáze, kterým vznikala nová zárodečná centra i během růstu již existujících. Díky tomu docházelo ve výsledku ke vzniku většího počtu menších nanočástic. Interakce Tween 80 se zárodky zlatých nanočástic se mimo jiné projevila také zpomalováním rychlosti redukce v případě zvyšování koncentrace modifikátoru, což bylo reflektováno prodloužením doby potřebné ke změně barvy reakčního systému spojené se vznikem výsledných nanočástic. Zpomalení reakce bylo, kromě přímého vizuálního sledování, monitorováno sledováním nárůstu povrchového plasmonu pomocí UV-Vis spektrometrie (obrázek 34).

Jak je patrné, redukce probíhala ve dvou fázích. V první docházelo redukcí zlatitých iontů k pomalému vzniku zárodečných center, což se projevilo mírným vzrůstem absorpčního maxima (v případě nemodifikovaného systému byla tato fáze téměř neznatelná). Vznik zárodečných center byl v druhé fázi následován rychlým vzrůstem absorpčního maxima spojeným s jejich růstem do rozměru nanočástic. Rozdíl mezi rychlostí první a druhé fáze procesu redukce se se zvyšující koncentrací Tween 80 v systému zmenšoval, prakticky až stíral. V případě nemodifikovaných nanočástic, a částečně i v případě nanočástic modifikovaných nejnižší koncentrací Tween 80 ( $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), nebyl povrch zárodků nasycen molekulami Tween 80, a proto docházelo rovnou k druhé fázi, tedy k růstu zlatých nanočástic až do jejich konečného rozměru. Na druhou stranu v případě dvou nejvyšších koncentrací Tween 80 byl povrch vzniklých zárodečných center natolik nasycen



**Obrázek 34:** Vývoj absorpčního maxima v průběhu přípravy nanočástic zlata v přítomnosti Tween 80 o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (a),  $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (b),  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (c),  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (d) a bez přítomnosti Tween 80 (e).



**Obrázek 35:** Poločas reakce redukce zlatitých iontů na zlaté nanočástice v přítomnosti různých koncentrací Tween 80.

molekulami Tween 80, že byl jejich následný růst velmi výrazně zpomalen. Částečnému nasycení povrchu v případě střední koncentrace Tween 80 ( $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) pak odpovídá přechodný stav mezi dvěma výše popsány situacemi. To podporuje představu výše zmíněného mechanismu, kdy docházelo k blokování povrchu rostoucích zárodečných center a důležitou pozici z hlediska reakční rychlosti zaujímal i vznik nových zárodečných center. Celková rychlost redukce v přítomnosti různých koncentrací Tween 80 byla pro přehlednost vyjádřena prostřednictvím poločasu reakce (tabulka 7, obrázek 35).

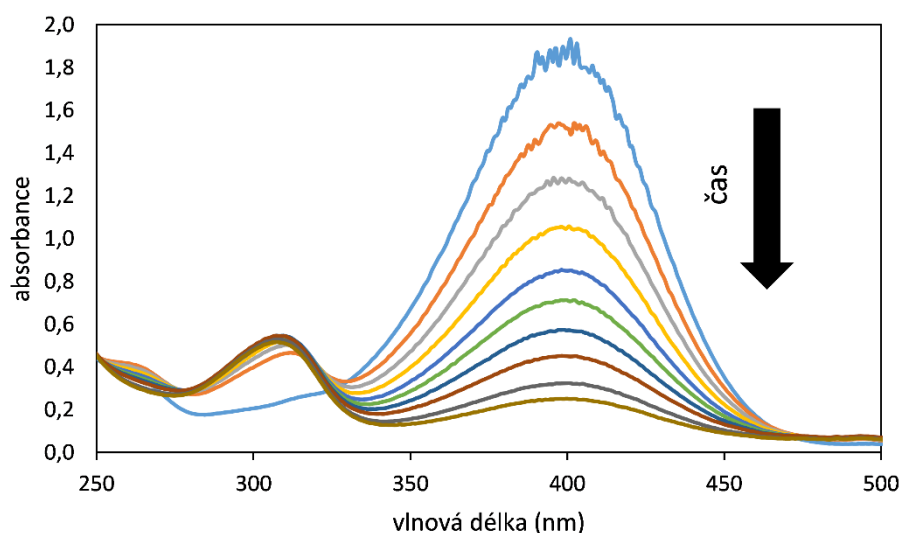
Popsaný mechanismus tak vedl k opačným výsledkům v porovnání s těmi pozorovanými v případě přípravy nanočástic stříbra, kde bylo zpomalení rychlosti redukce způsobeno vznikem koordinačních vazeb mezi použitými modifikátory a stříbrnými ionty. Tato interakce znevýhodňovala homogenní mechanismus redukce, a tím docházelo ke vzniku menšího počtu větších částic<sup>105,229</sup>, což je přesně opačný případ než při popsané přípravě zlatých nanočástic.

### 3.4.1 Katalytická aktivita zlatých nanočástic

Katalytická aktivita připravených nanočástic zlata s různou velikostí byla, stejně jako v případě nanočástic stříbra v kapitole 3.2.1, testována na modelové reakci redukce 4-nitrofenolu na 4-aminofenol. Redukce byla prováděna účinkem tetrahydridoboritanu

sodného v alkalickém prostředí za standardních laboratorních podmínek. Pro samotné testování byly do křemenné kyvety odměřeny 2 ml roztoku 4-nitrofenolu o koncentraci  $1,5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Následně bylo přidáno 0,47 ml destilované vody a 0,03 ml koloidní disperze nanočástic zlata. Vzniklá směs byla protřepána a kinetický experiment byl zahájen přidavkem 0,5 ml čerstvě připraveného roztoku tetrahydridoboritanu sodného o koncentraci  $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Ihned po přidavku byla nově vzniklá disperze důkladně protřepána, vložena do UV-Vis spektrometru a bylo zahájeno zaznamenávání dat. Pro všechny zkoumané vzorky byl kinetický experiment z důvodu potvrzení reprodukovatelnosti  $3 \times$  zopakován. Ve všech případech vyznačovaly kinetické křivky stejné charakteristiky (především tvar) a lišily se pouze sklonem reprezentujícím rychlost úbytku 4-nitrofenolu z reakční směsi. Lze proto uvést typické kinetické měření (obrázek 36) bez nutnosti vkládání spekter pro všechny použité nanočástice.

Heterogenně katalyzovaným reakcím jsou obvykle popisovány dva základní kinetické modely lišící se v popisu adsorpce reagujících molekul na povrch katalyzátoru. Jedná se o modely Langmuir-Hinshelwoodův a Eley-Ridealův. Podle Langmuir-Hinshelwoodova modelu dochází k reakci dvou molekul pouze v případě, že jsou obě adsorbovány vedle sebe na aktivním místě katalyzátoru<sup>256</sup>. Naproti tomu v případě popisu katalyzované reakce podle Eley-Ridealova modelu dochází k adsorpci pouze jedné ze dvou reagujících



**Obrázek 36:** UV-Vis spektra 4-nitrofenolu zaznamenaná každých 120 s v průběhu redukce katalyzované nanočásticemi zlata připravenými v přítomnosti Tween 80 o koncentraci  $0,01 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

molekul, druhá molekula k první přistupuje z roztoku a k přenosu elektronu není vyžadována její adsorpce na kovovém povrchu<sup>256</sup>. Jak je popsáno v kapitole 3.2.1, kinetickou rovnicí pro reakci podle Langmuir-Hinshelwooda lze vyjádřit jako:

**Rovnice 6:**

$$v = \frac{kK_A K_B C_A C_B}{(1 + K_B C_B)^2} S^2$$

Případně po nahrazení všech konstant (včetně koncentrace redukční látky  $C_B$  použité ve velkém nadbytku) za  $k_{app(L-H)}$  je možno upravit rovnici na kinetickou rovnici prvního řádu:

**Rovnice 7:**

$$v = k_{app(L-H)} C_A$$

V případě Eley-Ridealova modelu je myšlenka a následné odvození velmi podobné. Prakticky jediným rozdílem je adsorpce pouze jednoho z reaktantů, druhý do reakce přistupuje přímo z roztoku. Díky tomu lze daný model popsat rovnicí 8.

**Rovnice 8:**

$$v = \frac{kK_A C_A C_B}{1 + K_A C_A} S$$

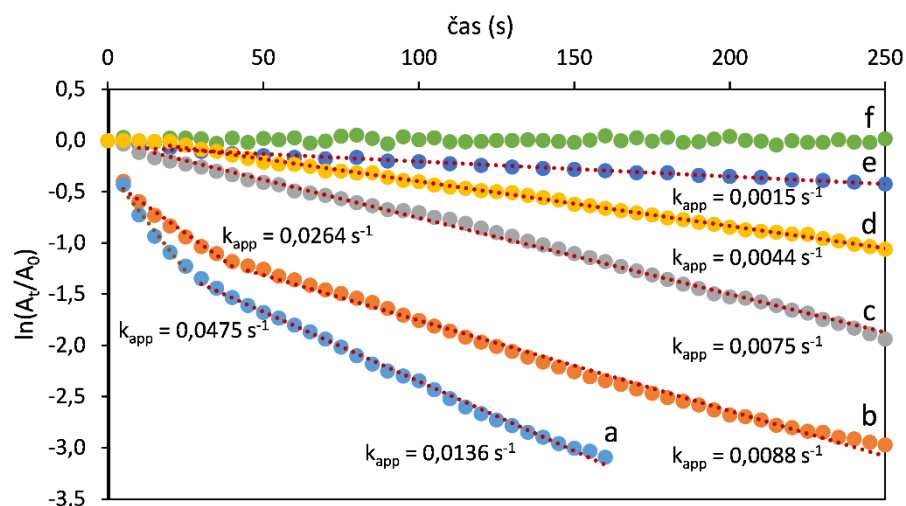
Opět lze výše popsanou substitucí docílit vyjádření odpovídajícímu kinetické rovnici prvního řádu:

**Rovnice 9:**

$$v = k_{app(E-R)} C_A$$

Je tedy zřejmé, že v případě obou popsaných mechanismů je možné vyhodnotit reakční rychlost redukce 4-nitrofenolu jako závislost změny absorbance při vlnové délce 400 nm (typický absorpční pík pro 4-nitrofenol) na čase (obrázek 37). Zdánlivou rychlostní konstantu lze tedy vyjádřit rovnicí  $\ln(A/A_0) = -k_{app} t$ <sup>244</sup>.

Z obrázku 37 je patrné, že se zmenšující se velikostí zlatých nanočástic docházelo ke zvyšování reakční rychlosti katalyzované reakce. Situace se navíc komplikovala v případě



**Obrázek 37:** Kinetické křivky redukce 4-nitrofenolu katalyzované nanočásticemi zlata připravenými v přítomnosti Tween 80 o koncentraci 10 mmol·dm<sup>-3</sup> (a), 1 mmol·dm<sup>-3</sup> (b), 0,1 mmol·dm<sup>-3</sup> (c), 0,01 mmol·dm<sup>-3</sup> (d) a bez přítomnosti Tween 80 (e) a křivka reprezentující nekatalyzovaný systém (f).

použití velmi malých nanočástic (nanočástice připravené při dvou nejvyšších koncentracích Tween 80), kdy docházelo po rychlém začátku k výraznému zpomalení reakce (tabulka 8). To bylo s největší pravděpodobností způsobeno nasycením aktivního povrchu nanočástic produktem reakce – 4-aminofenolem, který se dostatečně rychle nedesorboval. Inhibice reakce jejími produkty představuje jednu z typických komplikací heterogenní katalýzy. V případě studované reakce je způsobena větší afinitou 4-aminofenolu ke zlatu, než je afinita 4-nitrofenolu. Rozdílná míra afinity je způsobena různým způsobem adsorpce daných molekul na zlatém povrchu. Zatímco funkční –NH<sub>2</sub> skupina 4-aminofenolu působí jako Lewisova báze, pro zlato je svým charakterem typická Lewisova kyselina, a tak dochází k silné interakci a adsorpci. Na druhou stranu planární 4-nitrofenol interaguje s paralelně orientovaným zlatým povrchem prostřednictvím slabých Van der Waalsových interakcí způsobených konjugovaným systémem delokalizovaných  $\pi$ -elektronů aromatického kruhu<sup>257</sup>.

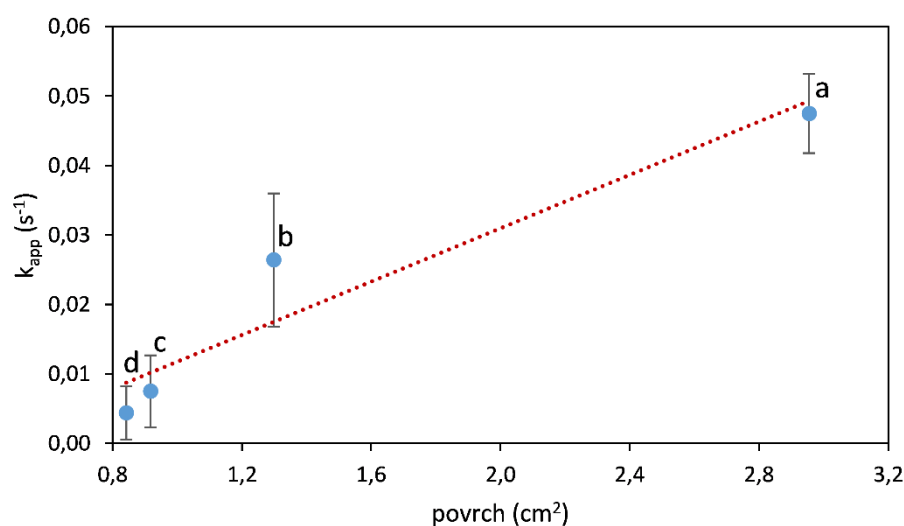
Zatímco v případě použití větších nanočástic stříbra nenabývala katalytická redukce takové

**Tabulka 8:** Zdánlivé rychlostní konstanty redukce 4-nitrofenolu katalyzované různě velkými nanočásticemi zlata.

velikost (nm)	celkový povrch (cm <sup>2</sup> )	k <sub>app</sub> (s <sup>-1</sup> )
21,8	0,84	0,0044
20,0	0,92	0,0075
14,1	1,30	*0,0264 / #0,0088
6,2	2,96	*0,0475 / #0,0136

\* úvodní část kinetické křivky, # následující část kinetické křivky

rychlosti, jako jsou desorpční a difusní děje spojené s produkty reakce, v případě velmi malých nanočástic převyšovala rychlost reakce rychlost těchto dějů. Proto byly právě desorpce a difuze rychlost určujícími ději, které se projevily po nasycení katalytického povrchu těchto malých částic produkty reakce. Právě z toho důvodu byly pro vyhodnocení reakční rychlosti katalyzované reakce na zlatých nanočásticích použity rychlostní konstanty získané z prvních částí křivek. Vzhledem k hlavnímu rozdílu mezi mechanismy dle Langmuir-Hinshelwooda a Eley-Rideala, jímž je rozdílná závislost reakční rychlosti na katalytickém povrchu, bylo možno rozhodnout, jakým způsobem katalyzovaná reakce probíhala. Zatímco v případě Langmuir-Hinshelwoodova mechanismu heterogenní



**Obrázek 38:** Závislost reakčních rychlostí redukce 4-nitrofenolu tetrahydridoboritanem sodným na velikosti celkového povrchu nanočástic zlata připravených v přítomnosti Tween 80 o koncentraci 10 mmol·dm<sup>-3</sup> (a), 1 mmol·dm<sup>-3</sup> (b), 0,1 mmol·dm<sup>-3</sup> (c), 0,01 mmol·dm<sup>-3</sup> (d).



katalýzy nabývá regresní křivka závislosti rychlosti reakce na celkovém povrchu katalyzátoru kvadratické formy, v případě Eley-Ridealova mechanismu je závislost lineární. Vynesením zdánlivé rychlostní konstanty vůči celkovému povrchu katalyzátoru (obrázek 38) bylo zjištěno, že se jedná o lineární závislost, a tedy že katalýza probíhá v tomto případě mechanismem dle Eley-Ridealova.

## 4 ZÁVĚR

Dizertační práce shrnuje výsledky výzkumné činnosti v oblasti vývoje nových metod přípravy nanočástic stříbra a bromidu stříbrného, vrstev nanočástic stříbra a nanočástic zlata. Připravené materiály byly následně testovány pro svůj široký aplikační potenciál v oblastech biologické aktivity, v chemické analýze a v heterogenní katalýze.

Nanočástice stříbra byly připravovány prostřednictvím v literatuře méně popsané dvoukrokové syntézy, při níž byly v prvním kroku připraveny částice bromidu stříbrného, jež byly následně redukovány tetrahydridoboritanem sodným na vlastní nanočástice kovového stříbra. Volbou vhodných modifikátorů z oblasti syntetických polymerních látek (PEG, PVP a PVA), přírodních polymerních látek (HEC, kasein a želatina) a povrchově aktivních látek (SDS, Tween 80) bylo dosaženo přípravy disperzí koloidních částic bromidu stříbrného s různou velikostí. Ty byly následně redukovány na stabilní koloidní disperze různě velkých nanočástic stříbra o průměrné velikosti částic od 7 do 20 nm. V případě použití polymerů PEG, PVP, PVA a HEC byl navíc pomocí cyklické voltametrie detailněji popsán jejich vliv na přípravu jak částic bromidu stříbrného, tak jeho redukce na nanočástice kovového stříbra. Aplikační potenciál částic bromidu stříbrného a nanočástic kovového stříbra připravených v přítomnosti syntetických polymerů a HEC byl následně ověřen pomocí biologického testování, v němž se popsané materiály ukázaly jako vysoce aktivní a dosahovaly velmi dobrých výsledků, dokumentovaných nízkými hodnotami MIC. Rozdíl v různém účinku bromidu stříbrného a kovového stříbra vůči rozdílným bakteriálním kmenům byl vysvětlen na základě různého mechanismu jejich působení na bakteriální stěnu. Kovové nanočástice stříbra připravené v přítomnosti kaseinu, želatiny a povrchově aktivních látek byly otestovány i jako heterogenní katalyzátory, kde prokázaly vysokou účinnost pro redukci 4–nitrofenolu, která bez přítomnosti nanočástic v daném experimentálním uspořádání neprobíhá. Zároveň byl prokázán jednoznačný vztah mezi rychlostí katalyzované reakce a velikostí nanočástic, tedy velikostí aktivního povrchu, splňující Langmuir-Hinshelwoodův mechanismus heterogenně katalyzované reakce.

V případě vrstev nanočástic stříbra byla navržena zcela nová metodika jejich přípravy využívající sonochemických procesů, která umožňuje jejich časově nenáročnou a reprodukovatelnou přípravu. Bylo navrženo několik možných postupů variujících použití různých redukčních látek i různé experimentální uspořádání s cílem zvýšit

reprodukovatelnost připravovaných vrstev a jejich aplikační potenciál v povrchem zesílené Ramanově spektroskopii. Navrženy byly postupy umožňující výrazné snížení koncentrací reakčních komponent, především stříbra, a zároveň použití redukujících sacharidů jakožto látek šetrných k životnímu prostředí. Testování aplikačního potenciálu vrstev nanočástic stříbra jako substrátu pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii prokázalo jednoznačnou použitelnost všech připravovaných vrstev. S přihlédnutím k minimalizaci vlivu způsobu přípravy na existenci zbytkových signálů v měřených Ramanových spektrech se pak jako nejlepší projevíly vrstvy připravované za redukujících účinků maltózy, jejichž použitím bylo možno dosáhnout faktoru zesílení Ramanova signálu o hodnotě až  $5 \cdot 10^5$ .

V oblasti přípravy nanočástic zlata byla navržena technika umožňující řízenou přípravu různě velkých nanočástic zlata redukcí zlatité soli maltózou prostou změnou koncentrace povrchově aktivní látky Tween 80 v reakční směsi. Díky interakci zlatitých iontů s molekulami Tween 80 bylo možno připravit v závislosti na jeho koncentraci nanočástice zlata v rozpětí velikostí 6–22 nm. Navíc byl ukázán významný vliv Tween 80 na polydisperzitu vznikajících nanočástic. Připravené nanočástice pak byly otestovány, podobně jako nanočástice stříbra, jako heterogenní katalyzátory. I v případě takto připravených nanočástic zlata byla prokázána jejich vysoká katalytická aktivita, která významně rostla se zmenšující se průměrnou velikostí použitých nanočástic. Analýzou experimentálních dat se navíc podařilo ukázat, že v případě zlatých nanočástic probíhá katalyzovaná redukce 4-nitrofenolu podle méně obvyklého Eley-Ridealova modelu, který není v odborné literatuře tak často zmiňován jako mechanismus dle Langmuir-Hinshelwooda.

## 5 SUMMARY

Dissertation summarizes the results of research activities focused on development of new preparation methods of silver and silver bromide nanoparticles, silver nanoparticle layers and gold nanoparticles. All of prepared nanomaterials were tested for their broad application potential in the fields of biological activity, chemical analysis and heterogeneous catalysis.

Silver nanoparticles were prepared using nearly undescribed two step synthesis based on preparation of silver bromide particles in the first step and their subsequent reduction to silver nanoparticles. Suitable choice of synthetic polymers (PEG, PVP and PVA), natural polymers (HEC, casein and gelatin) and surfactants (SDS and Tween 80) as modifiers enabled preparation of silver bromide colloid particles with different sizes. There were subsequently reduced to different sized silver nanoparticles with average diameters from 7 up to 20 nm. In the case of modification by polymers PEG, PVP, PVA and HEC there was used cyclic voltammetry to more detailed description of polymer influence on preparation of silver bromide particles and their reduction to silver particles. Application potential of silver bromide and silver nanoparticles modified by synthetic polymers and HEC was validated in terms of biological testing. Described materials showed great biological activity proved by low concentration of MIC. Differences in mode of interaction between silver bromide and silver nanoparticles against various bacterial strains was then cleared up by different mechanism of interaction of individual materials with bacterial wall. Silver nanoparticles modified by casein, gelatin and surfactants were validated in terms of their catalytic activity. They proved their high efficiency in the reduction of 4-nitrophenol, which does not proceed without catalysis in discussed experimental setup.

In the case of preparation of silver layers, it was developed new technique based on sonochemical processes. Described technique enabled time-saving and reproducible preparation of silver layers. It was proposed several possible modifications based on use of various reducing agents and experimental conditions to increase reproducibility of preparation and their application possibilities in Surface enhanced Raman spectroscopy. New methods enabled significant reduction of reaction components concentration. Moreover there were used reducing saccharides instead of common used ethylene glycol and therefore the preparation was much environmental friendly. Validating of prepared

silver layers as SERS substrates proved their potential applicability. Taking account into the environmental friendliness and minimize the impact of preparation way to the redundant signals in Raman spectra, the best layers were those prepared by maltose reduction. The enhancement factor of the Raman signal reached in this case approximately  $5 \cdot 10^5$ .

In the field of gold nanoparticles preparation, it was developed technique of preparation various sized gold nanoparticles caused by varying the concentrations of surfactant Tween 80 in the reaction mixture. The interaction of gold species with Tween 80 molecules allowed preparation of gold nanoparticles with diameters from 6 up to 22 nm. Moreover, Tween 80 does not affected only size of prepared gold nanoparticles but also significantly reduces their polydispersity. Prepared gold nanoparticles were validated in terms of their catalytic activity in 4-nitrophenol reduction reaction. It was shown that catalytic activity grew with decreasing particle size. Analysis of experimental data moreover revealed that catalytic reduction of 4-nitrophenol in the presence of used gold nanoparticles does not proceed according to well know Langmuir-Hinshelwood mechanism, but according to Eley-Rideal mechanism.

## 6 REFERENCE

1. Tran, Q. H., Nguyen, V. Q. & Le, A.-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **4**, 33001 (2013).
2. Chen, X. & Schluesener, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* **176**, 1–12 (2008).
3. Ageev, L. A., Miloslavskii, V. K. & Makovetskiĭ, E. D. Coloring of silica glass with silver nanoparticles. *Opt. Spectrosc.* **102**, 442–448 (2007).
4. Khan, M. A. M. *et al.* Structural and spectroscopic studies of thin film of silver nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 10607–10612 (2011).
5. Jiang, H., Manolache, S., Wong, A. C. L. & Denes, F. S. Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics. *J. Appl. Polym. Sci.* **93**, 1411–1422 (2004).
6. Guillemot, G. *et al.* Plasma deposition of silver nanoparticles onto stainless steel for the prevention of fungal biofilms: A case study on *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasma Process. Polym.* **5**, 228–238 (2008).
7. Ashayer-Soltani, R., Hunt, C. & Thomas, O. Fabrication of highly conductive stretchable textile with silver nanoparticles. *Text. Res. J.* **86**, 1041–1049 (2015).
8. Dubas, S. T., Kumlangdudsana, P. & Potiyaraj, P. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **289**, 105–109 (2006).
9. Song, J., Birbach, N. L. & Hinstroza, J. P. Deposition of silver nanoparticles on cellulosic fibers via stabilization of carboxymethyl groups. *Cellulose* **19**, 411–424 (2012).
10. Cao, G. & Wang, Y. *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications.* (2011).
11. Creighton, J. A., Blatchford, C. G. & Albrecht, M. G. Plasma resonance enhancement of Raman scattering by pyridine adsorbed on silver or gold sol particles of size comparable to the excitation wavelength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* **75**, 790 (1979).
12. Yonezawa, T., Onoue, S. Y. & Kimizuka, N. Preparation of highly positively charged silver nanoballs and their stability. *Langmuir* **16**, 5218–5220 (2000).
13. Abkhalimov, E. V., Parsaev, A. A. & Ershov, B. G. Preparation of silver nanoparticles in aqueous solutions in the presence of carbonate ions as stabilizers. *Colloid J.* **73**, 1–5 (2011).
14. Tai, Y.-L. & Yang, Z.-G. Facile and Scalable Preparation of Solid Silver Nanoparticles (<10 nm) for Flexible Electronics. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 17104–17111 (2015).
15. Köhler, J. M., Abahmane, L., Wagner, J., Albert, J. & Mayer, G. Preparation of metal nanoparticles with varied composition for catalytical applications in microreactors. *Chem. Eng. Sci.* **63**, 5048–5055 (2008).

16. Liu, J., Li, X. & Zeng, X. Silver nanoparticles prepared by chemical reduction-protection method, and their application in electrically conductive silver nanopaste. *J. Alloys Compd.* **494**, 84–87 (2010).
17. Rodríguez-Delgado, M. G. *et al.* Preparation and characterization of acrylic acid/itaconic acid hydrogel coatings containing silver nanoparticles. *J. Appl. Polym. Sci.* **130**, 2713–2721 (2013).
18. Tan, Y., Li, Y. & Zhu, D. Preparation of silver nanocrystals in the presence of aniline. *J. Colloid Interface Sci.* **258**, 244–251 (2003).
19. Gulrajani, M. L., Gupta, D., Periyasamy, S. & Muthu, S. G. Preparation and application of silver nanoparticles on silk for imparting antimicrobial properties. *J. Appl. Polym. Sci.* **108**, 614–623 (2008).
20. Leopold, N. & Lendl, B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723–5727 (2003).
21. Stiuftuc, R. *et al.* SERS-active silver colloids prepared by reduction of silver nitrate with short-chain polyethylene glycol. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 47 (2013).
22. Stewart, A., Murray, S. & Bell, S. E. J. Simple preparation of positively charged silver nanoparticles for detection of anions by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Analyst* **140**, 2988–2994 (2015).
23. Lee, P. C. & Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.* **86**, 3391–3395 (1982).
24. LaPlante, S., Halaciuga, I. & Goia, D. V. Preparation of counterion stabilized concentrated silver sols. *J. Colloid Interface Sci.* **359**, 121–125 (2011).
25. Sondi, I., Goia, D. V., Matijević, E., Matijević, E. & Salopek-Sondi, B. Preparation of highly concentrated stable dispersions of uniform silver nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **260**, 75–81 (2003).
26. Guo, G. *et al.* Preparation and dispersive mechanism of highly dispersive ultrafine silver powder. *Appl. Surf. Sci.* **256**, 6683–6687 (2010).
27. Nersisyan, H. H., Lee, J. H., Son, H. T., Won, C. W. & Maeng, D. Y. A new and effective chemical reduction method for preparation of nanosized silver powder and colloid dispersion. *Mater. Res. Bull.* **38**, 949–956 (2003).
28. Jitianu, A., Kim, M.-S., Andreescu, D. & Goia, D. V. A Simple Preparative Route to Highly Stable Dispersions of Uniform Silver Nanoparticles. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **9**, 1891–1896 (2009).
29. Suber, L., Sondi, I., Matijević, E. & Goia, D. V. Preparation and the mechanisms of formation of silver particles of different morphologies in homogeneous solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **288**, 489–495 (2005).
30. Soukupova, J., Kvitek, L., Panacek, A., Nevecna, T. & Zboril, R. Comprehensive study on surfactant role on silver nanoparticles (NPs) prepared via modified Tollens process. *Mater. Chem. Phys.* **111**, 77–81 (2008).
31. Sangsuk, S. Preparation of high surface area silver powder via Tollens process under sonication. *Mater. Lett.* **64**, 775–777 (2010).

32. Khan, Z., Hussain, J. I., Kumar, S. & Hashmi, A. A. Silver nanoplates and nanowires by a simple chemical reduction method. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **86**, 87–92 (2011).
33. Prucek, R., Panacek, A., Soukupova, J., Novotny, R. & Kvitek, L. Reproducible synthesis of silver colloidal particles tailored for application in near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Mater. Chem.* **21**, 6416–6420 (2011).
34. Khaydarov, R. a., Khaydarov, R. R., Gapurova, O., Estrin, Y. & Scheper, T. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 1193–1200 (2008).
35. Rahman, M. M., Bahadar Khan, S., Jamal, A., Faisal, M. & Asiri, A. M. Fabrication of highly sensitive acetone sensor based on sonochemically prepared as-grown Ag<sub>2</sub>O nanostructures. *Chem. Eng. J.* **192**, 122–128 (2012).
36. Chih, Y.-K. & Yang, M.-C. Simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using silver/silver sulfide modified carbon nanotube electrodes. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **45**, 833–839 (2014).
37. Yeo, S. Y., Tan, W. L., Abu Bakar, M. & Ismail, J. Silver sulfide/poly(3-hydroxybutyrate) nanocomposites: Thermal stability and kinetic analysis of thermal degradation. *Polym. Degrad. Stab.* **95**, 1299–1304 (2010).
38. Yang, L. *et al.* The synthesis and crystallization mechanism of protein-conjugated silver sulfide nanowires with hierarchical structure. *Mater. Lett.* **64**, 1598–1600 (2010).
39. Chen, D., Qiao, X. & Chen, J. Morphology-controlled synthesis of silver nanostructures via a solvothermal method. *J. Mater. Sci. Mater. Electron.* **22**, 1335–1339 (2011).
40. Moritz, E. D., Sahyun, M. R. V. & Thorgaard, S. N. Nanosilver from nano-AgBr: synthesis, surface chemistry, and nonlinear optical properties. in *Integrated Optoelectronic Devices 2004* (eds. Huffaker, D. L. & Bhattacharya, P.) 125–132 (International Society for Optics and Photonics, 2004). doi:10.1117/12.524177
41. Liang, H. *et al.* Synthesis and characterization of AgI nanoparticles in  $\beta$ -CD/PAN nanofibers by electrospinning method. *Appl. Surf. Sci.* **270**, 617–620 (2013).
42. Yang, M. & Zhou, K. Synthesis and characterizations of spherical hollow composed of AgI nanoparticle using AgBr as the precursor. *Appl. Surf. Sci.* **257**, 2503–2507 (2011).
43. Abbasi, A. R., Morsali, A., Reza, A. & Ali, A. Synthesis and Characterization of AgBr–Silk Nanocomposite Under Ultrasound Irradiation. *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **20**, 825–832 (2010).
44. Husein, M. M., Rodil, E. & Vera, J. H. A novel method for the preparation of silver chloride nanoparticles starting from their solid powder using microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* **288**, 457–67 (2005).
45. Chiu, C.-K., Choi, Y.-J. & Luo, T.-J. M. Formation of AgCl Cubic Crystals Induced by Shrinkage of Sol–Gel Silica Film. *Cryst. Growth Des.* **12**, 4727–4732 (2012).
46. Sun, C., Chen, P. & Zhou, S. AgCl nanoparticle nanowires fabricated by template method. *Mater. Lett.* **61**, 1645–1648 (2007).



47. Husein, M. M., Rodil, E. & Vera, J. H. J. A novel approach for the preparation of AgBr nanoparticles from their bulk solid precursor using CTAB microemulsions. *Langmuir* **22**, 2264–72 (2006).
48. Ray, M. & Paria, S. Growth Kinetics of Silver Bromide Nanoparticles in Aqueous Nonionic Surfactant Solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **50**, 11601–11607 (2011).
49. Yang, M., Zhao, J. J.-G. & Li, J. J.-J. Synthesis of porous spherical AgBr nanoparticles in the presence of gelatin using AgCl as the precursor. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **295**, 81–84 (2007).
50. Wang, H. *et al.* Polyhedral AgBr microcrystals with an increased percentage of exposed {111} facets as a highly efficient visible-light photocatalyst. *Chemistry* **18**, 4620–6 (2012).
51. Guo, Y., Lee, J. & Maier, J. Preparation and characterization of AgI nanoparticles with controlled size, morphology and crystal structure. *Solid State Ionics* **177**, 2467–2471 (2006).
52. Chen, S., Ida, T. & Kimura, K. Thiol-Derivatized AgI Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Optical Properties. *J. Phys. Chem. B* **102**, 6169–6176 (1998).
53. Hawari, N. L. & Johan, M. R. Synthesis and characterizations of AgI nanoparticles via mechanochemical reaction. *J. Alloys Compd.* **509**, 2001–2006 (2011).
54. Cheng, Y., Yan, M. & Jiang, Z. Electrochemical Behavior and Reduction Mechanism of High Valence Silver Oxide in Alkaline Solution. *Electrochem. Solid-State Lett.* **10**, F5–F8 (2007).
55. Xu, G., Qiao, X., Qiu, X. & Chen, J. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **320**, 222–226 (2008).
56. Spirin, M. G., Brichkin, S. B. & Razumov, V. F. Phenidone Oxidation during Photoinitiated Chemical Reduction of AgBr Nanocrystals in Water Pools of Reverse Micelles. *Colloid J.* **64**, 364–368 (2002).
57. Levlin, M. & Laakso, A. Evaporation of silver thin films on mica. *Appl. Surf. Sci.* **171**, 257–264 (2001).
58. Erdelyi, G. *et al.* Kinetics of evaporation of beaded Ag film on sapphire and on alumina scale. *J. Appl. Phys.* **80**, 1474–1479 (1996).
59. Feder, R., Bundesmann, C., Neumann, H. & Rauschenbach, B. Ion beam sputtering of Ag - Angular and energetic distributions of sputtered and scattered particles. *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms* **316**, 198–204 (2013).
60. Kozono, Y., Komuro, M., Narishige, S., Hanazono, M. & Sugita, Y. Structures and magnetic properties of Fe/Ag multilayer films prepared by sputtering and ultrahigh-vacuum depositions. *J. Appl. Phys.* **63**, 3470–3472 (1988).
61. Shapiro, M. J. *et al.* Chemical vapor deposition of silver films for superconducting wire applications. *J. Alloys Compd.* **187**, 331–349 (1992).
62. Oehr, C. & Suhr, H. Deposition of silver films by plasma-enhanced chemical vapour deposition. *Appl. Phys. A Solids Surfaces* **49**, 691–696 (1989).
63. Lu, S.-Y. & Lin, Y.-Z. Pd-Ag alloy films prepared by metallorganic chemical vapor deposition process. *Thin Solid Films* **376**, 67–72 (2000).

64. Piszczek, P. *et al.* Characterization of silver trimethylacetate complexes with tertiary phosphines as CVD precursors of thin silver films. *Chem. Vap. Depos.* **11**, 53–59 (2005).
65. Samoilenkov, S. *et al.* Low-temperature MOCVD of conducting, micrometer-thick, silver films. *Chem. Vap. Depos.* **8**, 74–78 (2002).
66. Sheel, D. W., Brook, L. A. & Yates, H. M. Controlled nanostructured silver coated surfaces by atmospheric pressure chemical vapour deposition. *Chem. Vap. Depos.* **14**, 14–24 (2008).
67. Hicks, E. M. *et al.* Plasmonic properties of film over nanowell surfaces fabricated by nanosphere lithography. *J. Phys. Chem. B* **109**, 22351–8 (2005).
68. Meli, M.-V. V. & Lennox, R. B. Surface plasmon resonance of gold nanoparticle arrays partially embedded in quartz substrates. *J. Phys. Chem. C* **111**, 3658–3664 (2007).
69. Stranik, O., McEvoy, H. M., McDonagh, C. & MacCraith, B. D. Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications. *Sensors Actuators B Chem.* **107**, 148–153 (2005).
70. Haes, A. J., Zou, S., Schatz, G. C. & Van Duyne, R. P. Nanoscale Optical Biosensor: Short Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **108**, 6961–6968 (2004).
71. Sung, J., Hicks, E. M., VanDuyne, R. P. & Spears, K. G. Nanoparticle Spectroscopy: Dipole Coupling in Two-Dimensional Arrays of L-Shaped Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **111**, 10368–10376 (2007).
72. Guo, Y.-B., Wang, D.-G., Liu, S.-H. & Zhang, S.-W. Fabrication and tribological properties of polyelectrolyte multilayers containing in situ gold and silver nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **417**, 1–9 (2013).
73. Chapman, R. & Mulvaney, P. Electro-optical shifts in silver nanoparticle films. *Chem. Phys. Lett.* **349**, 358–362 (2001).
74. Michna, A., Adamczyk, Z., Siwek, B. & Oćwieja, M. Silver nanoparticle monolayers on poly(ethylene imine) covered mica produced by colloidal self-assembly. *J. Colloid Interface Sci.* **345**, 187–93 (2010).
75. Taglietti, A. *et al.* Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface. *Biomaterials* **35**, 1779–88 (2014).
76. Zhu, S., Fan, C., Wang, J., He, J. & Liang, E. Self-assembled Ag nanoparticles for surface enhanced Raman scattering. *Opt. Rev.* **20**, 361–366 (2013).
77. Lv, Y. *et al.* Antibiotic glass slide coated with silver nanoparticles and its antimicrobial capabilities. *Polym. Adv. Technol.* **19**, n/a-n/a (2008).
78. Joseph, N. *et al.* Layer-by-layer preparation of polyelectrolyte multilayer membranes for separation. *Polym. Chem.* **5**, 1817–1831 (2014).
79. Barnes, G. & Gentle, I. *Interfacial science: an introduction.* (Oxford University Press, 2011).
80. Dynarowicz-Łątka, P., Dhanabalan, A. & Oliveira, O. N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Adv. Colloid Interface Sci.* **91**, 221–293 (2001).

81. Shin, H., Kim, H., Ha, J., Lim, K.-S. & Lee, M. Langmuir–Blodgett Ag nanoparticle monolayer patterned by pulsed laser-induced selective desorption. *Superlattices Microstruct.* **44**, 657–663 (2008).
82. Takahashi, M., Kobayashi, K. & Tajima, K. Structural characterization and photocatalytic activity of ultrathin TiO<sub>2</sub> films fabricated by Langmuir–Blodgett technique with octadecylamine. *Thin Solid Films* **519**, 8077–8084 (2011).
83. Cea, P., Ballesteros, L. M. & Martín, S. Nanofabrication techniques of highly organized monolayers sandwiched between two electrodes for molecular electronics. *Nanofabrication* **1**, 96–117 (2014).
84. Suslick, K. S. Sonochemistry. *Science* **247**, 1439–45 (1990).
85. Leonelli, C. & Mason, T. J. Microwave and ultrasonic processing: Now a realistic option for industry. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* **49**, 885–900 (2010).
86. Soloviev, M. & Gedanken, A. Coating a stainless steel plate with silver nanoparticles by the sonochemical method. *Ultrason. Sonochem.* **18**, 356–62 (2011).
87. Bhattacharyya, S., Gabashvili, A., Perkas, N. & Gedanken, A. Sonochemical Insertion of Silver Nanoparticles into Two-Dimensional Mesoporous Alumina. *J. Phys. Chem. C* **111**, 11161–11167 (2007).
88. Abramova, A. *et al.* A sonochemical technology for coating of textiles with antibacterial nanoparticles and equipment for its implementation. *Mater. Lett.* **96**, 121–124 (2013).
89. Mersmann, A. *Crystallization Technology Handbook, 2nd ed.* (Marcel Dekker, Inc., 2001).
90. Perkas, N. *et al.* Depositing silver nanoparticles on/in a glass slide by the sonochemical method. *Nanotechnology* **19**, 435604 (2008).
91. Kotlyar, A. *et al.* Coating silver nanoparticles on poly(methyl methacrylate) chips and spheres via ultrasound irradiation. *J. Appl. Polym. Sci.* **104**, 2868–2876 (2007).
92. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
93. Jensen, T. R. *et al.* Nanosphere Lithography: Effect of the External Dielectric Medium on the Surface Plasmon Resonance Spectrum of a Periodic Array of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **103**, 9846–9853 (1999).
94. Balaa, K., Kanso, M., Cuenot, S., Minea, T. & Louarn, G. Experimental realization and numerical simulation of wavelength-modulated fibre optic sensor based on surface plasmon resonance. *Sensors Actuators B Chem.* **126**, 198–203 (2007).
95. Chen, Y., Yu, Y., Li, X., Tan, Z. & Geng, Y. Experimental Comparison of Fiber-Optic Surface Plasmon Resonance Sensors with Multi Metal Layers and Single Silver or Gold Layer. *Plasmonics* **10**, 1801–1808 (2015).
96. Mitsushio, M., Abe, Y. & Higo, M. Sensor properties and surface characterization of silver-deposited SPR optical fibers. *Anal. Sci.* **26**, 949–55 (2010).
97. Haes, A. J. & Van Duyne, R. P. A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10596–10604 (2002).

98. Riboh, J. C., Haes, A. J., McFarland, A. D., Yonzon, C. R. & Van Duyne, R. P. A nanoscale optical biosensor: Real-time immunoassay in physiological buffer enabled by improved nanoparticle adhesion. *J. Phys. Chem. B* **107**, 1772–1780 (2003).
99. Zhao, B. *et al.* Silver microspheres for application as hydrogen peroxide sensor. *Electrochemistry Communications* **11**, 1707–1710 (2009).
100. Liu, S. *et al.* Stable Aqueous Dispersion of Graphene Nanosheets: Noncovalent Functionalization by a Polymeric Reducing Agent and Their Subsequent Decoration with Ag Nanoparticles for Enzymeless Hydrogen Peroxide Detection. *Macromolecules* **43**, 10078–10083 (2010).
101. Wu, S., Zhao, H., Ju, H., Shi, C. & Zhao, J. *Electrodeposition of silver–DNA hybrid nanoparticles for electrochemical sensing of hydrogen peroxide and glucose.* *Electrochemistry Communications* **8**, 1197–1203 (2006).
102. Zhang, Y. *et al.* One-pot green synthesis of Ag nanoparticles-graphene nanocomposites and their applications in SERS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and glucose sensing. *RSC Adv.* **2**, 538–545 (2012).
103. Zhai, H.-J., Sun, D.-W. & Wang, H.-S. Catalytic properties of silica/silver nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 1968–72 (2006).
104. Chaudhari, V. R., Samant, K. M., Ingole, P. P., Hassan, P. A. & Haram, S. K. Catalytic activity and stability of silver supported on multiwalled carbon nanotubes. *Int. J. Nanotechnol.* **8**, 988 (2011).
105. Panacek, A. *et al.* Polyacrylate-Assisted Size Control of Silver Nanoparticles and Their Catalytic Activity. *Chem. Mater.* **26**, 1332–1339 (2014).
106. Pradhan, N., Pal, A. & Pal, T. Silver nanoparticle catalyzed reduction of aromatic nitro compounds. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **196**, 247–257 (2002).
107. Zhang, W. *et al.* Facile, template-free synthesis of silver nanodendrites with high catalytic activity for the reduction of p-nitrophenol. *J. Hazard. Mater.* **217–218**, 36–42 (2012).
108. Praus, P., Turicova, M., Karlikova, M., Kvitek, L. & Dvorsky, R. Nanocomposite of montmorillonite and silver nanoparticles: Characterization and application in catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Mater. Chem. Phys.* **140**, 493–498 (2013).
109. Keith, L. & Telliard, W. ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* **13**, 416–423 (1979).
110. Shiraishi, Y. & Toshima, N. Colloidal silver catalysts for oxidation of ethylene. *J. Mol. Catal. A Chem.* **141**, 187–192 (1999).
111. Yamashita, Y., Aoyama, N., Takezawa, N. & Yoshida, K. Characterization of highly active AgCl/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst for photocatalytic conversion of NO. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 5211–5214 (2000).
112. Sun, L., Zhang, R., Wang, Y. & Chen, W. Plasmonic Ag@AgCl nanotubes fabricated from copper nanowires as high-performance visible light photocatalyst. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 14819–14826 (2014).
113. Chen, D., Yoo, S. H., Huang, Q., Ali, G. & Cho, S. O. Sonochemical synthesis of Ag/AgCl nanocubes and their efficient visible-light-driven photocatalytic performance. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 5192–5200 (2012).

114. Jiang, J., Li, H. & Zhang, L. New insight into daylight photocatalysis of AgBr@Ag: Synergistic effect between semiconductor photocatalysis and plasmonic photocatalysis. *Chem. - A Eur. J.* **18**, 6360–6369 (2012).
115. Kobayashi, B., Ohkita, H., Mizushima, T. & Kakuta, N. Preparation of tabular silver bromide and its photocatalytic performance. *Catal. Commun.* **45**, 21–24 (2014).
116. Kakuta, N., Goto, N., Ohkita, H. & Mizushima, T. Silver bromide as a photocatalyst for hydrogen generation from CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O solution. *J. Phys. Chem. B* **103**, 10–12 (1999).
117. Zhang, J., Li, X., Sun, X. & Li, Y. Surface Enhanced Raman Scattering Effects of Silver Colloids with Different Shapes. *J. Phys. Chem. B* **109**, 12544–12548 (2005).
118. Michaels, A. M., Nirmal, M. & Brus, L. E. Surface Enhanced Raman Spectroscopy of Individual Rhodamine 6G Molecules on Large Ag Nanocrystals. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9932–9939 (1999).
119. Doering, W. E. & Nie, S. Single-Molecule and Single-Nanoparticle SERS: Examining the Roles of Surface Active Sites and Chemical Enhancement. *J. Phys. Chem. B* **106**, 311–317 (2002).
120. Kneipp, K., Wang, Y., Dasari, R. R. & Feld, M. S. Approach to Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Study Using Rhodamine 6G on Colloidal Silver. *Appl. Spectrosc.* **49**, 780–784 (1995).
121. Nie, S. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science (80-. )*. **275**, 1102–1106 (1997).
122. Kneipp, K. *et al.* Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Phys. Rev. Lett.* **78**, 1667–1670 (1997).
123. Emory, S. R., Haskins, W. E. & Nie, S. Direct Observation of Size-Dependent Optical Enhancement in Single Metal Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 8009–8010 (1998).
124. Pucek, R. *et al.* Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CrystEngComm* **13**, 2242 (2011).
125. Pucek, R. *et al.* Reproducible discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation. *Analyst* **137**, 2866–70 (2012).
126. Fargasova, A. *et al.* Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation wavelengths. *RSC Adv.* **5**, 9737–9744 (2015).
127. Van Duyne, R. P., Hulteen, J. C. & Treichel, D. A. Atomic force microscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. I. Ag island films and Ag film over polymer nanosphere surfaces supported on glass. *J. Chem. Phys.* **99**, 2101 (1993).
128. Haes, A. J., Zou, S., Zhao, J., Schatz, G. C. & Van Duyne, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy near molecular resonances. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10905–14 (2006).
129. Suchomel, P. *et al.* Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes. *Ultrason. Sonochem.* **32**, 165–172 (2016).

130. Vongsvivut, J., Robertson, E. G. & McNaughton, D. Surface-enhanced Raman spectroscopic analysis of fonofos pesticide adsorbed on silver and gold nanoparticles. *J. Raman Spectrosc.* **41**, 1137–1148 (2010).
131. Liu, B. *et al.* Shell thickness-dependent Raman enhancement for rapid identification and detection of pesticide residues at fruit peels. *Anal. Chem.* **84**, 255–261 (2012).
132. Gao, R. *et al.* Highly sensitive trace analysis of paraquat using a surface-enhanced Raman scattering microdroplet sensor. *Anal. Chim. Acta* **681**, 87–91 (2010).
133. Carrillo-Carrión, C., Simonet, B. M., Valcárcel, M. & Lendl, B. Determination of pesticides by capillary chromatography and SERS detection using a novel Silver-Quantum dots ‘sponge’ nanocomposite. *J. Chromatogr. A* **1225**, 55–61 (2012).
134. Botti, S., Cantarini, L. & Palucci, A. Surface-enhanced Raman spectroscopy for trace-level detection of explosives. *J. Raman Spectrosc.* **41**, 866–869 (2010).
135. Nuntawong, N. *et al.* Trace detection of perchlorate in industrial-grade emulsion explosive with portable surface-enhanced Raman spectroscopy. *Forensic Sci. Int.* **233**, 174–178 (2013).
136. Kneipp, K. *et al.* Near-infrared surface-enhanced Raman scattering of trinitrotoluene on colloidal gold and silver. *Spectrochim. Acta - Part A* **51**, 2171–2175 (1995).
137. Yang, J. *et al.* Tracking multiplex drugs and their dynamics in living cells using the label-free surface-enhanced raman scattering technique. *Mol. Pharm.* **9**, 842–849 (2012).
138. Shanmukh, S. *et al.* Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate. *Nano Lett.* **6**, 2630–2636 (2006).
139. Yonzon, C. R., Haynes, C. L., Zhang, X., Walsh, J. T. & Van Duyne, R. P. A Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering: Improved Partition Layer, Temporal Stability, Reversibility, and Resistance to Serum Protein Interference. *Anal. Chem.* **76**, 78–85 (2004).
140. Pavel, I. *et al.* Label-free SERS detection of small proteins modified to act as bifunctional linkers. *J. Phys. Chem. C* **112**, 4880–4883 (2008).
141. Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009).
142. Marambio-Jones, C. & Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.* **12**, 1531–1551 (2010).
143. Silver, S. Bacterial silver resistance: Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 341–353 (2003).
144. Nies, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **27**, 313–339 (2003).
145. Smekalova, M. *et al.* Enhanced antibacterial effect of antibiotics in combination with silver nanoparticles against animal pathogens. *Vet. J.* **209**, 174–179 (2016).
146. Panáček, A. *et al.* Strong and Nonspecific Synergistic Antibacterial Efficiency of Antibiotics Combined with Silver Nanoparticles at Very Low Concentrations Showing No Cytotoxic Effect. *Molecules* **21**, 26 (2015).

147. Panáček, A. *et al.* Silver nanoparticles strongly enhance and restore bactericidal activity of inactive antibiotics against multiresistant Enterobacteriaceae. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **142**, 392–399 (2016).
148. Cui, L. *et al.* In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* **85**, 5436–43 (2013).
149. Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. del C. & Rodríguez Padilla, C. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 615–621 (2009).
150. Li, W.-R. *et al.* Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals* **24**, 135–41 (2011).
151. Quinteros, M. A., Cano Aristizábal, V., Dalmasso, P. R., Paraje, M. G. & Páez, P. L. Oxidative stress generation of silver nanoparticles in three bacterial genera and its relationship with the antimicrobial activity. *Toxicol. Vitro.* **36**, 216–223 (2016).
152. Choi, J. E. *et al.* Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. *Aquat. Toxicol.* **100**, 151–159 (2010).
153. Awasthi, K. K. *et al.* Silver nanoparticle induced cytotoxicity, oxidative stress, and DNA damage in CHO cells. *J. Nanoparticle Res.* **15**, 1898 (2013).
154. Morones, JL Elichiguerra, A Camacho, K Holt, JB Kouri, JT Ramirez, M. Y. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–2353 (2005).
155. Castanon, J. I. R. History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poult. Sci.* **86**, 2466–2471 (2007).
156. Kvitek, L. *et al.* Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J. Phys. Chem. C* **112**, 5825–5834 (2008).
157. Rupp, M. E. *et al.* Effect of silver-coated urinary catheters: Efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am. J. Infect. Control* **32**, 445–450 (2004).
158. Samuel, U. & Guggenbichler, J. P. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int. J. Antimicrob. Agents* **23 Suppl 1**, 75–78 (2004).
159. Stevens, K. N. J. *et al.* Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters. *Biomaterials* **32**, 1264–9 (2011).
160. Devasconcellos, P., Bose, S., Beyenal, H., Bandyopadhyay, A. & Zirkle, L. G. Antimicrobial Particulate Silver Coatings on Stainless Steel Implants for Fracture Management. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* **32**, 1112–1120 (2012).
161. Secinti, K. D., Özalp, H., Attar, A. & Sargon, M. F. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J. Clin. Neurosci.* **18**, 391–5 (2011).
162. Coman, C. *et al.* Green synthesis of gold nanoparticles by *Allium sativum* extract and their assessment as SERS substrate. *J. Nanoparticle Res.* **16**, 2158 (2014).
163. Huang, C. W. *et al.* Porous Hollow Gold Nanoparticles for Cancer SERS Imaging. *J. Nano Res.* **10**, 137–148 (2010).
164. Shin, M. H. *et al.* Multiple detection of proteins by SERS-based immunoassay with

- core shell magnetic gold nanoparticles. *Vib. Spectrosc.* **72**, 44–49 (2014).
165. He, S., Liu, D., Wang, Z., Cai, K. & Jiang, X. Utilization of unmodified gold nanoparticles in colorimetric detection. *Sci. China Physics, Mech. Astron.* **54**, 1757-1765 (2011).
  166. Bedford, E. E., Spadavecchia, J., Pradier, C.-M. & Gu, F. X. Surface Plasmon Resonance Biosensors Incorporating Gold Nanoparticles. *Macromol. Biosci.* **12**, 724–739 (2012).
  167. Singh, A. K., Rai, A. K. & Bicanic, D. Controlled Synthesis and Optical Properties of Pure Gold Nanoparticles. *Instrum. Sci. Technol.* **37**, 50–60 (2009).
  168. Huang, C.-J. *et al.* Electrochemically Controlling the Size of Gold Nanoparticles. *J. Electrochem. Soc.* **153**, D193 (2006).
  169. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55 (1951).
  170. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature, Publ. online 01 January 1973; doi10.1038/10.1038/physci241020a0* **241**, 20 (1973).
  171. Li, M.-D., Cheng, T.-L. & Tseng, W.-L. Nonionic surfactant-capped gold nanoparticles for selective enrichment of aminothiols prior to CE with UV absorption detection. *Electrophoresis* **30**, 388–95 (2009).
  172. Shimmin, R. G., Schoch, A. B. & Braun, P. V. Polymer Size and Concentration Effects on the Size of Gold Nanoparticles Capped by Polymeric Thiols. *Langmuir* **20**, 5613–5620 (2004).
  173. Niidome, T., Nakashima, K., Takahashi, H. & Niidome, Y. Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells. *Chem. Commun.* 1978–1979 (2004). doi:10.1039/b406189f
  174. Tajammul Hussain, S., Iqbal, M. & Mazhar, M. Size control synthesis of starch capped-gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **11**, 1383–1391 (2008).
  175. Chen, H., Wang, Y. Y., Dong, S. & Wang, E. One-step preparation and characterization of PDDA-protected gold nanoparticles. *Polymer (Guildf)*. **47**, 763-766 (2006).
  176. Moreno-Álvarez, S. A. S. *et al.* Preparation and bactericide activity of gallic acid stabilized gold nanoparticles. *J. Nanoparticle Res.* **12**, 2741–2746 (2010).
  177. Gao, Z., Su, R., Huang, R., Qi, W. & He, Z. Glucomannan-mediated facile synthesis of gold nanoparticles for catalytic reduction of 4-nitrophenol. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 404 (2014).
  178. Choi, Y. *et al.* Catechin-capped gold nanoparticles: green synthesis, characterization, and catalytic activity toward 4-nitrophenol reduction. *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 103 (2014).
  179. Aswathy Aromal, S. & Philip, D. Facile one-pot synthesis of gold nanoparticles using tannic acid and its application in catalysis. *Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures* **44**, 1692–1696 (2012).
  180. Aswathy Aromal, S. & Philip, D. Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size-dependent catalytic activity. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **97**, 1–5 (2012).



181. Ayaz Ahmed, K. B., Subramanian, S., Sivasubramanian, A., Veerappan, G. & Veerappan, A. Preparation of gold nanoparticles using *Salicornia brachiata* plant extract and evaluation of catalytic and antibacterial activity. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **130**, 54–8 (2014).
182. Briñas, R. P., Hu, M., Qian, L., Lyman, E. S. & Hainfeld, J. F. Gold nanoparticle size controlled by polymeric Au(I) thiolate precursor size. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 975–82 (2008).
183. Ohyama, J., Hitomi, Y., Higuchi, Y. & Tanaka, T. Size Controlled Synthesis of Gold Nanoparticles by Porphyrin with Four Sulfur Atoms. *Top. Catal.* **52**, 852–859 (2009).
184. Muangnapoh, T., Sano, N., Yusa, S.-I., Viriya-empikul, N. & Charinpanitkul, T. Facile strategy for stability control of gold nanoparticles synthesized by aqueous reduction method. *Curr. Appl. Phys.* **10**, 708–714 (2010).
185. Song, J., Kim, D. & Lee, D. Size control in the synthesis of 1-6 nm gold nanoparticles via solvent-controlled nucleation. *Langmuir* **27**, 13854–60 (2011).
186. Jun, H. *et al.* Understanding of the size control of biocompatible gold nanoparticles in millifluidic channels. *Langmuir* **28**, 15966–74 (2012).
187. Akamatsu, K. *et al.* Synthesis of pH-responsive nanocomposite microgels with size-controlled gold nanoparticles from ion-doped, lightly cross-linked poly(vinylpyridine). *Langmuir* **26**, 1254–9 (2010).
188. Chu, H. C., Kuo, C. H. & Huang, M. H. Thermal aqueous solution approach for the synthesis of triangular and hexagonal gold nanoplates with three different size ranges. *Inorg. Chem.* **45**, 808–813 (2006).
189. Hormozi-Nezhad, M. R., Karami, P. & Robotjazi, H. A simple shape-controlled synthesis of gold nanoparticles using nonionic surfactants. *RSC Adv.* **3**, 7726 (2013).
190. Kacanovska, A., Rong, Z., Schmidt, M., Russell, P. S. J. & Vadgama, P. Bio-sensing using recessed gold-filled capillary amperometric electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 1687–94 (2010).
191. Liu, Y. *et al.* Development of gold nanoparticle-sheathed glass capillary nanoelectrodes for sensitive detection of cerebral dopamine. *Biosens. Bioelectron.* **63**, 262–268 (2014).
192. Chenxu, Y. & Irudayaraj, J. Multiplex Biosensor Using Gold Nanorods. *Anal. Chem.* **79**, 572–579 (2006).
193. Nusz, G. J. *et al.* Label-Free Plasmonic Detection of Biomolecular Binding by a Single Gold Nanorod. *Anal. Chem.* **80**, 984–989 (2008).
194. Eum, N. S., Yeom, S. H., Kwon, D. H., Kim, H. R. & Kang, S. W. Enhancement of sensitivity using gold nanorods-Antibody conjugator for detection of *E. coli* O157:H7. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **143**, 784–788 (2010).
195. Hu, W. *et al.* Sensitive detection of multiple mycotoxins by SPRi with gold nanoparticles as signal amplification tags. *J. Colloid Interface Sci.* **431**, 71–6 (2014).
196. Chen, Q. *et al.* Targeted CT/MR dual mode imaging of tumors using multifunctional dendrimer-entrapped gold nanoparticles. *Biomaterials* **34**, 5200–9 (2013).

197. Bian, P., Zhou, J., Liu, Y. & Ma, Z. One-step fabrication of intense red fluorescent gold nanoclusters and their application in cancer cell imaging. *Nanoscale* **5**, 6161–6 (2013).
198. Dujardin, E., Hsin, L.-B., Wang, C. R. C. & Mann, S. DNA-driven self-assembly of gold nanorods. *Chem. Commun.* **12**, 1264–1265 (2001).
199. Reynolds, R. A., Mirkin, C. A. & Letsinger, R. L. Homogeneous, Nanoparticle-Based Quantitative Colorimetric Detection of Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3795–3796 (2000).
200. Guo, Y. *et al.* Label-Free Colorimetric Detection of Cadmium Ions in Rice Samples Using Gold Nanoparticles. *Anal. Chem.* **86**, 8530–8534 (2014).
201. Alvarez-Puebla, R. A. & Liz-Marzán, L. M. SERS-based diagnosis and biodetection. *Small* **6**, 604–610 (2010).
202. Cao, Y. C., Jin, R. & Mirkin, C. A. Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection. *Science (80-. )*. **297**, 1536–1540 (2002).
203. Bonham, A. J., Braun, G., Pavel, I., Moskovits, M. & Reich, N. O. Detection of sequence-specific protein-DNA interactions via surface enhanced resonance Raman scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 14572–14573 (2007).
204. Li, Y., Qi, X., Lei, C., Yue, Q. & Zhang, S. Simultaneous SERS detection and imaging of two biomarkers on the cancer cell surface by self-assembly of branched DNA-gold nanoaggregates. *Chem. Commun. (Camb)*. **50**, 9907–9 (2014).
205. Premasiri, W. R. *et al.* Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of bacteria. *J. Phys. Chem. B* **109**, 312–320 (2005).
206. Du, Y. *et al.* Enhanced light-matter interaction of graphene-gold nanoparticle hybrid films for high-performance SERS detection. *J. Mater. Chem. C* **2**, 4683 (2014).
207. Yue, W., Yang, Y., Wang, Z., Chen, L. & Wang, X. Surface-enhanced Raman scattering on gold nanorod pairs with interconnection bars of different widths. *Sensors Actuators, B Chem.* **171–172**, 734–738 (2012).
208. Kiefer, W., Mazzolini, A. P. & Stoddart, P. R. Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I. *J. Raman Spectrosc.* **38**, 1538–1553 (2007).
209. Frost, M. S., Dempsey, M. J. & Whitehead, D. E. Highly sensitive SERS detection of Pb<sup>2+</sup> ions in aqueous media using citrate functionalised gold nanoparticles. *Sensors Actuators B Chem.* **221**, 1003–1008 (2015).
210. Tang, W., Bruce Chase, D., Sparks, D. L. & Rabolt, J. F. Selective and quantitative detection of trace amounts of mercury(II) Ion (Hg<sup>2+</sup>) and Copper(II) Ion (Cu<sup>2+</sup>) using surface-enhanced raman scattering (SERS). *Appl. Spectrosc.* **69**, 843–849 (2015).
211. Zamarion, V. M., Timm, R. A., Araki, K. & Toma, H. E. Ultrasensitive SERS nanoprobe for hazardous metal ions based on trimercaptotriazine-modified gold nanoparticles. *Inorg. Chem.* **47**, 2934–2936 (2008).
212. Wackerbarth, H. *et al.* Detection of explosives based on surface-enhanced Raman spectroscopy. *Appl. Opt.* **49**, 4362 (2010).

213. Wackerbarth, H., Gundrum, L., Salb, C., Christou, K. & Viöl, W. Challenge of false alarms in nitroaromatic explosive detection – a detection device based on surface-enhanced Raman spectroscopy. *Appl. Opt.* **49**, 4367–4371 (2010).
214. Zapata, F., López-López, M. & García-Ruiz, C. Detection and identification of explosives by surface enhanced Raman scattering. *Appl. Spectrosc. Rev.* **51**, 227–262 (2015).
215. Serge, M., Ru, R., Nikolaev, S. A. & Smirnov, V. V. Selective Hydrogenation of Phenylacetylene on. *Gold Bull.* **42**, 182–189 (2009).
216. Mitsudome, T. *et al.* Gold nanoparticle catalysts for selective hydrogenations. *Green Chem.* **15**, 2636 (2013).
217. Liu, W., Yang, X. & Xie, L. Size-controlled gold nanocolloids on polymer microsphere-stabilizer via interaction between functional groups and gold nanocolloids. *J. Colloid Interface Sci.* **313**, 494–502 (2007).
218. Huang, X., Liao, X. & Shi, B. Synthesis of highly active and reusable supported gold nanoparticles and their catalytic applications to 4-nitrophenol reduction. *Green Chem.* **13**, 2801 (2011).
219. Rahman, Z. *ur et al.* Preparation and characterization of magnetic gold shells using different sizes of gold nanoseeds and their corresponding effects on catalysis. *RSC Adv.* **4**, 5012 (2014).
220. Ide, M. S. & Davis, R. J. The important role of hydroxyl on oxidation catalysis by gold nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **47**, 825–33 (2014).
221. Méndez-Cruz, M., Ramírez-Solís, J. & Zanella, R. CO oxidation on gold nanoparticles supported over titanium oxide nanotubes. *Catal. Today* **166**, 172–179 (2011).
222. Remediakis, I. N., Lopez, N. & Nørskov, J. K. CO oxidation on gold nanoparticles: Theoretical studies. in *Applied Catalysis A: General* **291**, 13–20 (2005).
223. Prati, L. & Martra, G. New gold catalysts for liquid phase oxidation. *Gold Bull.* **32**, 96–101 (1999).
224. John, J. *et al.* Catalytic oxidation of silanes by carbon nanotube-gold nanohybrids. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **50**, 7533–7536 (2011).
225. Xie, T., Schmidt, V., Pippel, E., Senz, S. & Gösele, U. Gold-enhanced low-temperature oxidation of silicon nanowires. *Small* **4**, 64–68 (2008).
226. Jawale, D. V. *et al.* Size effect of gold nanoparticles supported on carbon nanotube as catalysts in selected organic reactions. *Tetrahedron* **70**, 6140–6145 (2014).
227. Kamat, P. V & Meisel, D. Nanoparticles in advanced oxidation processes. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **7**, 282–287 (2002).
228. Malik, R. *et al.* Visible light-driven mesoporous Au-TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> photocatalysts for advanced oxidation process. *Ceram. Int.* **42**, 10892–10901 (2016).
229. Suchomel, P. *et al.* Comparative study of antimicrobial activity of AgBr and Ag nanoparticles (NPs). *PLoS One* **10**, e0119202 (2015).
230. Wang, H., Qiao, X., Chen, J., Wang, X. & Ding, S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* **94**, 449–453 (2005).

231. Mdluli, P. S. *et al.* Selective adsorption of PVP on the surface of silver nanoparticles: A molecular dynamics study. *J. Mol. Struct.* **1004**, 131–137 (2011).
232. Khanna, P. K. *et al.* Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Mater. Chem. Phys.* **93**, 117–121 (2005).
233. El-Shamy, A. G., Attia, W. & Abd El-Kader, K. M. The optical and mechanical properties of PVA-Ag nanocomposite films. *J. Alloys Compd.* **590**, 309–312 (2014).
234. Juby, K. A. *et al.* Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study. *Carbohydr. Polym.* **89**, 906–913 (2012).
235. Zhang, Z., Zhao, B. & Hu, L. PVP Protective Mechanism of Ultrafine Silver Powder Synthesized by Chemical Reduction Processes. *J. Solid State Chem.* **121**, 105–110 (1996).
236. Agnihotri, S., Mukherji, S. S. & Mukherji, S. S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* **4**, 3974–3983 (2014).
237. Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H. & Chen, R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **24**, 1465–71 (2013).
238. Panacek, A. *et al.* Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials* **30**, 6333–40 (2009).
239. Mirzajani, F., Ghassempour, A., Aliahmadi, A. & Esmaeili, M. A. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res. Microbiol.* **162**, 542–9 (2011).
240. Jung, W. K. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2171–8 (2008).
241. Ghosh, I. N. *et al.* Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against | IJN. *Int. J. Nanomedicine* **8**, 4721–4731 (2013).
242. Feng, Q. L. *et al.* A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 662–8 (2000).
243. Suchomel, P., Panacek, A., Pucek, R., Zboril, R. & Kvitek, L. Synthesis of Small Silver Nanoparticles and Their Catalytic Activity in 4-Nitrophenol Reduction. in *Nanocon 2013, 5th international conference* 225–231 (Tanger LTD, 2014).
244. Wunder, S., Lu, Y., Albrecht, M. & Ballauff, M. Catalytic Activity of Faceted Gold Nanoparticles Studied by a Model Reaction: Evidence for Substrate-Induced Surface Restructuring. *ACS Catal.* **1**, 908–916 (2011).
245. Sarkar, S. *et al.* Redox transmetalation of prickly nickel nanowires for morphology controlled hierarchical synthesis of nickel/gold nanostructures for enhanced catalytic activity and sers responsive functional material. *J. Phys. Chem. C* **115**, 1659–1673 (2011).
246. Zeng, J., Zhang, Q., Chen, J. & Xia, Y. A comparison study of the catalytic properties of Au-based nanocages, nanoboxes, and nanoparticles. *Nano Lett.* **10**, 30–35 (2010).
247. Wunder, S., Polzer, F., Lu, Y., Mei, Y. & Ballauff, M. Kinetic Analysis of Catalytic

- Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes. *J. Phys. Chem. C* **114**, 8814–8820 (2010).
248. Takale, B. S., Bao, M. & Yamamoto, Y. Gold nanoparticle (AuNPs) and gold nanopore (AuNPore) catalysts in organic synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 2005–27 (2014).
249. Hervés, P. *et al.* Catalysis by metallic nanoparticles in aqueous solution: model reactions. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 5577–87 (2012).
250. Devillers, J., Chezeau, A., Poulsen, V. & Thybaud, E. Effects of ethylene glycol ethers on the reproduction of *Ceriodaphnia dubia*. *Chemosphere* **50**, 373–376 (2003).
251. Zhu, J., Feng, Y.-L. & Aikawa, B. A positive chemical ionization GC/MS method for the determination of airborne ethylene glycol and propylene glycols in non-occupational environments. *J. Environ. Monit.* **6**, 881–7 (2004).
252. Saberi, A. H., Fang, Y. & McClements, D. J. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* **411**, 105–13 (2013).
253. Yin, Y. *et al.* Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process. *J. Mater. Chem.* **12**, 522–527 (2002).
254. Černá, K. Příprava substrátů na bázi stříbra a zlata pro analytické aplikace povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. (Univerzita Palackého v Olomouci, 2015).
255. Zhou, H., Zheng, L. & Jia, H. Facile control of the self-assembly of gold nanoparticles by changing the capping agent structures. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **450**, 9–14 (2014).
256. Atkins, P. & Paula, J. De. *Atkins` Physical Chemistry*. (WH Freeman, 2010).
257. Fenger, R., Fertitta, E., Kirmse, H., Thünemann, A. F. & Rademann, K. Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 9343–9 (2012).

## 7 PŘÍLOHY

- **Suchomel, P.**, Pucek, R., Černá, K., Fargašová, A., Panáček, A., Gedanken, A., Zbořil, R. & Kvítek, L. Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes. *Ultrason. Sonochem.* **32**, 165–172 (2016).
- Pucek, R., **Suchomel, P.**, Kvítek, L., Panáček, A. & Zbořil, R. Způsob přípravy vrstev koloidních částic stříbra na skleněném podkladu pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, vrstva koloidních částic stříbra na skleněném podkladu a použití této vrstvy. (2015) – patent **CZ 305 600**.
- Pucek, R., **Suchomel, P.**, Kvítek, L., Panáček, A. & Zbořil, R. Skleněný podklad s vrstvou koloidních částic stříbra pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. (2015) – užitný vzor **CZ 28 304**.
- **Suchomel, P.**, Kvítek, L., Panáček, A., Pucek, R., Hrbáč, J., Večeřová, R. & Zbořil, R. Comparative study of antimicrobial activity of AgBr and Ag nanoparticles (NPs). *PLoS One* **10**, e0119202 (2015).
- Praus, P., Turicová, M., **Suchomel, P.** & Kvítek, L. Capillary isotachopheresis for separation of silver nanoparticles according to size. *RSC Adv.* **5**, 59131–59136 (2015).
- **Suchomel, P.**, Panáček, A., Pucek, R., Zbořil, R. & Kvítek, L. Synthesis of Small Silver Nanoparticles and Their Catalytic Activity in 4-Nitrophenol Reduction. *Nanocon 2013, 5th international conference* 225–231 (Tanger LTD, 2014).



# Highly efficient silver particle layers on glass substrate synthesized by the sonochemical method for surface enhanced Raman spectroscopy purposes



Petr Suchomel<sup>a</sup>, Robert Prucek<sup>a,\*</sup>, Klára Černá<sup>a</sup>, Ariana Fargašová<sup>a</sup>, Aleš Panáček<sup>a</sup>, Aharon Gedanken<sup>b,\*</sup>, Radek Zbořil<sup>a</sup>, Libor Kvítek<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 783 71 Olomouc, Czech Republic  
<sup>b</sup> Department of Chemistry, Bar-Ilan University, Ramat-Gan 52900, Israel

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 12 January 2016  
 Received in revised form 4 March 2016  
 Accepted 5 March 2016  
 Available online 7 March 2016

### Keywords:

Silver particles layer  
 Glass substrate  
 Sonochemical  
 Surface enhanced Raman spectroscopy

## ABSTRACT

A fast method for preparing of silver particle layers on glass substrates with high application potential for using in surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) is introduced. Silver particle layers deposited on glass cover slips were generated in one-step process by reduction of silver nitrate using several reducing agents (ethylene glycol, glycerol, maltose, lactose and glucose) under ultrasonic irradiation. This technique allows the formation of homogeneous layers of silver particles with sizes from 80 nm up to several hundred nanometers depending on the nature of the used reducing agent. Additionally, the presented method is not susceptible to impurities on the substrate surface and it does not need any additives to capture or stabilize the silver particles on the glass surface. The characteristics of prepared silver layers on glass substrate by the above mentioned sonochemical approach was compared with chemically prepared ones. The prepared layers were tested as substrates for SERS using adenine as a model analyte. The factor of Raman signal enhancement reached up to  $5 \cdot 10^5$ . On the contrary, the chemically prepared silver layers does not exhibit almost any pronounced Raman signal enhancement. Presented sonochemical approach for preparation of silver particle layers is fast, simple, robust, and is better suited for reproducible fabrication functional SERS substrates than chemical one.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

Discovery of surface enhanced Raman scattering (SERS) on a silver electrode by Fleischmann in 1974, and especially its rediscovery on colloidal silver particles by Creighton in 1977 [1] initiated the extensive development of a new and very sensitive analytical method that allows the detection of molecules in the concentration range from pico to femtomoles [2]. The most widely used materials for SERS include silver or gold. Silver is preferable due to its cheaper price and better optical properties for utilization in SERS [3].

A high enhancement of SERS, reaching the values of up to  $10^{15}$ , even allowed the detection of a single molecule adsorbed on an individual silver nanoparticle [4,5]. Some studies have shown that such a high value of the enhancement can be achieved only on particles of certain sizes which are referred as “hot particles”.

The particles' optimum size depends on the wavelength of the laser used for the excitation and ranges approximately from 70 to 200 nm for the excitation wavelengths in the range from 488 to 647 nm [6]. Based on the dependence of the “hot particles” size for a given laser wavelength, it can be expected, when using lasers with wavelengths 785 nm and 1064 nm, the maximum enhancement of the Raman signal should be obtained on silver particles of the size of around 400 nm [7–9]. Unfortunately, particles of these dimensions are unstable and settle within a short time. Silver nanoparticles with sizes equal to a few tens of nanometers are generally stable for several months or years, however, these small particles do not provide sufficient surface enhancement of the Raman signal themselves. For this purpose, they must be treated by addition of some inorganic ions. The inorganic ions added into the dispersion of silver nanoparticles induces their slow and often uncontrollable aggregation resulting in the irreproducibility of the Raman signal [2,4,10–13].

The disadvantages connected with aggregation or sedimentation of silver nanoparticles can be overcome through the formation of metal particle layers [14] on suitable substrate such as quartz or

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: [robert.prucek@upol.cz](mailto:robert.prucek@upol.cz) (R. Prucek), [gedanken@mail.biu.ac.il](mailto:gedanken@mail.biu.ac.il) (A. Gedanken).

glass [15]. The chemical techniques for the formation of metal particle layers can be divided into deposition from gas phase and formation by growing up of layers from solution, which is represented by electrochemical deposition, chemical deposition from solution, Langmuir–Blodgett film technique, and self-assembling [16]. Deposition of particles on the glass substrate can also be performed by lithographic method based on formation of self-assembled layers of polystyrene particles serving as a lithographic mask. After deposition of metal nanoparticles (silver or gold in most cases), the polystyrene particles are removed by organic solvent [17–21]. Another possible technique of metal layers formation involves deposition of one or more layers using polyelectrolytes such as polydiallyldimethylammonium chloride (PDDA) or polyethylenimine (PEI) [22,23]. In this approach, the layers of particles are captured between layers of polyelectrolyte through electrostatic interactions. Other way to obtain silver particle layers involves exploitation of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) [24], which is able to form covalent bond with the activated surface of glass or quartz substrate. When APTES is bonded on the surface, its amino groups can interact through free electron pair with silver nanoparticles [25].

Unfortunately, the described methods are usually time consuming, very sensitive to thorough cleaning of the surface, and also require activation of substrate surface prior to deposition of silver particles. Due to these disadvantages, it is desirable to find new techniques, which are more effective, time-saving and which do not require addition of other chemicals, which could affect the enhancement of Raman signal. One of the promising techniques is based on sonochemical preparation of silver layers. Through sonochemical approach, Perkas et al. prepared layers of silver particles stabilized by polyvinylpyrrolidone (PVP) on glass substrates [26] with substantial antibacterial activity. However, application of the reported method in preparation of the effective SERS substrate is questionable due to interfering of the Raman signal originated from the PVP polymer used as stabilizer with Raman signal of analyzed molecules adsorbed on this type of silver nanoparticle layer.

In the current study, we report the innovative preparation method of the silver particle layers usable as efficient SERS substrate based on the combination of sonochemistry and modified Tollens reaction. The influence of experimental parameters such as sonication parameters, concentration of silver salt, type of reducing substance, absence or presence of PVP, and choice of beaker type (glass or polypropylene), used for preparation, on the characteristics of silver particle layers was investigated. The prepared silver particle layers deposited on glass slips were tested and evaluated as highly effective substrates for surface enhanced Raman spectroscopy purposes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and instruments

Silver nitrate (Sigma–Aldrich, p.a.) was used as a precursor of silver particle layers. Ethylene glycol (Sigma–Aldrich, p.a.), glycerol (Sigma–Aldrich, p.a.), maltose (Sigma–Aldrich, p.a.), glucose (Sigma–Aldrich, p.a.) and lactose (Sigma–Aldrich, p.a.) were used as reducing agents. Polyvinylpyrrolidone (PVP, Sigma–Aldrich, M. W. 40,000) was used as a stabilizer. Ammonium hydroxide (Sigma–Aldrich, 28–30% aqueous solution) was used as a complexing agent. Adenine (Sigma–Aldrich, 99%) was used for the SERS experiments as a model analyte. All chemicals were used without additional purification. Deionized water (18 M $\Omega$  cm, Millipore) was used for preparation of all solutions.

Silver layers on glass slips were prepared by ultrasonic processor Q700 with standard titanium probe 4220 (QSonica LLC, USA). Glass slips covered by silver nanoparticles were characterized by using of scanning electron microscope Hitachi SU6600 (Hitachi, Japan) and UV–vis spectrometer Specord S600 (Analytic Jena AG, Germany). Silver concentrations were determined by the AAS technique with flame ionization using a ContrAA 300 (Analytik Jena AG, Germany) equipped with a high-resolution Echelle double monochromator (spectral bandwidth of 2 pm at 200 nm) and with a continuum radiation source (xenon lamp). The absorption line used for these analyses was 328.0683 nm. Surface enhanced Raman spectra were recorded using iRaman Plus with the 785 nm excitation laser (BWTEK Inc., USA), scan time 10 s, 6 accumulations were made. The laser light power was 100 mW. For the SERS measurement, 10  $\mu$ l of 10<sup>-5</sup> M adenine solution was used.

### 2.2. Preparation of silver particle layers deposited on glass substrate

The silver particle layers were deposited on glass microscope cover slips (Menzel–Gläser, 18  $\times$  18 mm) by using of sonochemical approach. Before deposition, cover slips were thoroughly cleaned by detergent and washed by deionized water. After cleaning, cover slips were carefully inserted vertically using wire holders into beaker and then solutions of reaction precursors were added. Several modifications of the silver particle layers preparation process based on the reduction of silver ammonia complex related to changes of concentrations of the reactants were performed. Two polyols: ethylene glycol and glycerol, and three reducing saccharides: maltose, glucose and lactose, were used as reducing agents. Typically, 5 ml or 1 ml of 0.25 M silver nitrate solution was diluted by an appropriate amount of deionized water and 5 ml or 1 ml of reducing substance (ethylene glycol, glycerol or 0.25 M solution of reducing saccharide) was added. The final volume of reaction mixture was 25 ml. After mixing, the sonication tip was immersed into the reaction mixture. Parameter of sonication was adjusted to the amplitude value equal to 30% and the sonication begun. Few seconds after the start, 1.5 ml or 0.3 ml of ammonia solution was rapidly injected into the beaker. Also, the effect of presence of stabilizing polymer PVP on formation of silver nanoparticle layers was tested. In this case, 0.5 ml of 15 g/L PVP solution was added into the reaction system with ethylene glycol before sonication. Synthesis of silver particle layers on glass cover slips was terminated after 5.5 min of sonication. Glass slips were then pulled out of the holders, washed by deionized water and dried by air flow. For comparison to sonochemical approach of deposition of silver particle layers on glass substrate, the silver layers were also prepared using chemical method. As an example of such method, the Tollens process was chosen because this method exploits almost the same chemicals. In this case, cleaned glass slip was activated by tin dichloride, immersed into beaker and then silver layer was formed by mixing of silver nitrate (0.1 M) and ammonia (0.1 M) solution with solution of sodium hydroxide (1 M) and glucose (1.1 M) in the ratio equal to 1:1.

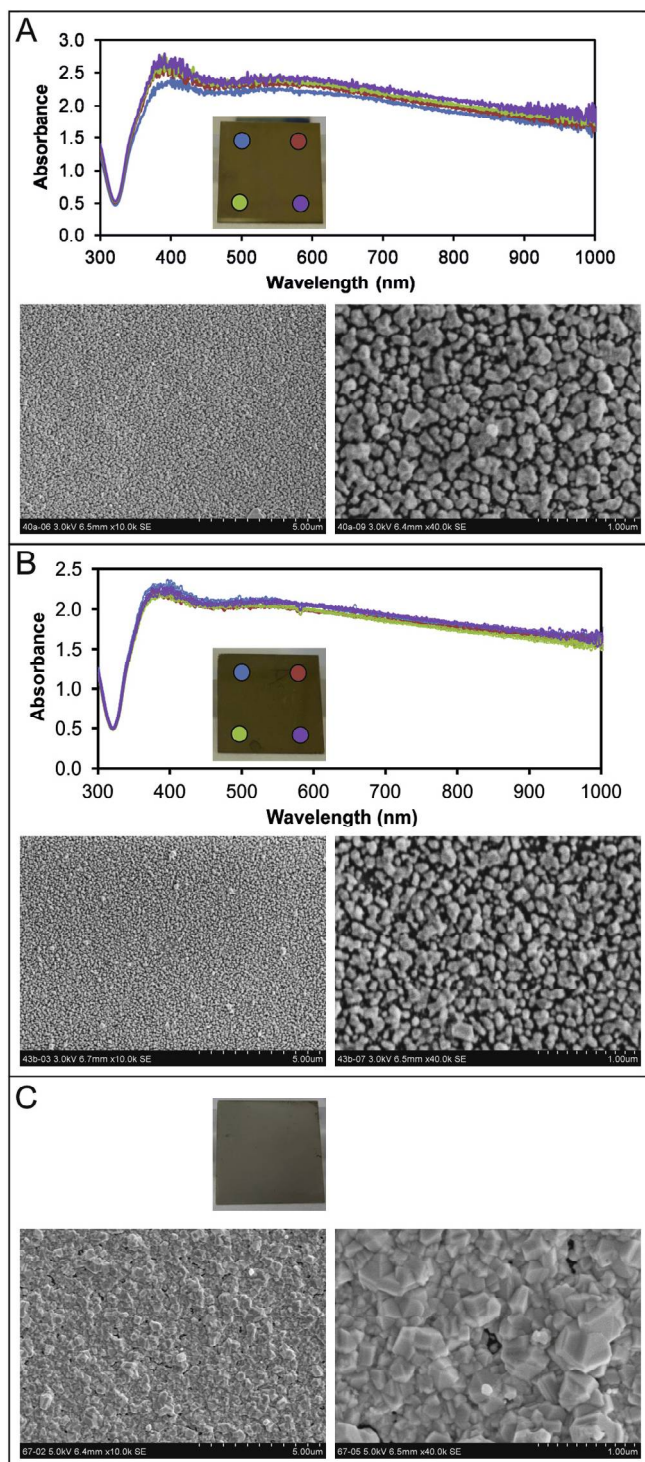
## 3. Results and discussion

### 3.1. Preparation of silver particle layers deposited on glass slips using ethylene glycol and glycerol

The main goal of the presented study was development of a simple and reproducible preparation of silver layers applicable as SERS substrates. The new synthetic route based on combination of two synthetic approaches, sonochemical method of silver nanoparticles deposition on glass [26] and modified Tollens process [27] was studied as an alternative methods. The procedure,



used as standard for comparison of the new developed procedure, consist of mixing of 5 ml silver nitrate solution (0.25 M), 1.5 ml of ammonia solution (2.5% V/V), 0.5 ml of PVP (15 g/L) and 15.5 ml of deionized water. The silver ions were reduced under ultrasonic



**Fig. 1.** UV–vis spectra, digital photos and SEM images of silver particle layers deposited on glass slips synthesized in glass beaker (final concentration of silver 0.05 M) reduced by (A) ethylene glycol in the presence of PVP, (B) ethylene glycol without the presence PVP, and (C) glycerol without the presence of PVP. Color dots in digital photos correspond to sites scanned by UV–vis absorption spectroscopy and correspond with color of absorption curves. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

irradiation by adding of 2.5 ml of ethylene glycol. UV–vis spectra of prepared slips (Fig. 1A) proved the presence of silver nanoparticles deposited on the glass substrate due to the presence of absorption maximum at approximately 400 nm. Moreover, the recorded UV–vis spectra at four different sites on the glass slip in combination with captured digital photography show good homogeneity of the generated silver particle layer. Color dots at photos of slips correspond to sites scanned by UV–vis absorption spectroscopy and correspond to color of absorption spectra. The structure of the generated layers was characterized by SEM images, which revealed the presence of silver nanoparticles deposited on the glass slips with a mean diameter of around 100 nm (Fig. 1A). However, the presence of PVP can negatively affect the layer applicability for SERS due to existence of influencing redundant Raman signal going from the presence of PVP polymer in the layer (Fig. 5A). Thus, we modified this method of preparation of silver particle layers to a polymer-free synthetic approach. The other reaction conditions were maintained identical as in the case when PVP was used. In this case, silver particle layer consists of particles with a mean diameter of around 80 nm as can be seen from SEM images (Fig. 1B). Homogeneity and nanoparticulate nature of layer can be demonstrated through recorded UV–vis spectra at four different positions at silver particle layers surface (Fig. 1B). The utilization of ethylene glycol as a reducing agent can be unfortunately problematic from the view-point of its chronic toxicity and teratogenicity [28,29]. Moreover, remains of glycerol adsorbed on silver layers are also detected by SERS and produce further redundant signals (Fig. 5A, B and D). Thus, in the next modification step, the above mentioned reducing agent was replaced by much environmental friendly substance – glycerol, which is commonly used in medicals and pharmaceuticals [30]. Exploitation of glycerol also enables generation of silver particle layers (Fig. 1C). In the case of using of glycerol as the reducing agent, considerably higher deposition of silver particles on the glass surface was observed (Fig. 1C) and therefore due to the high light absorption of this dense layer, UV–vis absorption spectra could not be recorded. The higher deposition of silver particles on glass surface was confirmed by AAS measurements (Table 1). While in the case of ethylene glycol, the amount of deposited silver reached values of 0.75 mg per glass cover slip in the presence of PVP and 0.86 mg per glass cover slip without PVP, in the case of glycerol, the amount increased to 12.0 mg per glass. SEM images proved that the prepared layer is much denser and revealed that layer consists of silver crystals with sizes from 100 to 400 nm (Fig. 1C).

**Table 1**

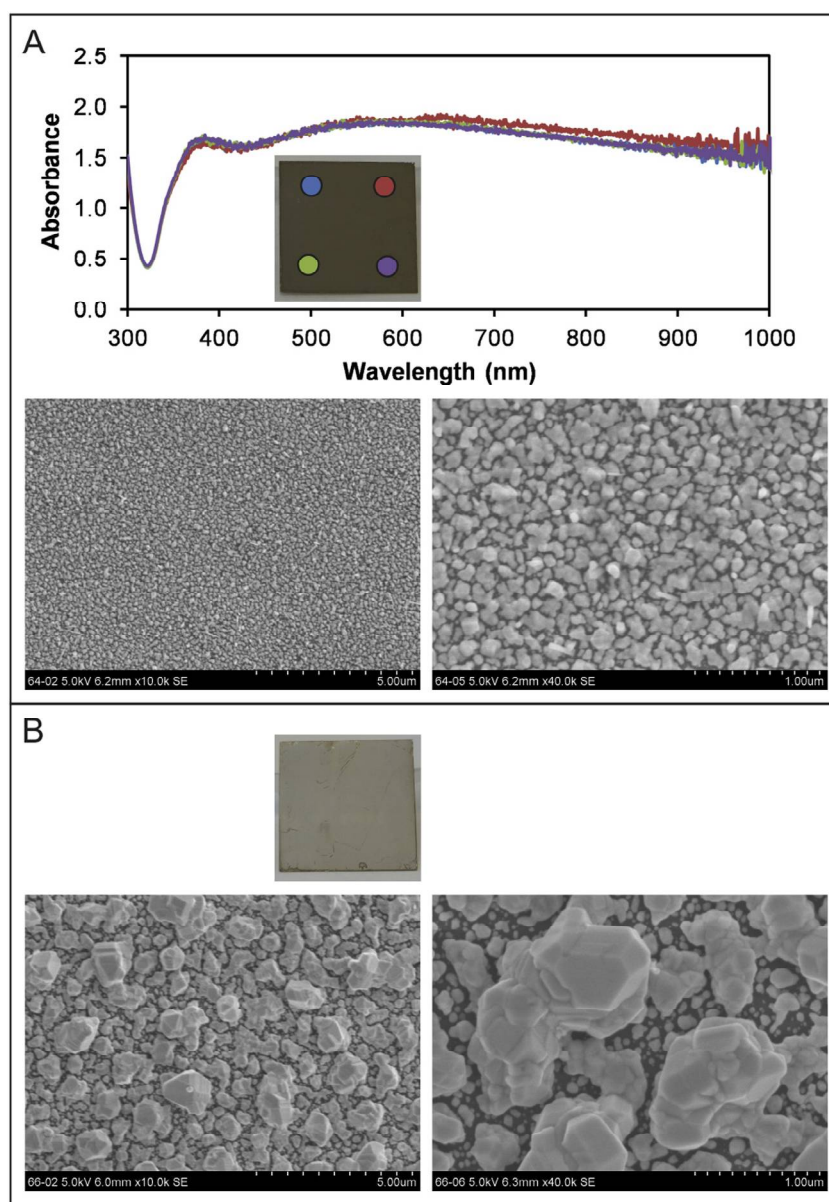
Amount of silver nanoparticles deposited on glass substrate using sonochemical technique determined by AAS.

Reducing agent and conditions	Amount of silver on glass (mg)	Efficiency of deposition (%)
Ethylene glycol in the presence of PVP in glass beaker	0.75	0.56
Ethylene glycol without the presence of PVP in glass beaker	0.86	0.64
Glycerol without the presence of PVP in glass beaker	12.00	8.92
Ethylene glycol without the presence of PVP in polypropylene beaker	0.87	3.23
Glycerol without the presence of PVP in polypropylene beaker	5.61	20.86
Maltose without the presence of PVP in polypropylene beaker	1.01	3.75
Lactose without the presence of PVP in polypropylene beaker	1.29	4.81
Glucose without the presence of PVP in polypropylene beaker	3.67	13.66

The above mentioned procedures of silver layer preparation involve a high consumption of silver nitrate when only small part is exploited for desired silver layer formation due to deposition of large amount of metallic silver on walls of the glass beaker during the sonication process. With the aim to significantly increase efficiency of the sonochemical reduction process we have replaced glass beakers with the plastic ones. The change allows us to reduce five-times final concentration of silver nitrate solution from 0.05 M to 0.01 M. Moreover, the amounts of added ethylene glycol or glycerol were reduced to 1 ml and the amount of 2.5% ammonia solution was only 0.3 ml. The time of preparation was kept identical (5.5 min) as in the systems using glass beaker. This simple change in the reaction arrangement leads to improving of efficiency of the sonochemical deposition process as documented in Fig. 2. In the case of using ethylene glycol as a reducing substance, UV-vis spectra proved presence of silver nanoparticles on the glass surface with nearly the same density and size as in the case of experiment

with five times higher concentration of reaction components (Fig. 2A). In the case of using of glycerol as the reducing agent, the same trend like in the preparation in glass beaker was observed and higher deposition of silver particles on the glass surface made impossible to record UV-vis absorption spectra (Fig. 2B). More efficient deposition of silver nanoparticles was also confirmed by AAS measurement (Table 1). SEM images revealed that dense layer of silver is formed by two size classes of silver particles. There are both larger crystals with sizes of up to 1  $\mu\text{m}$  and particles with size of around 100 nm.

In summary, the substantial advantage of such modified procedure lies in the fact that the deposition of silver nanoparticles is more effective and prepared silver particle layers are denser if plastic baker is used compared to sonochemical procedure realized in the glass beaker. Unfortunately, synthetic procedures described above require precise control of reaction conditions (concentration of reactants, temperature, quality of deionized water, etc.) to



**Fig. 2.** UV-vis spectra, digital photos and SEM images of silver particles deposited on glass prepared in polypropylene beaker (final concentration of silver 0.01 M) reduced by (A) ethylene glycol and (B) glycerol. Color dots in digital photos correspond to sites scanned by UV-vis absorption spectroscopy and correspond with color of absorption curves. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

obtain a good reproducibility of the physico-chemical properties of the prepared silver layers.

### 3.2. Preparation of silver particle layers deposited on glass slips using reducing saccharides

Therefore, in order to gain the highest reproducibility and quality of silver layers preparation, the entirely new approach to sonochemical preparation method was introduced. This new method is based on the combination of sonochemical approach and the process based on the Tollens reaction where silver ammonia complexations are reduced by saccharides in alkaline environment [31]. In this procedure, three reducing saccharides (maltose, lactose, and glucose) which differ in their redox potentials were chosen and tested. Typically, 1 ml of 0.25 M silver nitrate solution was reduced by 1 ml of 0.25 M saccharide solution in the presence of 0.3 ml of ammonia (2.5%). Final concentrations of reaction compounds were therefore 0.01 M of silver nitrate, 0.01 M of reducing saccharide and 0.018 M of ammonia. As well as in the previously described case of silver layers formed using glycerol, also in the case of silver layers formed by reduction using saccharides, it was not possible to record UV-vis spectra because of very high light absorption by formed dense silver layers, which was again confirmed by AAS measurements (Table 1). Therefore, the characterization of generated silver layers and particle's size determination was performed only through SEM images. Depending on saccharide used, the silver layers consist of particles with a mean diameter ranging from 100 to 250 nm. The average size of deposited silver nanoparticles was approximately 100 nm for maltose (Fig. 3A), 150–180 nm for lactose (Fig. 3B) and 200–250 nm for glucose (Fig. 3C). It was found that exploitation of reducing saccharides for sonochemical reduction and deposition of silver nanoparticles on glass slips is much more preferable compared to polyol method. The synthesis is much less dependent on external influences and, moreover, use of reducing saccharides increases amount of deposited silver on glass surface.

Additionally, presented sonochemical approach provides great quality of the prepared silver layers on glass substrate in an extremely short time in comparison to other published methods based on application of auxiliary sublayer for capturing of silver nanoparticles on solid surface. One of the often used methods described in literature is based on capturing metal nanoparticles on primarily prepared layer of polyelectrolyte, such as poly(diallyldimethylammonium) chloride (PDDA) or polyethyleneimine (PEI) through electrostatic interactions. Preparation of thin silver layers through PDDA was introduced by Chapman et al. or by Guo et al. [22,32], using of PEI was published by Michna et al. [23]. Common features occurring in this technique include requirement of perfect cleaning of substrate and activation by strongly interact solutions such as  $\text{H}_2\text{O}_2$  with  $\text{NH}_4\text{OH}$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (piranha solution). Glass substrate is then immersed into a solution of polyelectrolyte or polymer for several minutes or hours. After careful washing of the glass substrate to remove the excess of polyelectrolyte or polymer, the glass is inserted into a dispersion of silver nanoparticles prepared separately a priori. The whole process takes time on the order of units or tens of hours. Another well-known procedure used for silver nanoparticles deposition is the exploitation of APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) which is covalently bonded to the surface of the glass substrate after its activation which is followed by bonding of Ag NPs due to their interaction with amino groups of APTES and forming layer on glass substrate. This technique is also time-consuming as above mentioned procedures using polyelectrolytes [24,33,34]. Besides theoretical comparison of sonochemically prepared silver layers to the above mentioned results from literature, we have prepared silver particle layers on glass slips using chemical approach. For this purpose, the Tollens process

was exploited because this procedure involves almost the same chemical composition of the reaction components. It can be seen that thus prepared silver layers do not exhibit so high homogeneity and uniformity of silver particle distribution such as layers prepared by sonochemical technique. Moreover, silver nanoparticles are subject to recrystallization and therefore there are formed large straps which lose their nano/micro particulate nature Fig. 4.

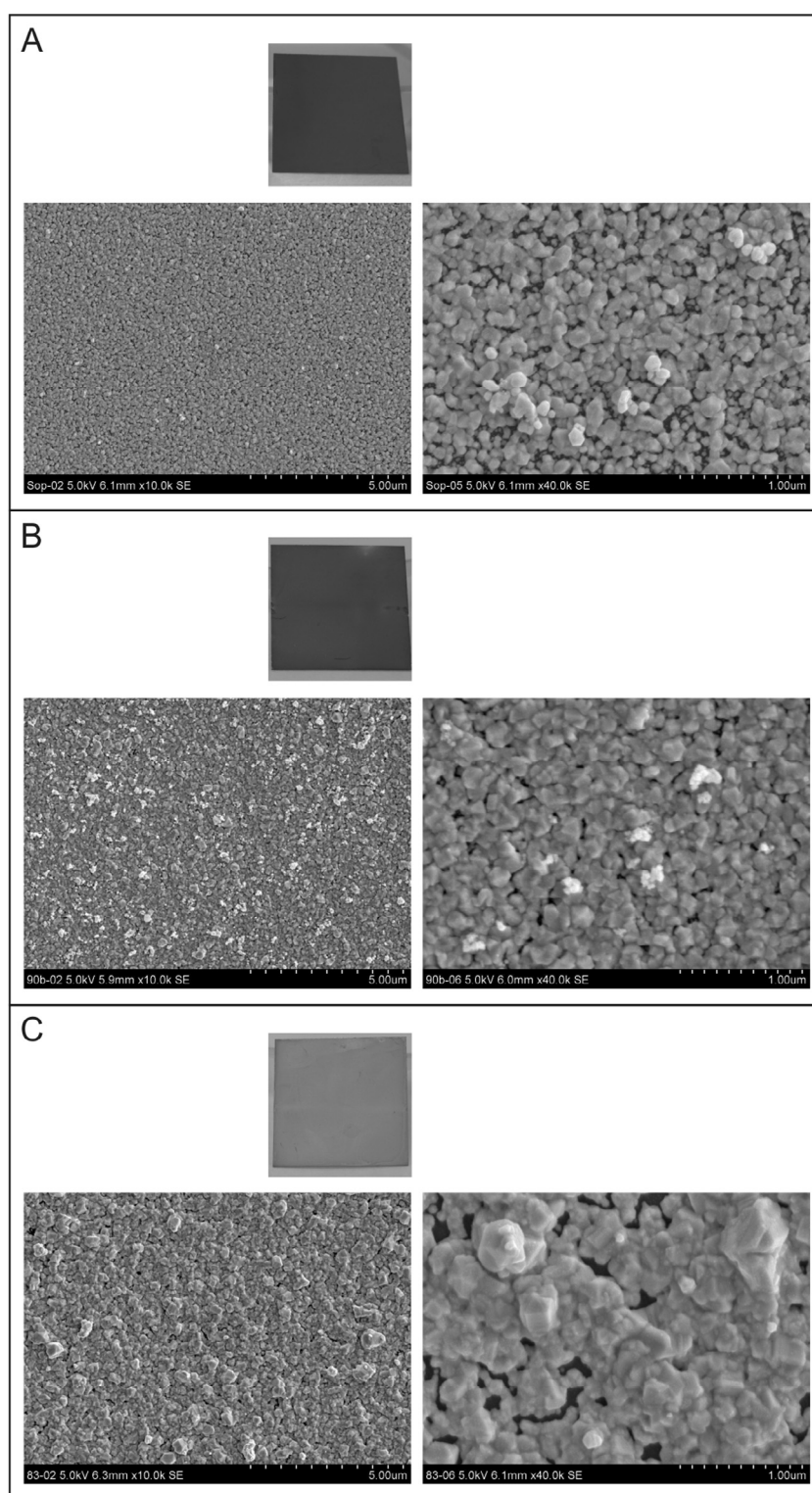
Contrary to these procedures, our novel technique is not so susceptible to impurities on the substrate surface and requires washing just by detergent distilled water. There is no need of additives to capture the silver particles on the surface and, finally, silver particles are formed and deposited all at once during the sonication. The whole procedure for silver layers preparation takes therefore only several minutes. The advantage of sonochemical method arises from the physical nature of sonication, concretely from changes due to the acoustic cavitation [35]. By using of power ultrasound power, there are created cavitation bubbles whose implosive collapses results in an enormous concentration of energy. This energy, in combination with high local temperatures and pressures, lead to the formation of nanosized particles [36]. When the cavitation bubbles collapse near a solid surface (glass e.g.), they produce microjets and shock waves [37], which throw due to the asymmetric jet formation newly formed nanoparticles onto surface at a very velocities [38]. Moreover it was found, that in heterogeneous systems and in the presence of solid surface the nucleation rate increases several hundred times [39] and therefore, using of sonochemistry is much more efficient compared to non-sonicated methods for surface coating by nanoparticles.

### 3.3. Application of silver particle layers deposited on glass slips as SERS substrates

The prepared silver particle layers on glass slips were tested as substrates for surface enhanced Raman spectroscopy with excitation wavelength 785 nm. Utilization of 785 nm excitation wavelength can be advantageous for biological samples to avoid most of the back-ground fluorescence. Adenine was used as a model analyte. The SERS enhancement factors were calculated as a ratio of SERS signal of  $10^{-5}$  M adenine solution dropped on silver particle layer to Raman signal of 0.1 M adenine dropped on pure glass slip without silver particle layer. Even if entire spectrum is important for the evaluation of Raman intensities, it is possible to simplify calculation by selecting of strongest peak of adenine at  $\sim 738\text{ cm}^{-1}$ . After dropping of 10  $\mu\text{l}$  of  $10^{-5}$  M adenine solution on substrate, the measurement immediately began. This fact is advantageous from practical point of view because of time saving.

Differently prepared glass slips with deposited silver particles exhibited different level of Raman signal enhancement. The best results were observed for the substrate prepared using ethylene glycol (Fig. 5A) and maltose (Fig. 5F) as reducing substances. The enhancement factors were approximately  $5 \cdot 10^5$ . In both cases, the silver particle layers are formed by approximately 100 nm large particles. However, in the case of ethylene glycol, high concentration of silver nitrate in glass beaker (0.05 M) was applied. When the concentration of silver was reduced to 0.01 M, the efficiency of layer in SERS significantly decreased (Fig. 5D). Moreover, while in the case of maltose, as the best reducing agent, flat (clean) spectrum between  $900\text{ cm}^{-1}$  and  $1250\text{ cm}^{-1}$  can be observed, in the presence of ethylene glycol, residual peaks in the range about  $1000\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$  can be seen in the spectrum (Fig. 5B and D), which are in addition affected by PVP in the case of using PVP as modifier (Fig. 5A). The substrates prepared by other reducing sugars show lower values of signal enhancement. The efficiency decreased (Fig. 5G and H) with increasing particle size: 150–180 nm for lactose (Fig. 3B) and 200–250 nm for glucose (Fig. 3C). The layers formed using glycerol provide higher enhancement

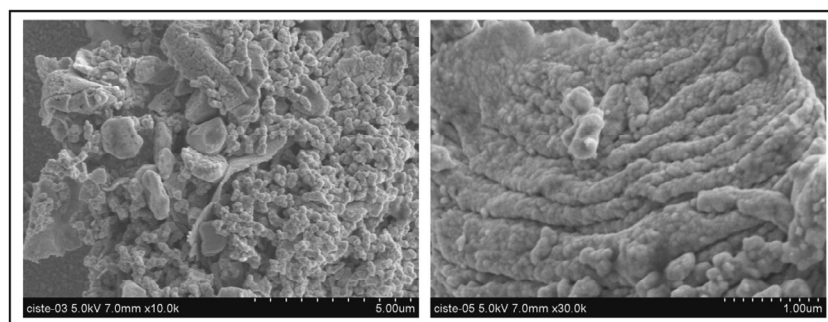




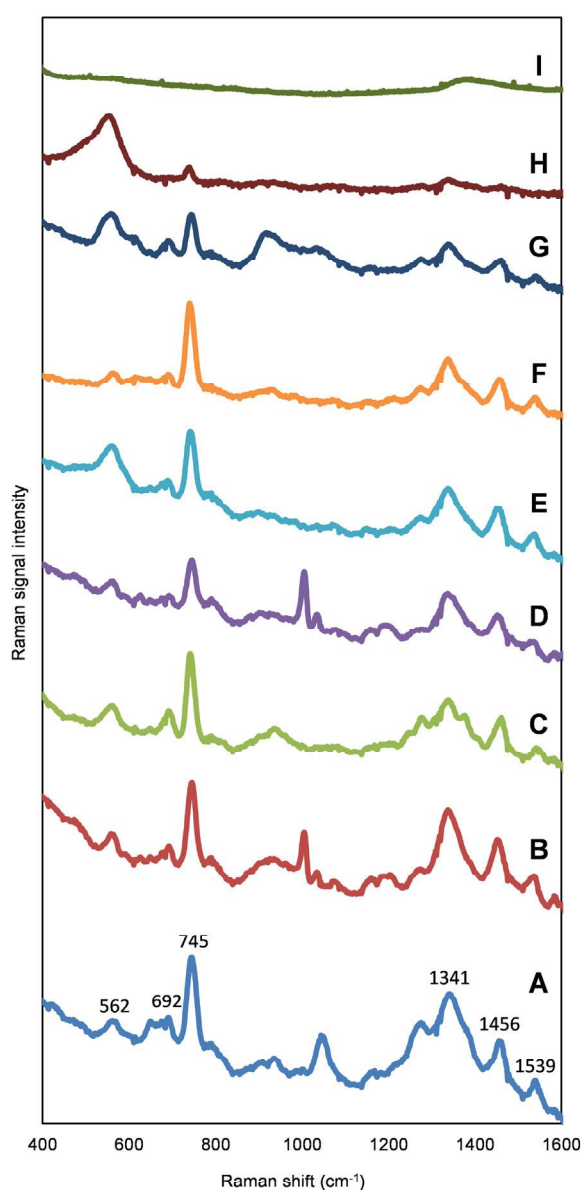
**Fig. 3.** Digital photos and SEM images of glass slips deposited by silver nanoparticles prepared in plastic beaker (final concentration of silver 0.01 M) reduced by (A) maltose and (B) lactose and (C) glucose.

although the layers were formed by large particles with size about 400 nm (0.05 M silver nitrate) or even 1000 nm (0.01 M silver nitrate) which can be connected with the used laser excitation wavelength. However, these layers also contain some fraction of particles with sizes of about 100 nm which are probably responsible for the high value of Raman signal enhancement. Since all of tested silver layers synthesized by presented sonochemical

technique showed Raman signal enhancement, it can be concluded that every silver based substrates can be used for SERS purposes. For comparison, the chemically (by Tollens process) prepared silver layers on glass substrate were also tested as SERS enhancers (Fig. 5I). The results showed, that non-sonochemically prepared silver layers does not exhibit almost any pronounced Raman signal enhancement. So, it can be concluded that sonochemical approach



**Fig. 4.** SEM image of glass slip deposited by silver nanoparticles prepared non-sonochemically in glass beaker by modified Tollens process based on the reduction of silver ammonia complex by maltose.



**Fig. 5.** Surface enhanced Raman spectra of adenine ( $10^{-5}$  M) on silver particle layers deposited on glass slips prepared in a glass beaker (final concentration of silver 0.05 M), reduced by (A) ethylene glycol with PVP, (B) ethylene glycol without PVP, (C) glycerol and prepared in a plastic beaker (final concentration of silver 0.01 M) reduced by (D) ethylene glycol, (E) glycerol, (F) maltose, (G) lactose and (H) glucose and particle layers deposited non-sonochemically (I). For the measurements,  $10 \mu\text{l}$  of  $10^{-5}$  M adenine solution was used.

is better suited for fabrication functional SERS substrates than chemical one.

In summary, the proposed novel method of silver particle layer preparation based on combination of modified Tollens reaction with sonochemical reduction process is the best method for preparation of effective SERS substrates due to its ability to gain high enhancement factor for Raman signal with outstanding reproducibility and also due to its environmentally friendly character avoiding toxic compounds such as ethylene glycol.

#### 4. Conclusion

In this work, we described a novel simple technique for preparation of silver particle layers deposited on the glass slips. This procedure is based on ultrasonically assisted chemical reduction of silver ammonia complex cations and simultaneous deposition of formed silver particles on the glass substrate. By changing the reaction parameters, concentrations of reagents and by selecting a suitable reducing agent, it was possible to control the size of the deposited silver particles, whose diameter ranged from 80 nm up to several hundreds of nm. The deposition of particles on the glass substrate prevents their aggregation or other changes in size and shape during storage. Therefore, the formed silver layers exhibit long-term stability, which is important assumption for their practical utilization. Compared to other possible techniques of thin layers preparation, our developed method does not require careful cleaning and activation of substrate surface, which makes our technique time-saving and, therefore, economically advantageous. Changing of reaction beakers from glass to plastic ones enabled five-times decrease in the silver concentration, which brings another reduction in costs. The prepared silver particle layers were tested as substrates for surface enhanced Raman spectroscopy. The enhancement factor of the Raman signal reached approximately  $5 \cdot 10^5$  for adenine serving as a model analyte. Thus, the prepared silver particle layers deposited on the cover slips significantly enhanced the Raman signal and, hence, can be preferably used for purposes of mentioned analytical technique.

#### Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by the National Programme for Sustainability I (2013–2020), project LO1305 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Operational Program Education for Competitiveness – European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0056) and Internal Grants of Palacký University in Olomouc (PrF\_2015\_022). The authors thank Petra Bazgerová for SEM measurements and Jiří Tuček for language corrections (both from the Regional Centre of Advanced

Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacký University, Czech Republic).

## References

- [1] M.G. Albrecht, J.A. Creighton, Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 5215–5217.
- [2] W.E. Doering, S. Nie, Single-molecule and single-nanoparticle sers: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 311–317.
- [3] T. Endo, K. Kerman, N. Nagatani, H.M. Hiepa, D.-K. Kim, Y. Yonezawa, et al., Multiple label-free detection of antigen-antibody reaction using localized surface plasmon resonance-based core-shell structured nanoparticle layer nanochip, *Anal. Chem.* 78 (2006) 6465–6475.
- [4] A.M. Michaels, M. Nirmal, L.E. Brus, Surface enhanced Raman spectroscopy of individual Rhodamine 6G molecules on large Ag nanocrystals, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 9932–9939.
- [5] S. Nie, Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering, *Science* 275 (1997) 1102–1106.
- [6] S.R. Emory, W.E. Haskins, S. Nie, Direct observation of size-dependent optical enhancement in single metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 8009–8010.
- [7] R. Prucek, A. Panacek, A. Fargasova, V. Ranc, V. Masek, L. Kvitek, et al., Recrystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy, *CrystEngComm* 13 (2011) 2242.
- [8] R. Prucek, V. Ranc, L. Kvitek, A. Panacek, R. Zboril, M. Kolar, Reproducible discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation, *Analyst* 137 (2012) 2866–2870.
- [9] A. Fargasova, R. Prucek, V. Ranc, A. Panacek, L. Kvitek, R. Zboril, Influence of various chloride ion concentrations on silver nanoparticle transformations and effectiveness in surface enhanced Raman scattering for different excitation wavelengths, *RSC Adv.* 5 (2015) 9737–9744.
- [10] N. Leopold, B. Lendl, A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 5723–5727.
- [11] W. Leng, H.Y. Woo, D. Vak, G.C. Bazan, A. Myers Kelley, Surface-enhanced resonance Raman and hyper-Raman spectroscopy of water-soluble substituted stilbene and distyrylbenzene chromophores, *J. Raman Spectrosc.* 37 (2006) 132–141.
- [12] P.X. Zhang, Y. Fang, W.N. Wang, D.H. Ni, S.Y. Fu, Influence of addition of potassium chloride to silver colloids, *J. Raman Spectrosc.* 21 (1990) 127–131.
- [13] M. Campbell, S. Lecomte, W.E. Smith, Effect of different mechanisms of surface binding of dyes on the surface-enhanced resonance Raman scattering obtained from aggregated colloid, *J. Raman Spectrosc.* 30 (1999) 37–44.
- [14] R.P. Van Duyne, J.C. Hulstee, D.A. Treichel, Atomic force microscopy and surface-enhanced Raman spectroscopy. I. Ag island films and Ag film over polymer nanosphere surfaces supported on glass, *J. Chem. Phys.* 99 (1993) 2101.
- [15] A.J. Haes, S. Zou, J. Zhao, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Localized surface plasmon resonance spectroscopy near molecular resonances, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 10905–10914.
- [16] G. Cao, Y. Wang, *Nanostructures and Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Applications*, World Scientific Publishing Company, Singapore, 2011.
- [17] E.M. Hicks, X. Zhang, S. Zou, O. Lyandres, K.G. Spears, G.C. Schatz, et al., Plasmonic properties of film over nanowell surfaces fabricated by nanosphere lithography, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 22351–22358.
- [18] M.-V. Meli, R.B. Lennox, Surface plasmon resonance of gold nanoparticle arrays partially embedded in quartz substrates, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 3658–3664.
- [19] O. Stranik, H.M. McEvoy, C. McDonagh, B.D. MacCraith, Plasmonic enhancement of fluorescence for sensor applications, *Sens. Actuat. B Chem.* 107 (2005) 148–153.
- [20] A.J. Haes, S. Zou, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, Nanoscale optical biosensor: short range distance dependence of the localized surface plasmon resonance of noble metal nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 6961–6968.
- [21] J. Sung, E.M. Hicks, R.P. VanDuyne, K.G. Spears, Nanoparticle spectroscopy: dipole coupling in two-dimensional arrays of L-shaped silver nanoparticles, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 10368–10376.
- [22] Y.-B. Guo, D.-G. Wang, S.-H. Liu, S.-W. Zhang, Fabrication and tribological properties of polyelectrolyte multilayers containing in situ gold and silver nanoparticles, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 417 (2013) 1–9.
- [23] A. Michna, Z. Adamczyk, B. Siwek, M. Oćwieja, Silver nanoparticle monolayers on poly(ethylene imine) covered mica produced by colloidal self-assembly, *J. Colloid Interface Sci.* 345 (2010) 187–193.
- [24] A. Taglietti, C.R. Arciola, A. D'Agostino, G. Dacarro, L. Montanaro, D. Campoccia, et al., Antibiofilm activity of a monolayer of silver nanoparticles anchored to an amino-silanized glass surface, *Biomaterials* 35 (2014) 1779–1788.
- [25] J. Kim, P. Seidler, C. Fill, L.S. Wan, Investigations of the effect of curing conditions on the structure and stability of amino-functionalized organic films on silicon substrates by Fourier transform infrared spectroscopy, ellipsometry, and fluorescence microscopy, *Surf. Sci.* 602 (2008) 3323–3330.
- [26] N. Perkas, G. Amirian, G. Applerot, E. Efendiev, Y. Kaganovskii, A.V. Ghule, et al., Depositing silver nanoparticles on/in a glass slide by the sonochemical method, *Nanotechnology* 19 (2008) 435604.
- [27] A. Panacek, L. Kvitek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, et al., Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16248–16253.
- [28] J. Devillers, A. Chezeau, V. Poulsen, E. Thybaud, Effects of ethylene glycol ethers on the reproduction of *Ceriodaphnia dubia*, *Chemosphere* 50 (2003) 373–376.
- [29] J. Zhu, Y.-L. Feng, B. Aikawa, A positive chemical ionization GC/MS method for the determination of airborne ethylene glycol and propylene glycols in non-occupational environments, *J. Environ. Monit.* 6 (2004) 881–887.
- [30] A.H. Saberi, Y. Fang, D.J. McClements, Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification, *J. Colloid Interface Sci.* 411 (2013) 105–113.
- [31] Y. Yin, Z.-Y. Li, Z. Zhong, B. Gates, Y. Xia, S. Venkateswaran, Synthesis and characterization of stable aqueous dispersions of silver nanoparticles through the Tollens process Electronic supplementary information (ESI) available: photographs of silver mirror, and of stable dispersions of silver nanoparticles from mixi, *J. Mater. Chem.* 12 (2002) 522–527.
- [32] R. Chapman, P. Mulvaney, Electro-optical shifts in silver nanoparticle films, *Chem. Phys. Lett.* 349 (2001) 358–362.
- [33] S. Zhu, C. Fan, J. Wang, J. He, E. Liang, Self-assembled Ag nanoparticles for surface enhanced Raman scattering, *Opt. Rev.* 20 (2013) 361–366.
- [34] Y. Lv, H. Liu, Z. Wang, L. Hao, J. Liu, Y. Wang, et al., Antibiotic glass slide coated with silver nanoparticles and its antimicrobial capabilities, *Polym. Adv. Technol.* 19 (2008).
- [35] K.S. Suslick, Sonochemistry, *Science* 247 (1990) 1439–1445.
- [36] M. Soloviev, A. Gedanken, Coating a stainless steel plate with silver nanoparticles by the sonochemical method, *Ultrasonics Sonochem.* 18 (2011) 356–362.
- [37] S. Bhattacharyya, A. Gabashvili, N. Perkas, A. Gedanken, Sonochemical insertion of silver nanoparticles into two-dimensional mesoporous alumina, *J. Phys. Chem. C* 111 (2007) 11161–11167.
- [38] A. Abramova, A. Gedanken, V. Popov, E.-H. Ooi, T.J. Mason, E.M. Joyce, et al., A sonochemical technology for coating of textiles with antibacterial nanoparticles and equipment for its implementation, *Mater. Lett.* 96 (2013) 121–124.
- [39] A. Aersmann, *Crystallization Technology Handbook*, second ed., CRC Press, New York, 2001.

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 305 600

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*G01N 21/65* (2006.01)  
*G01N 33/58* (2006.01)  
*B82Y 30/00* (2011.01)  
*B82Y 15/00* (2011.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-771**  
(22) Přihlášeno: **10.11.2014**  
(40) Zveřejněno: **30.12.2015**  
**(Věstník č. 52/2015)**  
(47) Uděleno: **18.11.2015**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **30.12.2015**  
**(Věstník č. 52/2015)**

(56) Relevantní dokumenty:

Kvítek L. a kol., The influence of complexing agent concentration on particle size in the process of SERS active silver colloid synthesis, *Jurnal of Material Chemistry*, vol. 15, no. 10, 2005, p. 1099-1105; KEN-TYE YONG et al, Templated Synthesis of gold Nanorods: The Effects of Cosurfactants and Electrolytes on the Shape and Optical Properties, *Topics in Catalysis*, vol. 47, no. 1-2, 2008, p. 49-60; Pruček R. a kol., Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy, *Crystengcomm*, vol. 13, 2011, p. 2242-2248.  
CZ 2010-708 A3; CZ 2011-549 A3; CZ 304 160 B6; CN 103512874 A.

(73) Majitel patentu:

Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:

RNDr. Robert Pruček, Ph.D., Olbramice, CZ  
Mgr. Petr Suchomel, Letohrad, CZ  
doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc., Velký Týnec, CZ  
RNDr. Aleš Panáček, Ph.D., Uničov, CZ

(74) Zástupce:

INVENTIA s. r. o., RNDr. Kateřina Hartvichová,  
Na Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název vynálezu:

**Způsob přípravy vrstev koloidních částic  
stříbra na skleněném podkladu pro účely  
povrchem zesílené Ramanovy  
spektroskopie, vrstva koloidních částic  
stříbra na skleněném podkladu a použití  
této vrstvy**

(57) Anotace:

Řešení se týká způsobu přípravy vrstev koloidních částic stříbra na skleněném podkladu pro účely povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie, vyznačený tím, že se roztok sestávající z rozpouštědla, rozpustné stříbrné soli, amoniaku a redukčního činidla podrobí působení ultrazvuku v přítomnosti podkladu za vzniku vrstvy koloidních částic stříbra na podkladu. Dále řešení poskytuje vrstvu koloidních částic stříbra na skleněném podkladu připravitelnou tímto způsobem a její použití pro povrchem zesílenou Ramanovu spektroskopii s excitačním laserem s vlnovou délkou v rozsahu od 532 nm do 1064 nm.

CZ 305600 B6

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 28 304

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**G01J 3/44** (2006.01)

**G01N 21/00** (2006.01)

**B82B 3/00** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-30235**  
(22) Přihlášeno: **10.11.2014**  
(47) Zapsáno: **16.06.2015**

(73) Majitel:  
Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, CZ

(72) Původce:  
RNDr. Robert Prucek, Ph.D., Olbramice, CZ  
Mgr. Petr Suchomel, Letohrad, CZ  
doc. RNDr. Libor Kvítek, CSc., Velký Týnec, CZ  
RNDr. Aleš Panáček, Ph.D., Uničov, CZ  
prof. RNDr. Radek Zbořil, Ph.D., Olomouc, CZ

(74) Zástupce:  
INVENTIA s. r. o., RNDr. Kateřina Hartvichová,  
Na Bělidle 3, 150 00 Praha 5

(54) Název užitého vzoru:  
**Skleněný podklad s vrstvou koloidních  
částic stříbra pro účely povrchem zesílené  
Ramanovy spektroskopie**

CZ 28304 U1



RESEARCH ARTICLE

# Comparative Study of Antimicrobial Activity of AgBr and Ag Nanoparticles (NPs)

Petr Suchomel<sup>1,2</sup>, Libor Kvitek<sup>1,2\*</sup>, Ales Panacek<sup>1,2</sup>, Robert Pucek<sup>1,2</sup>, Jan Hrbac<sup>2</sup>, Renata Vecerova<sup>3</sup>, Radek Zboril<sup>1,2</sup>

**1** Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Czech Republic, **2** Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, Czech Republic, **3** Department of Microbiology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Czech Republic

\* [libor.kvitek@upol.cz](mailto:libor.kvitek@upol.cz)



 OPEN ACCESS

**Citation:** Suchomel P, Kvitek L, Panacek A, Pucek R, Hrbac J, Vecerova R, et al. (2015) Comparative Study of Antimicrobial Activity of AgBr and Ag Nanoparticles (NPs). PLoS ONE 10(3): e0119202. doi:10.1371/journal.pone.0119202

**Received:** September 24, 2014

**Accepted:** January 11, 2015

**Published:** March 17, 2015

**Copyright:** © 2015 Suchomel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Funding from Operational Program Research and Development for Innovations - European Regional Development Fund, project CZ.1.05/2.1.00/03.0058 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (<http://www.opvavpi.cz/>) to PS, LK, AP, RP, and RZ; Operational Program Education for Competitiveness - European Social Fund, project CZ.1.07/2.3.00/20.0056 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (<http://www.op-vk.cz/>) to PS, LK, AP, and RP; and Internal Grant of Palacky University in Olomouc, project PrF\_2014\_032 (<http://www.upol.cz/>) to PS, LK, AP, RP, and JH. The funders had no role in

## Abstract

The diverse mechanism of antimicrobial activity of Ag and AgBr nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria and also against several strains of candida was explored in this study. The AgBr nanoparticles (NPs) were prepared by simple precipitation of silver nitrate by potassium bromide in the presence of stabilizing polymers. The used polymers (PEG, PVP, PVA, and HEC) influence significantly the size of the prepared AgBr NPs dependently on the mode of interaction of polymer with Ag<sup>+</sup> ions. Small NPs (diameter of about 60–70 nm) were formed in the presence of the polymer with low interaction as are PEG and HEC, the polymers which interact with Ag<sup>+</sup> strongly produce nearly two times bigger NPs (120–130 nm). The prepared AgBr NPs were transformed to Ag NPs by the reduction using NaBH<sub>4</sub>. The sizes of the produced Ag NPs followed the same trends – the smallest NPs were produced in the presence of PEG and HEC polymers. Prepared AgBr and Ag NPs dispersions were tested for their biological activity. The obtained results of antimicrobial activity of AgBr and Ag NPs are discussed in terms of possible mechanism of the action of these NPs against tested microbial strains. The AgBr NPs are more effective against gram-negative bacteria and tested yeast strains while Ag NPs show the best antibacterial action against gram-positive bacteria strains.

## Introduction

Silver nanoparticles (Ag NPs) and nanoparticles of insoluble silver compounds such as Ag<sub>2</sub>O, AgOH or AgX (X = Cl, Br or I) became one of the most discussed branches of nanoscience in the several last decades [1]. Ag NPs attract great attention in the scientific research because of their unique physical, chemical, optical and biological properties which predetermine them for use in various chemical, medical and industrial applications [2]. Nowadays, diverse biological properties, namely antifungal, antiviral and particularly antibacterial activities together with cytotoxicity of silver NPs are intensely studied because of expected inability of bacteria to develop resistance against their antibacterial action. According to this, silver based nanomaterials

study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

find their use in medicine (catheters, implants, prostheses) [3–7], and are used to improve commercial products (textiles, deodorants) [8–10].

The antibacterial effect of silver based nanomaterials, such as metallic silver nanoparticles as well as nanoparticles of silver compounds, was reported by many researchers [11–12], but unfortunately, the reported results were not compared with each other. It was revealed that antibacterial effect is not specific at a single level but consists of several modes of action. It was shown, that silver based nanomaterials can disrupt bacterial metabolic processes [13–14], interact with DNA [15], increase the cytoplasmic membrane permeability [16–17] etc. Due to this multi-level mode of action, silver based nanomaterials reveal extraordinary activity not only against sensitive bacterial strains but also against highly resistant bacterial strains [18–19]. On the other hand it was observed resistance to ionic silver [20]. Despite the fact, that resistance to ionic silver originating from the ability of bacteria to reduce  $\text{Ag}^+$  to less toxic oxidation state or from active efflux of  $\text{Ag}^+$  from the cell was reported [21], no data proving resistance to metallic Ag nanoparticles were published. Naturally, the antibacterial effect of silver and silver based nanoparticles is dependent on particle morphology and surface characteristics [22–24]. Hence, it is necessary to find nanoparticles by the means of size, shape and surface modification appropriate for use in the biological applications.

Silver NPs can be prepared many different ways but wet chemical reduction methods unambiguously predominate. Silver NPs can be prepared by the reduction of either, soluble and insoluble silver compounds [25]. Typical synthetic method is based on the reduction of silver nitrate by sodium borohydride which is one of the strongest reducing agents and therefore very small Ag NPs are produced [26]. However, a great number of milder reducing agents can be used for the production of silver NPs with various sizes, size distributions, shapes and morphologies [27–30]. A noteworthy example is e.g. the utilization of reducing saccharides which are weak reducing agents allowing for the preparation of bigger Ag NPs with sizes in the range of several tens of nm [31–32]. In addition to widespread use of soluble silver salts, insoluble Ag (I) compounds can also be used as starting materials for the silver nanoparticles' preparation. Commonly, insoluble Ag(I) compounds are prepared in the form of nanoparticles by precipitation reactions of silver salt and appropriate reactant containing suitable counterion (e.g. hydroxide, halide, sulfide etc.) The most studied insoluble Ag(I) compounds are  $\text{Ag}_2\text{O}$  [33–34],  $\text{Ag}_2\text{S}$  [35–37],  $\text{AgOH}$  [38] or  $\text{AgX}$  (where  $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}$  or  $\text{I}$ ) [39–41]. The nanoparticles of silver halides can be prepared in the variety of morphological forms. Typically, the AgCl NPs can be prepared in the form of cubic nanoparticles with sizes between 120 and 250 nm [42] or nanowires that are composed from nanoparticles with diameters of tens of nanometers [43]. AgBr NPs can be prepared in the form of spheres with sizes of units of nm [44], spherical nanoparticles with sizes from 70 up to 140 nm [45], porous spherical structures with average dimensions of about 150–200 nm and pore size of about 5–10 nm [46] or bipyramids and polyhedrons [47]. Finally, AgI NPs can be prepared in the form of plate-like nanoparticles with polygonal faces of diameter equal to 300 nm and the thickness of 50 nm [48] as well as also in the form of spherical nanoparticles with diameter of several tens of nm [49–50] or hundreds nm [51]. The primarily prepared silver insoluble compound nanoparticles can be converted by the reduction to the Ag NPs. Besides chemical reduction method, electrochemical reduction or photoreduction by UV irradiation (especially in the case of silver halides) can also be used for this purpose [52–54]. In the case of chemical reduction a variety of reducing agents can be used similarly to the case of soluble silver compounds' reduction. Naturally, the use of different reducing agents leads to the formation of Ag NPs with various sizes and shapes [55–56]. Despite the fact that Ag NPs preparation methods based on the reduction of insoluble silver salts are not as widely examined as is the reduction of soluble silver salts, insoluble silver salt reduction methods could pose some advantages such as simple preparation of thin films or composites because of

better affinity of silver compounds to the carrier compared to metallic silver [57–59]. Also, preparation of stable nanoparticles with very small diameters is feasible using this method [60].

Therefore, preparation of AgBr nano and submicro particles, their subsequent reduction to the silver NPs and the comparison of antibacterial activities of them are the main objective of this work. AgBr was precipitated in the presence of various polymer stabilizers in order to prepare suitable and stable particles for their subsequent transformation to Ag NPs by the reduction process. Antimicrobial activities of both AgBr particles and silver NPs were compared.

## Materials and Methods

### Chemical and biological material

Silver nitrate (Sigma-Aldrich, p.a.) and potassium bromide (Lachema, p.a.) were used for the synthesis of AgBr particles. Polyethylene glycol (PEG, M.W. 10 000, Sigma-Aldrich, p.a.), polyvinyl pyrrolidone 360 (PVP, M.W. 360 000, Sigma-Aldrich, p.a.), polyvinyl alcohol (PVA, M.W. 85 000–146 000, Sigma-Aldrich, 98–99% hydrolyzed) and 2-hydroxyethyl cellulose (HEC, M.W. 90 000, Sigma-Aldrich) were used as stabilizing substances in the process of AgBr particles' preparation. Prepared AgBr particles were reduced by using of sodium borohydride (Sigma-Aldrich, p.a.). All chemicals were used without additional purification. Deionized water (18 M $\Omega$ -cm, Millipore) was used to prepare all solutions.

For the purpose of antibacterial and antifungal assays Mueller-Hinton broth (Difco Becton Dickinson) was used as a cultivation medium. The following reference strains (labeling according to Czech Collection of Microorganisms, Czech Republic) were used: *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955. The strains isolated from the blood of patients hospitalized at the University Hospital Olomouc (Czech Republic): *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* (VRE), *Klebsiella pneumoniae* (ESBL), *Candida albicans* I, *Candida albicans* II, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* were also used.

### Characterization techniques

The prepared silver bromides as well as metallic silver nanoparticles were characterized by dynamic light scattering (Zeta Plus, Brookhaven Instr. Co., USA) and UV-Vis spectroscopy (Spectord S600, Analytic Jena AG, Germany) techniques. Additionally, AgBr NPs were characterized by atomic force microscopy (NTEGRA Aura, NT-MDT, Russia), and silver nanoparticles were characterized by transmission electron microscopy (JEM 2010, Jeol Ltd., Japan).

### Synthesis of AgBr nanoparticles

The colloidal dispersions of silver bromide nanoparticles were prepared by rapid injection of potassium bromide into the solution of silver nitrate under vigorous stirring at final concentrations of  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/L (KBr) and  $1 \cdot 10^{-3}$  mol/L (AgNO<sub>3</sub>) respectively in the reaction system. For the purpose of size modification and stabilization of AgBr NPs formed in the reaction system three synthetic (PVA, PEG and PVP) and one natural polymer (polysaccharide HEC) were tested as stabilizers. Stabilizers were added into KBr solution prior to the precipitation at the final concentration in resulting AgBr dispersion equal to 0.1% (w/w). Five minutes after precipitation, the sizes and size distributions of the prepared AgBr NPs were determined by dynamic light scattering (DLS) technique. At the same time the samples for the determination of size and morphology of prepared silver bromide nanoparticles by AFM were collected. For the

purpose of AFM measurements, a drop of AgBr dispersion was spread on foil and allowed to dry at 50°C in the dark. The attempt at characterizing the prepared AgBr particles by transmission electron microscopy (TEM) was unsuccessful due to rapid reduction of AgBr particles in the electron beam of the microscope.

## Synthesis of Ag NPs by reduction of AgBr nanoparticles

For the synthesis of Ag NPs, freshly prepared AgBr dispersions were reduced by using NaBH<sub>4</sub>. AgBr NPs were reduced by rapid injection of 5 ml of 6·10<sup>-2</sup> mol/L sodium borohydride into the 25 ml of AgBr dispersion under vigorous stirring. Fresh solutions of sodium borohydride were applied for the reduction process which was performed at the laboratory temperature. The reduction process was completed after 20 minutes when color of the reaction system changed to light or dark yellow (depending on used polymer), indicating the presence of silver nanoparticles. Final concentration of sodium borohydride was 1·10<sup>-2</sup> mol/L. The prepared silver nanoparticles were characterized by DLS, UV-Vis spectroscopy and TEM methods. Additionally, kinetic curves of silver bromide reduction were recorded by using of the UV-Vis spectroscopy.

## Antibacterial and antifungal assay

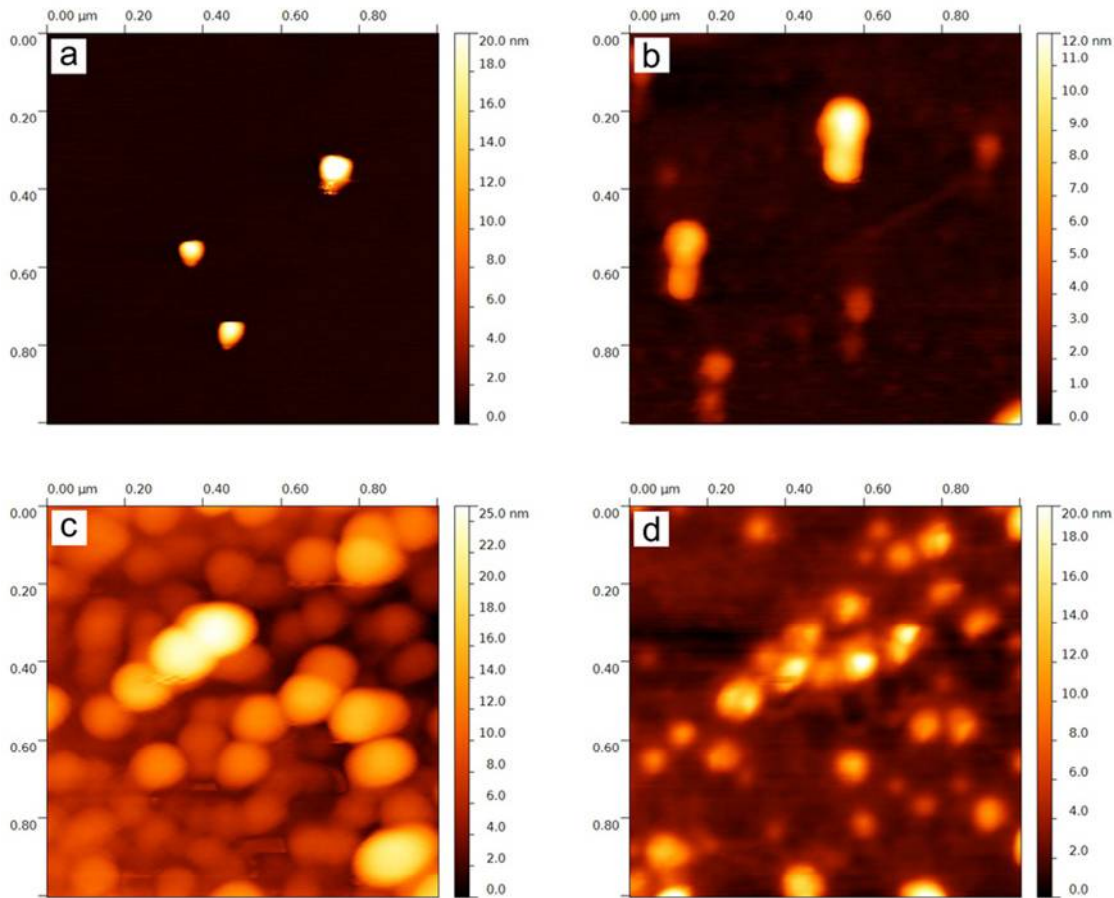
Antibacterial and antifungal efficacies of the prepared AgBr and Ag NPs were tested using the standard dilution method which enables to determine the minimum inhibitory concentrations (MICs) of the tested samples necessary to inhibit the growth of the bacterial strains and yeasts. For the purpose of antimicrobial testing, aqueous dispersions of AgBr and Ag NPs at the silver concentration equal to 108 mg/L for AgBr colloid and 89.6 mg/L for Ag dispersions were used. The testing was carried out in microtitration plates where the tested samples were diluted by the culture medium (Mueller Hinton Broth, Difco, France) in a geometric progression from 2 to 128 times. Culture medium was inoculated with the tested bacteria or yeast at a concentration of 10<sup>5</sup> to 10<sup>6</sup> CFU/mL. After 24-h incubation at 37°C, the MICs of AgBr and Ag nanoparticles were read as the lowest concentrations of the tested substance inhibiting the visible growth of microorganisms.

## Results and Discussion

### Synthesis of AgBr nanoparticles

Silver bromide nanoparticles were prepared simply by mixing the reaction components at desired ratio in the presence of four different polymers which affect the morphology and size of the prepared AgBr NPs. Due to the problem with reduction of AgBr NPs by electron beam of the electron microscope, the AFM measurements were utilized as primary characterization technique. Images from AFM (Fig. 1) show that prepared silver bromide nanoparticles have rotational ellipsoidal shape with average height from 11 nm up to 18 nm and average diameter from 60 nm up to 160 nm depending of the used polymer additive (Table 1).

The used polymers can be divided into two groups based on the level of interaction with Ag<sup>+</sup> ions in the solution. The level of interaction is primarily dependent on the chemical composition of each polymer and on the polymer structure. The first group contains PVP and PVA polymers which functional groups are located outside the polymer chain. These are—OH group in the case of PVA and = O group in the case of PVP. Additionally, PVP contains atoms of nitrogen in the molecule and therefore it can interact with Ag<sup>+</sup> ions as a Lewis base. The Ag<sup>+</sup> ions bind with these functional groups of PVA and PVP respectively to form complexes in the reaction system [61–65]. The complexation of Ag<sup>+</sup> ions is slowing down the formation of new phase nuclei during the precipitation leading to a smaller amount of nuclei formed in each



**Fig 1. AFM images of AgBr nanoparticles prepared in the presence of a) PEG, b) PVP, c) PVA and d) HEC.**

doi:10.1371/journal.pone.0119202.g001

reaction system. This effect results in the formation of larger AgBr particles in the presence of PVP and PVA polymers [66]. Even though PEG and HEC also contain oxygen heteroatoms in their molecules, these polymers do not interact with silver as strongly as PVP or PVA. For these polymers, the formation of complexes with Ag<sup>+</sup> ions has not been described in the literature. This is because of oxygen atoms are incorporated into polymer chain and therefore they

**Table 1. Particle sizes of AgBr nanoparticles prepared in the presence of various polymers obtained by AFM and DLS techniques.**

Polymer		AFM (nm)	DLS (nm)
PEG	height	18	105
	diameter	64	
PVP	height	10	50
	diameter	120	
PVA	height	11	70
	diameter	30	
HEC	height	12	100
	diameter	70	

doi:10.1371/journal.pone.0119202.t001



cannot participate on the coordination bond with Ag<sup>+</sup> ions. Weak interaction of PEG and HEC with silver ions results in the formation of more nuclei and leads to the growth of smaller AgBr NPs compared to those prepared in the presence of PVP and PVA. The same amount of silver in each reaction system must be divided among large number of growing nuclei. This assumption corresponds well with AFM measurements but unfortunately there is a disagreement between the results obtained by AFM and DLS at first sight (Table 1, S1 Fig.). This discrepancy can be explained by the affinity of functional groups of used polymers to silver. PVP and PVA are much more strongly adsorbed onto the surfaces of AgBr NPs than PEG and HEC. Therefore, AgBr NPs readily aggregate in the presence of PEG and HEC which are not strong stabilizing agents and the aggregates negatively affect the results of DLS measurements.

### Synthesis of Ag NPs by reduction of AgBr nanoparticles

Silver nanoparticles were prepared by the reduction of previously prepared AgBr by NaBH<sub>4</sub> and were characterized by DLS, TEM and UV-Vis spectroscopy. The results obtained from DLS measurements (Table 2, S2 Fig.) indicate the presence of silver NPs with various sizes from 8 up to 40 nm depending on the used polymer. The effective diameters of silver nanoparticles measured by DLS were verified by transmission electron microscopy (Table 2). The obtained TEM images were examined by image analysis which confirmed the formation of silver nanoparticles with average diameter under 10 nm in the presence of PEG and HEC, and with sizes around 20 nm in the case of PVA and PVP additives (Fig. 2).

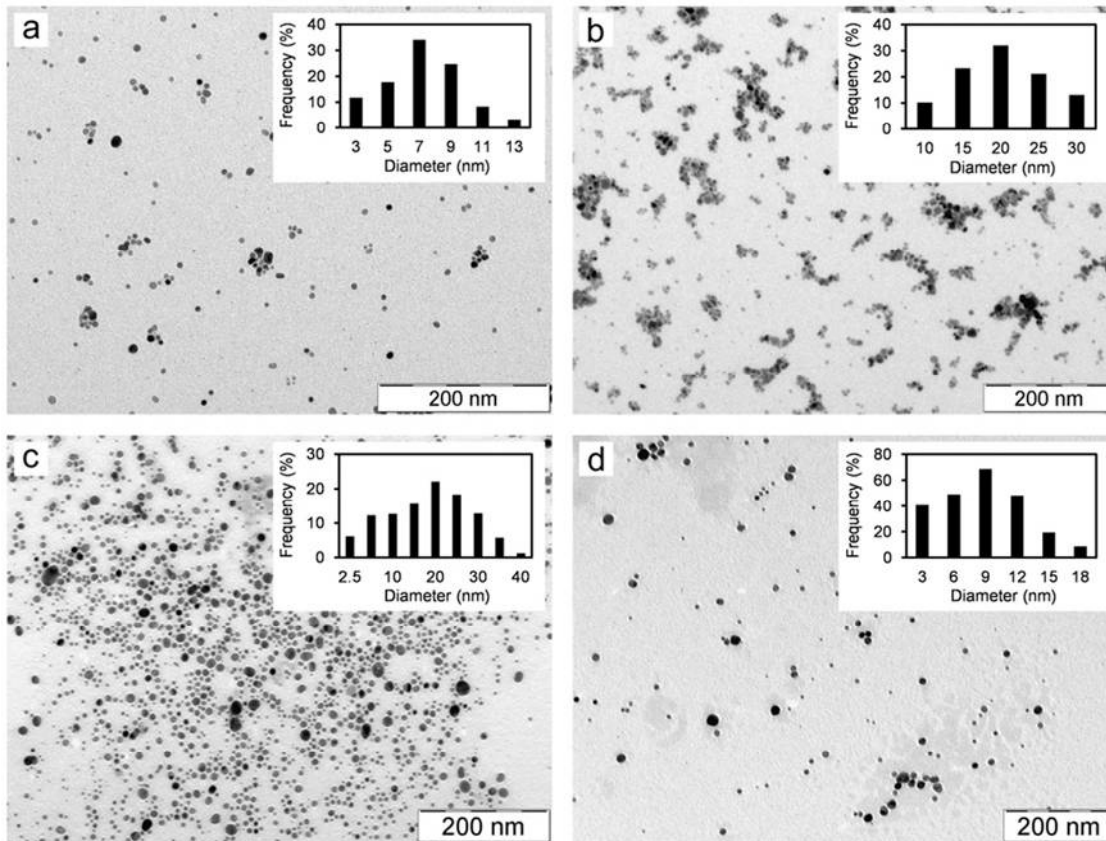
UV-Vis absorption spectra of all synthesized silver NPs (Fig. 3) confirm the DLS and TEM results. Dispersions of silver NPs stabilized by PEG and HEC reveal strong absorption peak with maximum around the wavelength of 400 nm indicating the presence of small nanoparticles with size of about 10 nm. Silver NPs stabilized by PVP show shift in the absorption peak maximum to the wavelength of 410 nm indicating the presence of nanoparticles bigger than those formed in the systems with PEG and HEC polymers. In the case of PVA, two absorption maxima located at the wavelength below 400 nm and at 420 nm respectively are observed. This fact indicates more polydisperse system, which is also confirmed by TEM images. The first absorption peak can be assigned to very small nanoparticles with diameter less than 10 nm. The second peak can be attributed to the bigger nanoparticles with sizes up to 30 nm. In order to determine of the mechanism of added polymers' influence on the formation of Ag NPs, the kinetics of the AgBr NPs reduction by NaBH<sub>4</sub> was examined by recording the UV-Vis spectra during the course of reduction process (Fig. 4). Kinetic measurements show different rates of the AgBr NPs reduction depending on the used polymer. On the basis of the overall reduction rate it is possible to divide the reaction systems into two groups which nicely correlate with above discussed mode interaction of Ag<sup>+</sup> ions and polymers in the reaction system during AgBr precipitation process.

PVP and PVA polymers exhibit higher affinity to silver which results in blocking of AgBr particle surface during the reduction process. Because of that the reaction takes place only at

**Table 2. Average diameter (nm) / polydispersity of Ag NPs prepared by the reduction of AgBr NPs by the NaBH<sub>4</sub> in the presence of various polymers obtained by DLS and TEM techniques.**

Polymer	DLS	TEM
PEG	9 / 0.464	7 / 0.343
PVP	21 / 0.195	20 / 0.294
PVA	18 / 0.482	18 / 0.517
HEC	9 / 0.512	9 / 0.456

doi:10.1371/journal.pone.0119202.t002



**Fig 2. TEM images and distribution diagrams of Ag NPs prepared in the presence of a) PEG, b) PVP, c) PVA and d) HEC.**

doi:10.1371/journal.pone.0119202.g002

several locations on particle surface which results in the formation of bigger final silver nanoparticles. On the other hand, faster reduction was observed in the presence of PEG and HEC polymers. These polymers with lower affinity to AgBr surface do not exhibit strong adsorption and consequently higher number of active sites on the particle surface is accessible for the reducing agent. Therefore, reduction of AgBr NPs proceeds much faster on a greater number of active sites and the primary AgBr NPs yield many smaller silver nanoparticles by the reduction process (Fig. 5).

The above discussed impact of the used polymers on AgBr nanoparticles' reduction was confirmed by performing the electrochemical reduction of  $\text{Ag}^+$  ions in the presence of individual polymers by the technique of cyclic voltammetry on Pt electrode with scan rate of 0.1 V/s. All studied polymers excluding HEC negatively affect the electrochemical reduction of  $\text{Ag}^+$  ions which is reflected by decrease in the reduction currents and by shifting of cathodic peaks toward negative potentials compared to the reduction of pure  $\text{Ag}^+$  ions (S3 Fig.). This effect is mainly caused by the formation of  $\text{Ag}^+$  complexes with added polymers which is connected with observed reduction potential shift. A specific (catalytic) effect on electrochemical process of  $\text{Ag}^+/\text{Ag}$  was found for HEC polymer. HEC behaves as a weak reducing agent and therefore more complicated cyclic voltammogram was observed in this case especially when the scan rate was increased up to 1 V/s (S4 Fig.). In this case the second reduction peak connected with electrocatalytic effect of HEC is observed and on the reverse scan a sharp increase of anodic current due to direct oxidation of HEC is also observed.

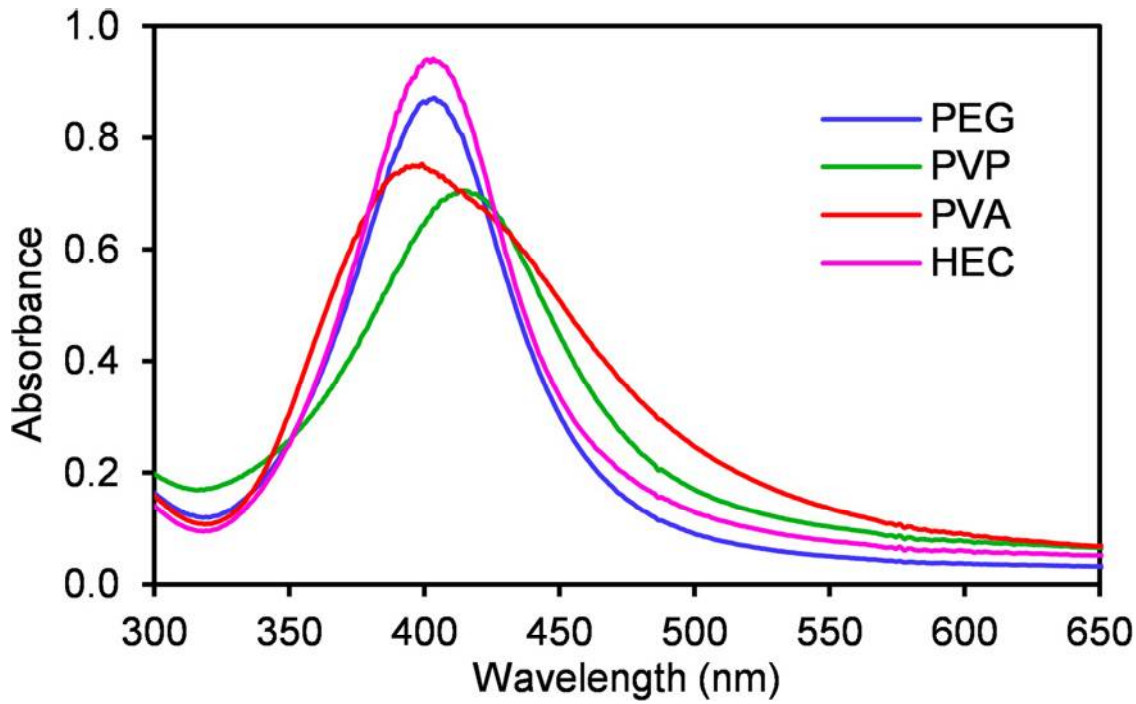


Fig 3. UV-Vis spectra of ten times diluted Ag NPs in aqueous dispersions prepared by the reduction of AgBr NPs by NaBH<sub>4</sub> in the presence of a) PEG, b) PVP, c) PVA and d) HEC.

doi:10.1371/journal.pone.0119202.g003

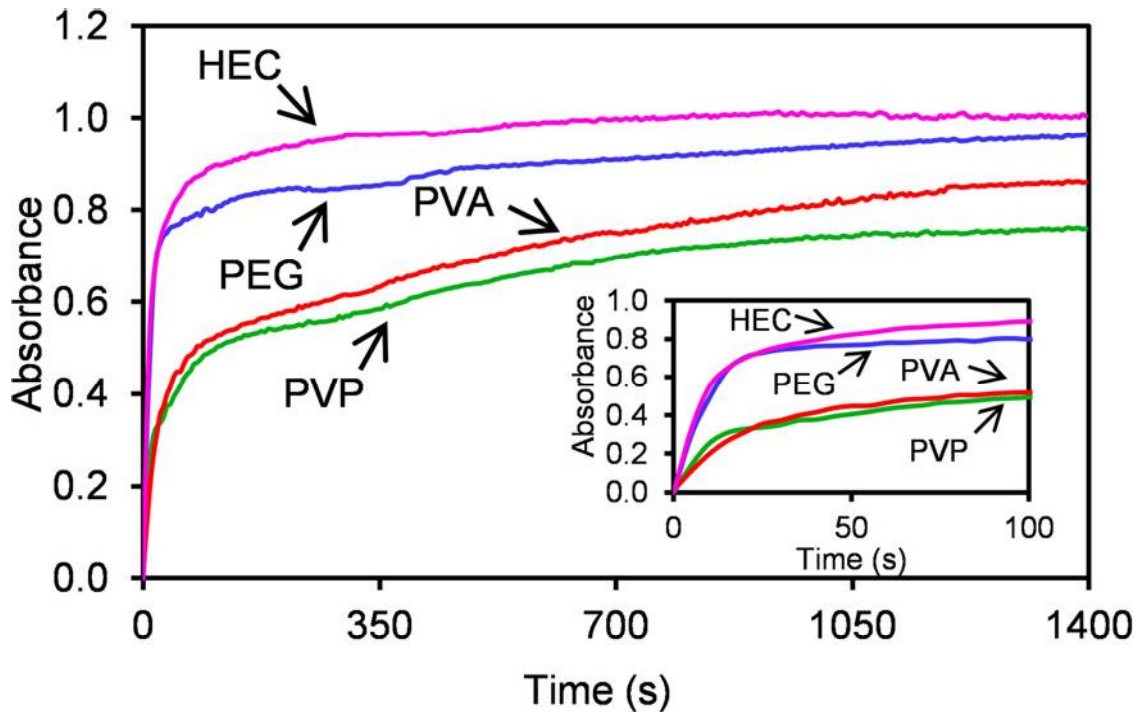
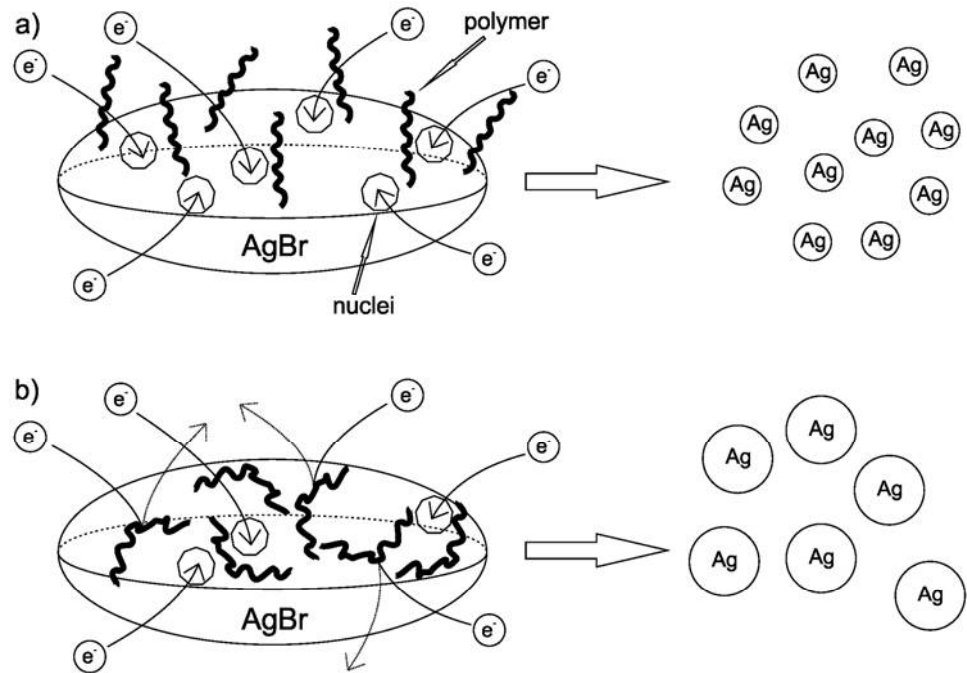


Fig 4. Kinetic curves for AgBr nanoparticles reduction by NaBH<sub>4</sub> in the presence of studied polymers ( $\lambda_{max}$  represent position of absorption maxima) and zoom of the first 60 seconds (inset).

doi:10.1371/journal.pone.0119202.g004





**Fig 5. Schematic illustration of nucleation and formation process of Ag NPs from AgBr NPs affected by a) PEG or HEC and b) PVP or PVA.**

doi:10.1371/journal.pone.0119202.g005

### Antibacterial and antifungal activity of AgBr and Ag nanoparticles

Antibacterial and antifungal activities of the prepared AgBr and Ag NPs were tested on 9 strains of bacteria and 4 strains of candida. Table 3 shows the obtained experimental data in the form of minimum inhibitory concentrations (MIC) that were recalculated on the total

**Table 3. Minimum inhibitory concentrations (mg/L) of silver bromide nanoparticles, silver nanoparticles and ionic silver against gram-positive (+) and gram-negative (-) bacteria and against yeast pathogens recalculated on total silver concentration prepared in the presence of selected polymers.**

	PEG AgBr	Ag <sup>0</sup>	PVP AgBr	Ag <sup>0</sup>	PVA AgBr	Ag <sup>0</sup>	HEC AgBr	Ag <sup>0</sup>	x Ag <sup>+</sup>
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224 (+)	13.5	5.1	13.5	20.2	13.5	20.2	13.5	5.1	13.5
<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953 (+)	13.5	5.1	13.5	10.1	13.5	5.1	13.5	2.5	13.5
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954 (-)	3.4	5.1	6.7	5.1	6.7	5.1	6.7	2.5	3.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 3955 (-)	0.8	2.8	0.8	2.5	0.8	2.5	0.8	2.5	3.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (-)	0.8	2.5	0.8	2.5	1.7	2.5	1.7	2.5	3.4
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+)	1.7	2.5	3.4	2.5	3.4	2.5	3.4	1.3	6.7
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)(+)	13.5	5.1	13.5	10.1	13.5	5.1	13.5	2.5	13.5
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)(+)	13.5	5.1	6.7	10.1	6.7	5.1	6.7	5.1	13.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ESBL) (-)	3.4	5.1	3.4	5.1	3.4	2.5	3.4	5.1	3.4
<b>Antifungal effect</b>									
<i>Candida albicans</i> I	1.7	2.5	1.7	2.5	1.7	2.5	1.7	1.3	1.7
<i>Candida albicans</i> II	1.7	1.3	3.4	2.5	1.7	2.5	1.7	2.5	3.4
<i>Candida tropicalis</i>	3.4	2.5	1.7	2.5	1.7	1.3	1.7	1.3	1.7
<i>Candida parapsilosis</i>	1.7	2.5	1.7	2.5	1.7	2.5	1.7	1.3	1.7

doi:10.1371/journal.pone.0119202.t003

concentration (mg/L) of silver in the samples. The presented results represent average values from 3 separate measurements. The obtained values of MIC in the range of 0.8 and 20.2 mg/L demonstrate, that silver bromide and silver nanoparticles prepared by the described method have high antibacterial and antifungal activities that are comparable with previously published values [67–68], and the obtained MIC values remain below cytotoxicity concentrations reported in the literature [69]. Antibacterial and antifungal activities of polymers in appropriate concentrations as blank samples were tested. It was proved that none of the used polymers exhibit any antibacterial or antifungal effects in the used concentrations.

Although values of MIC obtained for AgBr and Ag NPs seem nearly the same, there are some interesting trends observed for both colloids. The AgBr NPs are evidently more active against *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* (wild strain from Olomouc University Hospital), and *Klebsiella pneumonia* (ESBL) (wild strain from Olomouc University Hospital). On the other hand, Ag NPs are more active than AgBr NPs against both tested *Staphylococcus aureus* strains. Additionally, even more interesting differences can be observed in antimicrobial activities of differently modified nanoparticles. The best antimicrobial activity was observed for Ag NPs modified by HEC polymer in which case, ten of the fourteen tested microbial strains were most effectively inhibited by this combination of metal nanoparticles and polymer modifier. It is interesting, that in all these cases the HEC modified Ag NPs have the highest antimicrobial activity not only in comparison with all other combinations of metal nanoparticles and polymer modifiers but also in comparison with ionic silver used as reference nanomaterial.

With respect to the activity of ionic silver it is possible to divide the reported antimicrobial activities of the studied combinations of metal nanoparticles and polymer modifiers into two groups according to the tested microorganisms. While in most cases significantly higher antibacterial activities of the polymer modified metal nanoparticles against bacteria strains are observed compared to antibacterial activities of ionic silver, in the cases of tested yeast pathogens the antimicrobial activities of silver nanoparticles and ionic silver are closely comparable. This observation can be undoubtedly connected to the modes of interactions of the tested materials with the used microbial strains. In the case of bacteria, which are prokaryotic microorganisms, the more effective mechanism of antimicrobial action of silver or silver bromide nanoparticles could be their destructive interaction with the cell wall rather than the penetration of silver ions into the cell and subsequent degradation of their bioactive molecules. This phenomenon was confirmed by TEM observations described in the paper of Mirzajani et al. and other researchers [70–72]. On the other hand, in the case of yeast pathogens, which are eukaryotic organisms, the efficiency of the interaction of metal nanoparticles with cell membrane and penetration of silver ions into cell seem to be nearly the same in the course of antimicrobial action. The more detailed view on the obtained results of the antimicrobial activity of tested antibiotics reveals the highest antimicrobial activity of silver nanoparticles against gram-positive bacteria (*Staphylococcus* and *Enterococcus* sp.). Evidently, the silver nanoparticles strongly interact with the peptidoglycan layer of bacteria wall and disrupt it [70] while interaction of the outer part of bacteria wall with silver ions (coming from both, soluble or insoluble silver salt) is not so devastating. The markedly lower values of MIC for silver nanoparticles in comparison to MIC of Ag<sup>+</sup> (or AgBr NPs) for most tested gram-positive bacterial strains seems to confirm this mechanism. On the other hand, interaction of silver nanoparticles with outer liposaccharide part of bacterial wall in the case of gram-negative bacteria is not so effective for bacteria growth inhibition in comparison with silver ions penetration through the cell wall inside the bacteria. Thin gram-negative bacteria wall does not constitute such critical barrier for silver ions' penetration as is the case for substantially thicker gram-positive bacteria cell wall [73]. In the latter case the combination of both above mentioned mechanisms seems to be more

effective and therefore AgBr NPs are most efficient from all of the three tested forms of silver. To confirm leaching of Ag<sup>+</sup> ions from the presented nanoparticles the concentration of ionic silver in studied systems was determined by electrochemical measurements using ISE electrode (S1 Table). The obtained values ranged around  $5 \cdot 10^{-5}$  mg/L in the cases of AgBr NPs and around  $1 \cdot 10^{-5}$  mg/L in the case of Ag NPs. Therefore, the impact of ionic silver is expected to be more significant in the antibacterial activity of AgBr NPs than in the case of Ag NPs. In general, all the tested gram-negative bacteria strains and also yeast pathogens (whose cytoplasmic membrane has similar lipid structure as the outer part of gram-negative bacteria cell wall) show higher sensitivity against antimicrobial action of the tested silver based materials than tested gram-positive bacterial strains. The lower sensitivity of gram-positive bacterial strains against silver based materials is primarily due to the thickness of peptidoglycan layer, which may prevent transport of silver based materials through the bacterial cell wall [71,73]. In the case of gram-negative bacterial strains their sensitivity against silver based materials is very similar to yeast pathogens, therefore the possible influence of differences in composition of the outer part of the cell membrane (existence of outer membrane proteins in gram-negative bacteria) seems to be negligible in the studied case.

## Conclusions

This article describes the preparation of AgBr NPs in the presence of the modifying polymers and their subsequent reduction to metallic Ag NPs using NaBH<sub>4</sub> as reducing agent. The resulting sizes of the prepared AgBr and Ag NPs significantly depend on used polymer. The main influence on the size of prepared nanoparticles has the process of the complexation of Ag<sup>+</sup> ions by functional groups of polymers. The formation of complexes between Ag<sup>+</sup> ions and—OH or = O groups of PVP and PVA respectively leads to the creation of AgBr particles with bigger sizes than those which form in the presence of PEG and HEC. On the other hand, kinetic measurements show blocking of the surface of AgBr nanoparticles by these strongly interacting polymers leading to the slower reduction and formation of bigger Ag NPs. The realized antibacterial assays showed differences between antimicrobial action of AgBr and Ag nanoparticles and Ag<sup>+</sup> ions used as reference material. The differences were connected to the interaction of the silver based materials with the cell walls of microorganisms. It was clearly proved that from the studied silver materials the gram-positive bacteria strains are most sensitive to Ag NPs probably due to destructive interaction of these NPs with the cell walls. On the other hand, AgBr NPs are more efficient against gram-negative bacteria and yeast microbial strains due to the combination of interaction of solid AgBr nanoparticles with cell walls and simultaneous penetration of Ag<sup>+</sup> ions into the cells. This observation of different antimicrobial activity of various forms of NPs based on the metallic silver or silver bromide respectively could be the guideline for the future formulations of the antimicrobials targeted to have a specific mode of action against different types of microbial strains.

## Supporting Information

**S1 Fig. Effective diameter of AgBr nanoparticles prepared in the presence of used polymers obtained by DLS technique.**

(TIF)

**S2 Fig. Effective diameter of Ag nanoparticles prepared in the presence of used polymers obtained by DLS technique.**

(TIF)

**S3 Fig. Cyclic voltammograms of Ag<sup>+</sup> ions in the presence of PEG, PVP, PVA and HEC under the scanning rate equal to 0.1 V/s.**

(TIF)

**S4 Fig. Cyclic voltammograms of Ag<sup>+</sup> ions in the presence of PEG, PVP, PVA and HEC under the scanning rate equal to 1 V/s.**

(TIF)

**S1 Table. The concentrations (mg/L) of Ag<sup>+</sup> ions in studied systems.**

(DOCX)

## Acknowledgments

The authors thank Mr. J.P. Froning and Mr. O. Tomanec for AFM measurements.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LK PS AP RP JH RV RZ. Performed the experiments: PS AP RP RV JH. Analyzed the data: LK PS JH RZ. Contributed reagents/materials/analysis tools: AP JH. Wrote the paper: PS LK JH RZ.

## References

1. Tran QH, Nguyen VQ, Le A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2013; 4: 033001.
2. Chen X, Schluesener HJ. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol Lett*. 2008; 176: 1–12. PMID: [18022772](#)
3. Rupp ME, Fitzgerald T, Marion N, Helget V, Puumala S, Anderson JR, et al. Effect of silver-coated urinary catheters: Efficacy, cost-effectiveness, and antimicrobial resistance. *Am J Infect Control*. 2004; 32: 445–450. PMID: [15573050](#)
4. Samuel U, Guggenbichler JP. Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 23 Suppl 1: 75–78.
5. Stevens KNJ, Croes S, Boersma RS, Stobberingh EE, van der Marel C, van der Veen FH, et al. Hydrophilic surface coatings with embedded biocidal silver nanoparticles and sodium heparin for central venous catheters. *Biomaterials*. 2011; 32: 1264–1269. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.10.042](#) PMID: [21093906](#)
6. Devasconcellos P, Bose S, Beyenal H, Bandyopadhyay A, Zirkle LG. Antimicrobial Particulate Silver Coatings on Stainless Steel Implants for Fracture Management. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2012; 32: 1112–1120. PMID: [22711980](#)
7. Secinti KD, Özalp H, Attar A, Sargon MF. Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants. *J Clin Neurosci*. 2011; 18: 391–395. doi: [10.1016/j.jocn.2010.06.022](#) PMID: [21256031](#)
8. Perelshtein I, Ruderman Y, Perkash N, Beddow J, Singh G, Vinatoru M, et al. The sonochemical coating of cotton withstands 65 washing cycles at hospital washing standards and retains its antibacterial properties. *Cellulose*. 2013; 20: 1215–1221.
9. Sataev MS, Koshkarbaeva ST, Tleuova AB, Perni S, Aidarova SB, Prokopovich P. Novel process for coating textile materials with silver to prepare antimicrobial fabrics. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2014; 442: 146–151.
10. Zahran MK, Ahmed HB, El-Rafie MH. Surface Modification of Cotton Fabrics for Antibacterial Application by Coating with AgNPs-Alginate composite. *Carbohydr Polym*. 2014; 108: 145–152. doi: [10.1016/j.carbpol.2014.03.005](#) PMID: [24751258](#)
11. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009; 27: 76–83. doi: [10.1016/j.biotechadv.2008.09.002](#) PMID: [18854209](#)
12. Marambio-Jones C, Hoek EMV. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanoparticle Res*. 2010; 12: 1531–1551.
13. Cui L, Chen P, Chen S, Yuan Z, Yu C, Ren B, et al. In situ study of the antibacterial activity and mechanism of action of silver nanoparticles by surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chem*. 2013; 85: 5436–5443. doi: [10.1021/ac400245j](#) PMID: [23656550](#)

14. Lara HH, Ayala-Núñez NV, Ixtapan TLC, Rodríguez PC. Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009; 26: 615–621.
15. Li W-R, Xie X-B, Shi Q-S, Duan S-S, Ouyang Y-S, Chen Y-B. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*. 2011; 24: 135–141. doi: [10.1007/s10534-010-9381-6](https://doi.org/10.1007/s10534-010-9381-6) PMID: [20938718](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20938718/)
16. Li X, Lenhart JJ, Walker HW. Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir*. 2010; 26: 16690–16698. doi: [10.1021/la101768n](https://doi.org/10.1021/la101768n) PMID: [20879768](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20879768/)
17. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005; 16: 2346–2353. doi: [10.1088/0957-4484/16/10/059](https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059) PMID: [20818017](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20818017/)
18. Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci*. 2007; 86: 2466–2471. PMID: [17954599](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17954599/)
19. Kvitck L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Prucek R, et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C*. 2008; 112: 5825–5834.
20. Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev*. 2003; 27: 341–353. PMID: [12829274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829274/)
21. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2003; 27: 313–339. PMID: [12829273](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12829273/)
22. Nateghi MR, Hajimirzababa H. Effect of silver nanoparticles morphologies on antimicrobial properties of cotton fabrics. *J Text Inst*. 2014; 105: 806–813.
23. Khurana C, Vala AK, Andhariya N, Pandey OP, Chudasama B. Antibacterial activity of silver: the role of hydrodynamic particle size at nanoscale. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102: 3361–3368. doi: [10.1002/jbm.a.35005](https://doi.org/10.1002/jbm.a.35005) PMID: [24166739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24166739/)
24. Lok C-N, Ho C-M, Chen R, He Q-Y, Yu W-Y, Sun H, et al. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J Biol Inorg Chem*. 2007; 12: 527–534. PMID: [17353996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17353996/)
25. Li R, Kim DD, Yu K, Liang H, Bai C, Li S. Study of fine silver powder from AgOH slurry by hydrothermal techniques. *J Mater Process Technol*. 2003; 137: 55–59.
26. Deng J-P, Shih W-C, Mou C-Y. Electron Transfer-Induced Hydrogenation of Anthracene Catalyzed by Gold and Silver Nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2007; 111: 9723–9728.
27. Irizarry R, Burwell L, León-Velázquez MS. Preparation and Formation Mechanism of Silver Particles with Spherical Open Structures. *Ind Eng Chem Res*. 2011; 50: 8023–8033.
28. Zielińska A, Skwarek E, Zaleska A, Gazda M, Hupka J. Preparation of silver nanoparticles with controlled particle size. *Procedia Chem*. 2009; 1: 1560–1566.
29. Qin Y, Ji X, Jing J, Liu H, Wu H, Yang W. Size control over spherical silver nanoparticles by ascorbic acid reduction. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2010; 372: 172–176.
30. Khan Z, Talib A. Growth of different morphologies (quantum dots to nanorod) of Ag-nanoparticles: role of cysteine concentrations. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010; 76: 164–169. doi: [10.1016/j.colsurfb.2009.10.029](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.029) PMID: [19954933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19954933/)
31. Panacek A, Kvitck L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, et al. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B*. 2006; 110: 16248–16253. PMID: [16913750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16913750/)
32. Niitsoo O, Couzis A. Facile synthesis of silver core—silica shell composite nanoparticles. *J Colloid Interface Sci*. 2011; 354: 887–890. doi: [10.1016/j.jcis.2010.11.013](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.11.013) PMID: [21145562](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21145562/)
33. Khaydarov R a., Khaydarov RR, Gapurova O, Estrin Y, Scheper T. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *J Nanoparticle Res*. 2008; 11: 1193–1200.
34. Rahman MM, Bahadar Khan S, Jamal A, Faisal M, Asiri AM. Fabrication of highly sensitive acetone sensor based on sonochemically prepared as-grown Ag<sub>2</sub>O nanostructures. *Chem Eng J*. 2012; 192: 122–128.
35. Chih Y-K, Yang M-C. Simultaneous detection of dopamine and ascorbic acid using silver/silver sulfide modified carbon nanotube electrodes. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2014; 45: 833–839.
36. Yeo SY, Tan WL, Abu Bakar M, Ismail J. Silver sulfide/poly(3-hydroxybutyrate) nanocomposites: Thermal stability and kinetic analysis of thermal degradation. *Polym Degrad Stab*. 2010; 95: 1299–1304.
37. Yang L, Liu S-H, Zhang B-F, Xing R-M, Wang H-J, Zhou J-G. The synthesis and crystallization mechanism of protein-conjugated silver sulfide nanowires with hierarchical structure. *Mater Lett*. 2010; 64: 1598–1600.
38. Chen D, Qiao X, Chen J. Morphology-controlled synthesis of silver nanostructures via a solvothermal method. *J Mater Sci Mater Electron*. 2011; 22: 1335–1339.



39. Husein MM, Rodil E, Vera JH. A novel method for the preparation of silver chloride nanoparticles starting from their solid powder using microemulsions. *J Colloid Interface Sci.* 2005; 288: 457–467. PMID: [15927613](#)
40. Abbasi AR, Morsali A, Reza A, Ali A. Synthesis and Characterization of AgBr—Silk Nanocomposite Under Ultrasound Irradiation. *J Inorg Organomet Polym Mater.* 2010; 20: 825–832.
41. Liang H, Li C, Bai J, Zhang L, Guo L, Huang Y. Synthesis and characterization of AgI nanoparticles in  $\beta$ -CD/PAN nanofibers by electrospinning method. *Appl Surf Sci.* 2013; 270: 617–620.
42. Chiu C-K, Choi Y-J, Luo T-JM. Formation of AgCl Cubic Crystals Induced by Shrinkage of Sol—Gel Silica Film. *Cryst Growth Des.* 2012; 12: 4727–4732.
43. Sun C, Chen P, Zhou S. AgCl nanoparticle nanowires fabricated by template method. *Mater Lett.* 2007; 61: 1645–1648.
44. Husein MM, Rodil E, Vera JH. A novel approach for the preparation of AgBr nanoparticles from their bulk solid precursor using CTAB microemulsions. *Langmuir.* 2006; 22: 2264–2272. PMID: [16489816](#)
45. Ray M, Paria S. Growth Kinetics of Silver Bromide Nanoparticles in Aqueous Nonionic Surfactant Solutions. *Ind Eng Chem Res.* 2011; 50: 11601–11607.
46. Yang M, Zhao JJ-G, Li JJ-J. Synthesis of porous spherical AgBr nanoparticles in the presence of gelatin using AgCl as the precursor. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2007; 295: 81–84.
47. Wang H, Lang X, Gao J, Liu W, Wu D, Wu Y, et al. Polyhedral AgBr microcrystals with an increased percentage of exposed {111} facets as a highly efficient visible-light photocatalyst. *Chemistry.* 2012; 18: 4620–4626. doi: [10.1002/chem.201102694](#) PMID: [22392812](#)
48. Guo Y, Lee J, Maier J. Preparation and characterization of AgI nanoparticles with controlled size, morphology and crystal structure. *Solid State Ionics.* 2006; 177: 2467–2471.
49. Chen S, Ida T, Kimura K. Thiol-Derivatized AgI Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Optical Properties. *J Phys Chem B.* 1998; 102: 6169–6176.
50. Hawari NL, Johan MR. Synthesis and characterizations of AgI nanoparticles via mechanochemical reaction. *J Alloys Compd.* 2011; 509: 2001–2006.
51. Yang M, Zhou K. Synthesis and characterizations of spherical hollow composed of AgI nanoparticle using AgBr as the precursor. *Appl Surf Sci.* 2011; 257: 2503–2507.
52. Cheng Y, Yan M, Jiang Z. Electrochemical Behavior and Reduction Mechanism of High Valence Silver Oxide in Alkaline Solution. *Electrochem Solid-State Lett.* 2007; 10: F5–F8.
53. Xu G, Qiao X, Qiu X, Chen J. Preparation and characterization of stable monodisperse silver nanoparticles via photoreduction. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2008; 320: 222–226.
54. Spirin MG, Brichkin SB, Razumov VF. Phenidone Oxidation during Photoinitiated Chemical Reduction of AgBr Nanocrystals in Water Pools of Reverse Micelles. *Colloid J.* 2002; 64: 364–368.
55. Chang S, Chen K, Hua Q, Ma Y, Huang W. Evidence for the Growth Mechanisms of Silver Nanocubes and Nanowires. *J Phys Chem C.* 2011; 115: 7979–7986.
56. Dong X, Ji X, Jing J, Li M, Li J, Yang W. Synthesis of Triangular Silver Nanoprisms by Stepwise Reduction of Sodium Borohydride and Trisodium Citrate. *J Phys Chem C.* 2010; 114: 2070–2074.
57. Zienkiewicz-Strzałka M, Pasieczna-Patkowska S, Kozak M, Pikus S. Silver nanoparticles incorporated onto ordered mesoporous silica from Tollen's reagent. *Appl Surf Sci.* 2013; 266: 337–343.
58. Lahtinen RMR, Mertens SFLS, East E, Kiely CJ, Schiffrin DJ. Silver Halide Colloid Precursors for the Synthesis of Monolayer-Protected Clusters. *Langmuir.* 2004; 20: 3289–3296. PMID: [15875860](#)
59. Zhang J, Li X, Liu K, Cui Z, Zhang G, Zhao B, et al. Thin Films of Ag Nanoparticles Prepared from the Reduction of AgI Nanoparticles in Self-Assembled Films. *J Colloid Interface Sci.* 2002; 255: 115–118. PMID: [12702375](#)
60. Halouzka V, Jakubec P, Kvitek L, Likodimos V, Kontos AG, Papadopoulos K, et al. Deposition of Nanostructured Ag Films on Silicon Wafers by Electrochemical/Electrophoretic Deposition for Electrochemical and SERS Sensing. *J Electrochem Soc.* 2013; 160: B54–B59.
61. Khanna PK, Singh N, Charan S, Subbarao VVVS, Gokhale R, Mulik UP. Synthesis and characterization of Ag/PVA nanocomposite by chemical reduction method. *Mater Chem Phys.* 2005; 93: 117–121.
62. El-Shamy AG, Attia W, Abd El-Kader KM. The optical and mechanical properties of PVA-Ag nanocomposite films. *J Alloys Compd.* 2014; 590: 309–312.
63. Juby KA, Dwivedi C, Kumar M, Kota S, Misra HS, Bajaj PN. Silver nanoparticle-loaded PVA/gum acacia hydrogel: Synthesis, characterization and antibacterial study. *Carbohydr Polym.* 2012; 89: 906–913. doi: [10.1016/j.carbpol.2012.04.033](#) PMID: [24750879](#)
64. Wang H, Qiao X, Chen J, Wang X, Ding S. Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mater Chem Phys.* 2005; 94: 449–453.

65. Mdluli PS, Sosibo NM, Mashazi PN, Nyokong T, Tshikhudo RT, Skepu A, et al. Selective adsorption of PVP on the surface of silver nanoparticles: A molecular dynamics study. *J Mol Struct*. 2011; 1004: 131–137.
66. Zhang Z, Zhao B, Hu L. PVP Protective Mechanism of Ultrafine Silver Powder Synthesized by Chemical Reduction Processes. *J Solid State Chem*. 1996; 121: 105–110.
67. Lu Z, Rong K, Li J, Yang H, Chen R. Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *J Mater Sci Mater Med*. 2013; 24: 1465–1471. doi: [10.1007/s10856-013-4894-5](https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5) PMID: [23440430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23440430/)
68. Kvitek L, Panacek A, Soukupova J, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, et al. Effect of Surfactants and Polymers on Stability and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (NPs). *J Phys Chem C*. 2008; 112: 5825–5834.
69. Panacek A, Kolar M, Vecerova R, Pucek R, Soukupova J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009; 30: 6333–6340. doi: [10.1016/j.biomaterials.2009.07.065](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.065) PMID: [19698988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19698988/)
70. Mirzajani F, Ghassempour A, Aliahmadi A, Esmaeili MA. Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Res Microbiol*. 2011; 162: 542–549. doi: [10.1016/j.resmic.2011.04.009](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.04.009) PMID: [21530652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21530652/)
71. Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 2171–2178. doi: [10.1128/AEM.02001-07](https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07) PMID: [18245232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18245232/)
72. Ghosh IN, Patil SD, Sharma TK, Srivastava SK, Pathania R, Navani NK. Synergistic action of cinnamaldehyde with silver nanoparticles against *E. coli*. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 4721–4731. doi: [10.2147/IJN.S49649](https://doi.org/10.2147/IJN.S49649) PMID: [24376352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24376352/)
73. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res*. 2000; 52: 662–668. PMID: [11033548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11033548/)



Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 59131

## Capillary isotachopheresis for separation of silver nanoparticles according to size

Petr Praus,<sup>\*ab</sup> Martina Turicová,<sup>a</sup> Petr Suchomel<sup>c</sup> and Libor Kvítek<sup>c</sup>

Capillary isotachopheresis (ITP) was used for the separation of Ag nanoparticles according to their size. For this purpose, ethanol–water dispersions of Ag nanoparticles stabilized by gelatin were prepared. The ITP separations were performed in a column-coupling system filled with two electrolytes with a pH of leading electrolytes of 7.1 (system I – LE: 10 mM HNO<sub>3</sub>, ε-aminocaproic acid, TE: 10 mM caproic acid) and 4.5 (system II – LE: 10 mM HNO<sub>3</sub>, imidazole, TE: 5 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid). In both electrolyte systems the four main peak-mode zones of Ag nanoparticles migrating at zone boundaries were identified, however, the better separation was achieved by the system II. The Ag nanoparticle dispersions were also examined by dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). The zeta potential and thickness of gelatin double layers adsorbed on the nanoparticles were found to depend on pH. The TEM analysis revealed four size fractions of 4 nm, 10 nm, 16 nm and 22 nm, which correspond to the zones separated by ITP. Other migration zones of the electrolyte systems, such as impurities and/or products of the nanoparticle synthesis, served as spacers and separated the peak zones of the Ag nanoparticles.

Received 5th June 2015  
Accepted 30th June 2015

DOI: 10.1039/c5ra10676a

[www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

### Introduction

For more than 30 years nanomaterials have been intensively studied due to their excellent properties utilized in many science and industrial fields, such as optics, electronics, magnetic applications, solar energy conversion, medicine, environmental protection, chemistry including catalysis *etc.* For all of these applications, the size distribution of the nanoparticles is a basic characteristic. It can be determined by several common methods, such as transmission and scanning electron microscopy, atomic force microscopy, dynamic light scattering, laser diffraction, photon correlation spectroscopy, field flow fractionation<sup>1</sup> and asymmetrical flow field flow fractionation,<sup>2</sup> centrifuged particles size analysis,<sup>3</sup> hydrodynamic chromatography, size exclusion chromatography<sup>4</sup> and also by gel and capillary zone electrophoresis (CZE).<sup>5</sup>

Utilization of CZE for the study of nanoparticles' size distributions has recently been reviewed in several papers.<sup>6–14</sup> Quantum dots, noble metals (gold and silver) nanoparticles, carbon nanotubes, metal-oxide particles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), latex and polystyrene particles, silica nanoparticles and

nanoparticle–biomolecule conjugates are the most often separated nanoparticles.

Capillary isotachopheresis is well developed electrophoretic technique in which a sample is injected between leading and termination electrolytes. Ions are separated in zones with sharp boundaries moving with the same velocity. The concentrations of separated ions in their zones are adapted to the concentration of the leading ion. The loading capacity of ITP is several times higher than capacity of CZE, therefore, both methods are also used to be connected (ITP-CZE) with very high separation efficiency. ITP and/or ITP-CZE were applied for separation of quantum dots<sup>6,15–19</sup> and gold nanoparticles.<sup>16</sup> ITP was also tested for the separation of micelles of cetyltrimethylammonium bromide<sup>20</sup> and micron sized particles.<sup>21</sup>

By our best knowledge silver nanoparticles have not been separated by ITP yet. Therefore, the aim of this paper was to use ITP for determination of the size distribution of silver nanoparticles stabilized by gelatin in ethanol–water colloid dispersions. The ITP experiments were completed with TEM and DLS analyses. Electrophoretic mobilities of separated fractions were calculated from the ITP records and discussed in context of the theory of electrophoretic mobility of colloidal particles.

### Experimental

#### Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade: nitric acid, caproic acid, ε-aminocaproic acid (EACA) (all from Lachema, Czech Republic), β-alanine, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)

<sup>a</sup>Department of Chemistry, VŠB-Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic. E-mail: petr.praus@vsb.cz; Tel: +420-59-732-1675

<sup>b</sup>Institute of Environmental Technology, VŠB-Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33 Ostrava-Poruba, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Physical Chemistry, Palacký University, 17. listopadu 12, 771 46 Olomouc, Czech Republic



(Serva, Germany), imidazole (Sigma-Aldrich), silver nitrate (Sigma-Aldrich), gelatin (Fluka), ethanol (LachNer), ammonia (Sigma-Aldrich), sodium hydroxide (Penta) and maltose (Sigma-Aldrich). Twice distilled and deionised water by a mixed-bed ion-exchanger was used for preparation of all ITP electrolytes. The compositions of leading (LE) and terminating (TE) electrolytes are given in Table 1.

### Preparation of silver nanoparticles

Silver nanoparticles in ethanol–water solvent (ethanol mixed with demineralised water 2 : 3) were prepared by the modified Tollens process<sup>22</sup> and stabilized by natural polymer gelatin to prevent their aggregation. 5 ml of 5 mmol l<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub> was diluted with 2.75 ml of gelatin solution (72.7 g l<sup>-1</sup>), placed on a magnetic stirrer and vigorously stirred. Then, 10 ml of ethanol was added into the solution. Still under vigorous stirring, 1.25 ml of 0.1 mol l<sup>-1</sup> ammonia was rapidly injected and a solution mixed by 5 ml of 0.05 mol l<sup>-1</sup> maltose with 1 ml of 0.24 mol l<sup>-1</sup> sodium hydroxide was added. After adding of the reaction components, the solution was stirred for a further 30 minutes, than the prepared dispersion of silver nanoparticles was placed into plastic tubes and left aged for 24 hours.

### Isotachophoretic separation

An isotachophoretic analyzer EA 102 (Villa-Labeco, Slovakia) in the column-coupling configuration was employed. The capillaries were made from a fluorinated ethylene–propylene copolymer (FEP): a pre-separation capillary 90 × 0.8 mm ID and an analytical capillary 200 × 0.3 mm ID Both capillaries were equipped with contact conductivity detectors and, in addition, the analytical capillary was equipped with an UV-VIS detector. The driving current in the pre-separation capillary was set at 250 μA and in the analytical capillary at 50 μA in all experiments. Samples were injected through a 30 μl sampling loop. The pH values of the electrolyte systems were measured with a pH metre WTW InoLab (Weilheim, Germany).

### Absorption molecular UV-VIS spectrometry

UV-VIS absorption spectra were measured by a double-beam spectrometer Lambda 25 (Perkin Elmer, USA). All spectra were recorded using 1 cm quartz cuvettes within the range of 200 nm

to 800 nm. The cuvettes were filled with the 10 times diluted Ag aqueous dispersions with water and their absorption spectra were recorded.

### Electron transmission microscopy

Transmission electron microscopy of Ag nanoparticles was performed by a JEM 220FS microscope (Jeol, Japan) operating at 200 kV. The Ag nanoparticles were dispersed in ethanol and with ultrasonic sprayer deposited on a TEM grid with carbon holey support film.

### Zeta-potential measurement

Zeta-potential of silver nanoparticles was determined using Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, England) instrument in disposable capillary cell *via* electrophoretic light scattering method. The zeta-potential of silver nanoparticles was measured in the primarily prepared dispersions after dilution 1 : 9 using demineralised water and the leading electrolytes to modify their pH values.

## Results and discussion

In general, electrophoretic mobility  $m$  of colloidal particles is not easy to express. Colloidal particles can be considered as spherical particles with radii  $r$  surrounded by electric double layers of the thickness  $1/\kappa$ , where the parameter  $\kappa$  is proportional to the square root of ionic strength of bulk solution. Depending on dimensionless quantity  $\kappa r$ , two limiting cases were theoretically derived. First, when  $\kappa r$  is very small ( $\kappa r < 1$ ) the charged particles can be considered as point charges, Hückel derived the electrophoretic mobility as follows<sup>23</sup>

$$m = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{1.5\eta} \quad (1)$$

where  $\varepsilon_r$  and  $\varepsilon_0$  are the relative and vacuum permittivity, respectively,  $\zeta$  is the zeta potential,  $\eta$  is the dynamic viscosity of dispersion medium. Second, when  $\kappa r$  is large ( $\kappa r \gg 1$ ), the double layer is supposed to be flat and Smoluchowski derived the electrophoretic mobility as

$$m = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (2)$$

In these limit conditions the electrophoretic mobility does not depend on the particle radius. For, let us say, real conditions, Henry derived the equation taking into account the particle radius as well as the double layer thickness as

$$m = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{1.5\eta} [1 + \lambda F(r\kappa)] \quad (3)$$

where  $\lambda$  depends on conductivity of bulk solution and the function  $F(r\kappa)$  varies from 0 to 1. For nonconducting particles the Henry eqn (3) can be simplified as

$$m = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{1.5\eta} f(r\kappa) \quad (4)$$

Table 1 ITP electrolyte systems

Parameter	Electrolyte systems	
	I	II
Leading anion	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
Concentration (mmol l <sup>-1</sup> )	10	10
Counter ion	Imidazole	EACA
pH (LE)	7.10	4.50
Terminating anion	MES	Caproic acid
Concentration (mmol l <sup>-1</sup> )	10	5
pH (TE)	4.30	3.80

where  $f(r\kappa)$  is a dimensionless function varying from 1 to 1.5 and also depending on shape of particles. For the product  $r\kappa$  in the interval from 0.1 to  $10^3$  the function  $f(r\kappa)$  is increasing for spherical particles. For cylindrical particles the function  $f(r\kappa)$  can increase or decrease depending on their orientation towards electric field.<sup>23,24</sup>

These classical models were completed by Wiersema *et al.*<sup>25</sup> who showed that in the range of  $1 < r\kappa < 10$  for zeta potentials higher than 78 mV the electrophoretic mobility of colloid particles has a minimum. This model explains reciprocal relationships between the electrophoretic mobility and the particles sizes reported in several papers.<sup>17,26–28</sup>

### Isotachophoretic separation

Isotachophoretic separations of Ag nanoparticles dispersions containing 40% (v/v) of ethanol and stabilized by gelatin were performed by the two columns coupled system using two electrolyte systems with the different pH values (Table 1) and with no additives for suppression of electroosmotic flow. Gelatin was used for the stabilization due to its long term stability in a broad range of pH.<sup>29</sup>

The isotachophoretic separations recorded by conductivity and UV-VIS detectors are shown in Fig. 1a and b. One ITP run in the two-columns system took about 25 minutes. These figures also show ITP records of blank separations, in which the terminating electrolyte was injected instead of Ag dispersions. The time difference between the conductivity and UV-VIS detector was about 39 seconds. Therefore, the ITP records in Fig. 1 were shifted to correct this difference and to simplify the zone identification. The zones were also identified by the separation of Ag dispersions of different dilutions. In order to verify the ITP steady state was reached the calibration plots of absorption peak area against the reciprocal value of dilution of the origin Ag colloid were constructed (Fig. 2). It was performed for the separation in the system II when the resolution of Ag nanoparticles peaks was better than in the system I. Their good linearity proves the correct ITP separation.

In both electrolyte systems, four main peak-mode zones<sup>30</sup> of Ag nanoparticles were observed at the boundaries between other ITP zones of electrolyte impurities (denoted as x and xx), ions left from the nanoparticles synthesis and free gelatin. The similar peak-mode zones have been observed in case of gold nanoparticles<sup>16</sup> as well as micron sized particles.<sup>21</sup> In general, the separation of nanoparticles in their pure ITP zones is not possible due to approximately Gaussian distributions of their sizes which is visible in the UV-VIS detector records.

In order to determine the electrophoretic mobilities of Ag nanoparticles  $m_{Ag}$  their upper and lower mobility limits were estimated from conductivity signals of neighbouring zones as follows

$$m_i = \frac{m_{LE}\kappa_i}{\kappa_{LE}} \quad (5)$$

where  $m_{LE}$  is the electrophoretic mobility of leading anion which was nitrate ( $-74.1 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),  $\kappa_i$  and  $\kappa_{LE}$  are the conductivity signals of a zone  $i$  and leading zones, respectively. The results are summarized in Table 2. The average mobilities

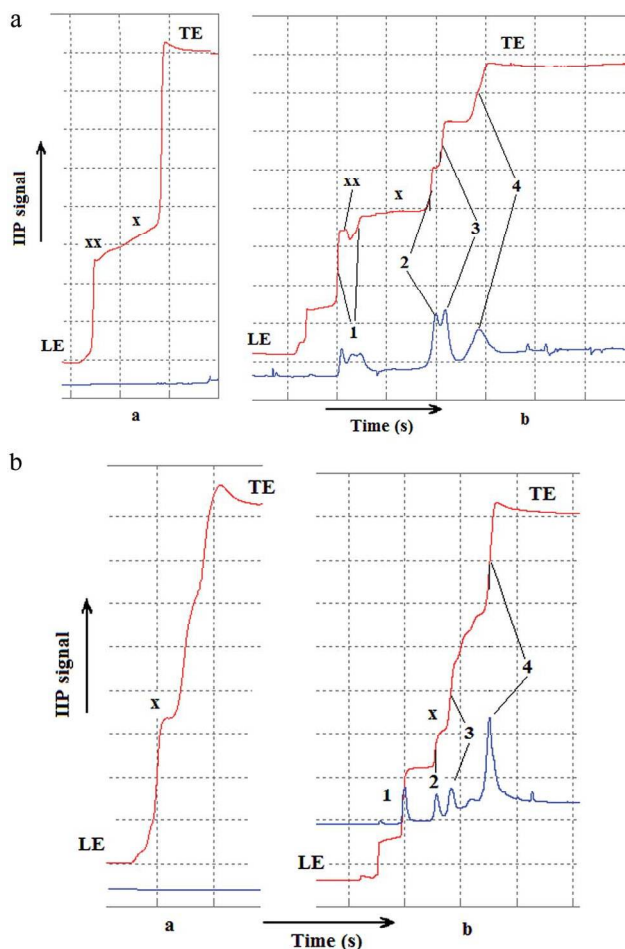


Fig. 1 a ITP separation records in electrolyte systems I. (a) – blank, (b) – Ag nanoparticles. The zones x and xx are impurities of the electrolyte system. (b) ITP separation records of Ag nanoparticles in electrolyte systems II. (a) – blank, (b) – Ag nanoparticles. The zone x is an impurity of the electrolyte system.

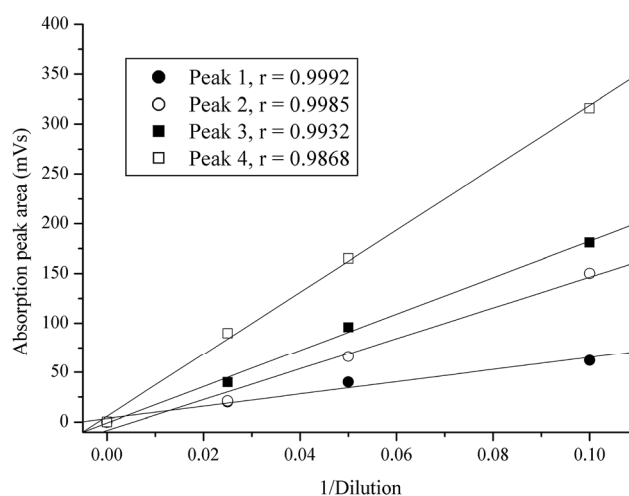


Fig. 2 Dependence of absorption peak area on reciprocal value of dilution of the original Ag colloid separated in the system II ( $r$  – regression coefficient).

from the lower and upper ones were calculated as well. The silver nanoparticles mobilities were determined with uncertainty of RSD = 5.9% ( $n = 27$ ) and RSD = 11.9% ( $n = 16$ ) in the system I and II, respectively.

The detection wavelength of 410 nm corresponded to the absorption maxima of the Ag dispersion stabilized by gelatin in the ethanol–water solutions (40% ethanol) shown in Fig. 3. Due to dilution of the Ag dispersions during the ITP separation the absorption spectrum of Ag nanoparticles of a lower concentration in water (also stabilized by gelatin) was added for comparison. As obvious the absorption maximum was shifted to 415 nm which is not significant for the detection. None of the used electrolytes absorbed light in this range of wavelengths.

### Transmission electron microscopy

Ag nanoparticles were studied using TEM micrographs (Fig. 4). The histogram of their sizes is shown in Fig. 4c. Four main size fractions with the mean (median) values of 4 nm, 10 nm, 16 nm and 22 nm were recognized. The last and largest peak of the UV-VIS record in the system II (Fig. 1b) indicates that the predominating smallest nanoparticles had the lowest mobility. Based on this idea the average electrophoretic mobilities were correlated with the mean sizes of the Ag nanoparticles and the relationships with good linearity were obtained as shown in Fig. 5. Most of papers describing separation of gold and silver nanoparticles reported the similar relationships.<sup>31–33</sup>

### Electrophoretic mobility of Ag nanoparticles

As mentioned above, the ITP separation in the both electrolyte systems revealed the four zones mutually separated by other migrating zones acting as spacers. The number of separated Ag zones likely depends on the number of the spacers.

The better separation of all four Ag fractions was achieved in the system II with lower pHs of leading electrolyte and, thus, in all migrating zones. Ag nanoparticles were supposed to be covered by adsorbed gelatin polymers forming electric double layers. An isoelectric point of gelatin is about 4.5–5 and, therefore, the ionization at pH = 4.5 is lower than that at

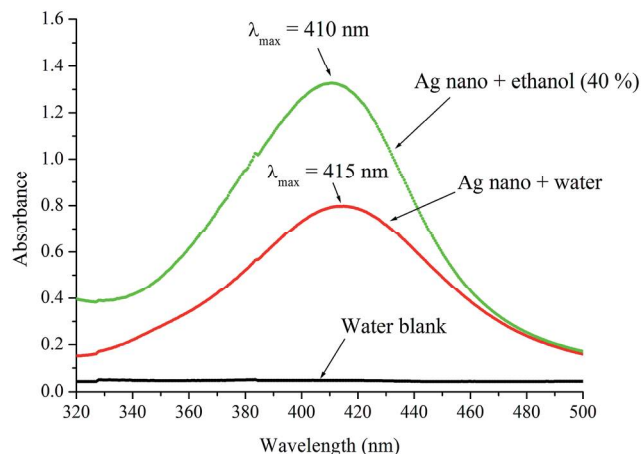


Fig. 3 UV-VIS spectra of Ag colloids stabilized by gelatin in water and ethanol.

pH = 7.0. It follows from this adsorbed gelatin gave Ag nanoparticles different negative zeta potentials depending on a degree of ionization of gelatin function groups. This situation is similar to the separation of *e.g.* weak acids according to their pK.

One of fundamental characteristics of the ITP separation of negatively charged species is elevating pH in their zones from leading to terminating one. In case of the separations shown in Fig. 1a and b pH in the zones can be ordered as pH(1) < pH(2) < pH(3) < pH(4). The data in Table 2 indicate that the electrophoretic mobilities decreased with increasing pH and, consequently, a degree of gelatin ionization. Therefore, the zeta potential of Ag nanoparticles expressed in eqn (4) cannot play a decisive role for their ITP separation. In addition, the effect of pH on viscosity of gelatin solutions was experimentally verified but was found to be very low to influence the electrophoretic mobility of Ag nanoparticles.

In order to understand the ITP separation and to explain the role of gelatin, the hydrodynamic size and zeta potential measurements of the silver nanoparticles dispersions with different pH were performed (Table 3). At pH = 7.05 gelatin formed larger structures with higher zeta potential than at pH = 4.50. The explanation is that at the higher pH the negative charges of gelatin chains caused stronger repulsion forces among them forming thicker gelatin double layers. This assumption was verified by the DLS experiments.

The gelatin double layer thickness  $1/\kappa$  corresponding to pH = 4.50 and 7.05 can be simply estimated as the difference of the mean hydrodynamic radii determined by DLS of 61.5 nm and 144 nm and the mean nanoparticles radius estimated from the TEM images of *ca.* 4 nm.

The  $1/\kappa$  values were estimated at 57.5 nm and 140 nm, respectively. The corresponding  $r\kappa$  values were calculated at 0.070 and 0.029 for pH = 4.5 and pH = 7.05, respectively. Therefore, we can conclude that the  $r\kappa$  values corresponding to the ITP zones 1–4 can be order as  $r\kappa(1) > r\kappa(2) > r\kappa(3) > r\kappa(4)$ . Taking into account the electrophoretic mobilities in Table 2 this relation is in agreement with eqn (4).

Table 2 Electrophoretic mobilities of Ag nanoparticles in systems I and II

Zone no./syst. I	$m_{Ag} \times 10^{-9}$ ( $m^2 V^{-1} s^{-1}$ )	Average $\times 10^{-9}$ ( $m^2 V^{-1} s^{-1}$ )
1	−66.0 to −55.5	−60.8
2	−54.0 to −49.3	−51.7
3	−49.3 to −45.6	−47.5
4	−45.6 to −41.7	−43.7
Zone no./syst. II	$m_{Ag} \times 10^{-9}$ ( $m^2 V^{-1} s^{-1}$ )	Average $\times 10^{-9}$ ( $m^2 V^{-1} s^{-1}$ )
1	−61.3 to −47.5	−54.4
2	−47.5 to −42.6	−45.1
3	−42.6 to −35.5	−39.1
4	−31.9 to −25.7	−28.8

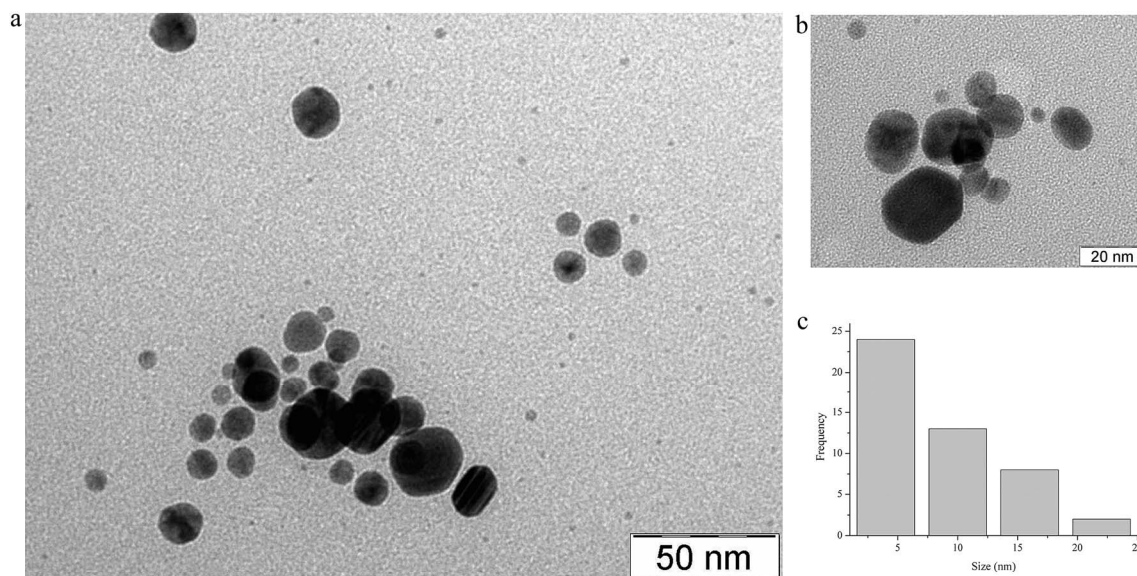


Fig. 4 TEM micrographs of Ag nanoparticles. (a) Micrograph with resolution of 50 nm, (b) micrograph with resolution of 20 nm and (c) histogram of Ag nanoparticles.

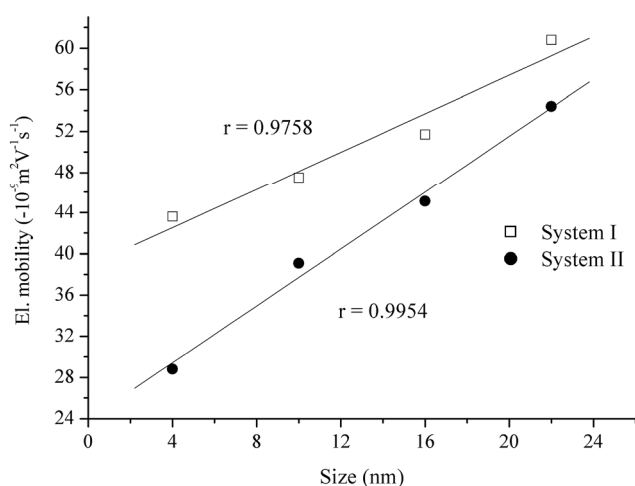


Fig. 5 Dependence of average electrophoretic mobilities on mean Ag nanoparticle sizes ( $r$  – regression coefficient).

Both the zeta potential and the thickness of gelatin double layers, which determine mobility of Ag nanoparticles according eqn (4), depends on ionization of gelatin function groups and thus on pH. Amount of adsorbed gelatin should depend on the size of nanoparticle and, therefore, we can suppose two basic variables influencing the ITP separation: (i) size of Ag

Table 3 Zeta potentials and mean hydrodynamic size of Ag/gelatin nanoparticles

pH	Zeta potential (mV)	Mean size (nm)
4.50	-7.3	123
7.05	-20.4	288

nanoparticles and (ii) a degree of ionization of gelatin groups. In addition, mutual interactions of gelatin double layers of the nanoparticles can also influence their migration. As outlined above, the separation process is very complex to be unambiguously described. From the practical point of view, ITP was demonstrated to be an efficient tool for the separation of Ag nanoparticles according to their sizes.

## Conclusion

Capillary isotachopheresis was used for the separation of silver nanoparticles stabilized by gelatin in ethanol-water colloid dispersions. The ITP separations were performed in the two separation systems with pH of the leading electrolytes of 7.1 (system I) and 4.5 (system II). In the isotachopheretic records the four peak-mode zones of Ag nanoparticles were identified at the boundaries of other ITP zones. The electrolyte system II provided the better separation.

The electrophoretic mobilities of the Ag nanoparticles varying from  $-66.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  to  $-25.7 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  were found to be proportional to the four size fractions of 4 nm, 10 nm, 16 nm and 22 nm evaluated from the TEM images. The DLS experiments demonstrated that thickness of gelatin double layers as well as zeta potentials depended on pH. Since the Ag nanoparticles migrated at the boundaries of other zones, these zones can be considered as the spacers necessary for the ITP separation.

The obtained experimental results showed that capillary isotachopheresis is able to separate the gelatine stabilized Ag nanoparticles according to their size due to different zeta potentials and thicknesses of the gelatin double layers. These findings extend common ITP applications from separation of organic and inorganic ions to separation of nanoparticles stabilized by polymers like gelatin. Based on these results off-



line connections of ITP and/or ITP-CZE with TEM will be investigated in the future for the better characterization of metal and semiconductor nanoparticles.

## Acknowledgements

This work was supported by the “National Feasibility Program I”, project LO1208 “TEWEP”, VŠB-Technical University of Ostrava (SP 2015/76) and by internal grant of Palacký University in Olomouc (IGA\_PrF\_2015\_022). The authors thank Aleš Panáček from the Department of Physical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc for TEM measurements.

## References

- 1 F. Kammer, S. Legros, E. H. Larsen, K. Loeschner and T. Hofmann, *Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 425–436.
- 2 H. Kato, A. Nakamura, K. Takahashi and S. Kinugasa, *Nanomaterials*, 2012, **2**, 15–30.
- 3 H. Nolte, S. Schilde and A. Kwade, *Compos. Sci. Technol.*, 2012, **72**, 948–958.
- 4 K. Tiede, M. Hassellöv, E. Breitbarth, Q. Chaudhry and A. B. A. Boxall, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 503–509.
- 5 N. Surugau and P. L. Urban, *J. Sep. Sci.*, 2009, **2**, 1889–1906.
- 6 U. Pyell, W. Bücking, C. Huhn, B. Herrmann, A. Merkulov, J. Mannhardt, H. Jungclas and T. Nann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **395**, 1681–1691.
- 7 F. Sang, X. Huang and J. Ren, *Electrophoresis*, 2014, **35**, 793–803.
- 8 A. I. López-Lorente, B. M. Simonet and M. Valcárcel, *Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 58–71.
- 9 M. Stanisavljevic, M. Vaculovicova, R. Kizek and V. Adam, *Electrophoresis*, 2014, **35**, 1929–1937.
- 10 Z. Zhang, F. Zhang and Y. Liu, *J. Chromatogr. Sci.*, 2013, **51**, 666–683.
- 11 I. Llorente, S. Fajado and J. M. Bastidas, *J. Solid State Electrochem.*, 2014, **18**, 293–307.
- 12 S. Oszwaldowski, K. Zawistowska-Gibuła and K. P. Roberts, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2831–2842.
- 13 D. T. R. Stewart, M. D. Celiz, G. Vicente, L. A. Colón and D. S. Aga, *Trends Anal. Chem.*, 2011, **30**, 113–122.
- 14 F. Kitagawa and K. Otsuka, *J. Chromatogr. A*, 2014, **1335**, 43–60.
- 15 W. Bücking, O. Ehlert, J. Riegler, Ch. Rettenmeier, A. Merkulov and T. Nann, *Int. J. Nanotechnol.*, 2007, **4**, 298–308.
- 16 W. Bücking and T. Nann, *IEE Proc.: Nanobiotechnol.*, 2006, **153**, 47–53.
- 17 W. Bücking, S. Massadeh, A. Merkulov, S. Xu and T. Nann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **396**, 1087–1094.
- 18 A. Hlaváček and P. Skládal, *Electrophoresis*, 2012, **33**, 1427–1430.
- 19 U. Pyell, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 814–831.
- 20 P. Praus, *Talanta*, 2005, **65**, 281–285.
- 21 G. Goet, T. Baier and S. Hardt, *Biomicrofluids*, 2011, **5**, 14109–14116.
- 22 J. Soukupová, L. Kvítek, A. Panáček, T. Nevěčná and R. Zbořil, *Mater. Chem. Phys.*, 2008, **111**, 77–81.
- 23 E. D. Ščukin, A. V. Percov and E. A. Amelinová, *Colloid Chemistry*, Academia, Prague, 1990.
- 24 R. J. Hunter, *Foundations of Colloid Science*, Oxford University Press, New York, 2nd edn, 2009.
- 25 P. H. Wiersema, A. L. Loeb and J. Th. Overbeek, *J. Colloid Interface Sci.*, 1966, **22**, 78–99.
- 26 U. Schnabel, Ch. H. Fischer and E. Kandler, *J. Microcolumn Sep.*, 1997, **9**, 529–534.
- 27 N. G. Vanifatova, B. Ya. Spvakov, J. Mattusch and R. Wennrich, *Talanta*, 2003, **59**, 345–353.
- 28 Y. Q. Li, H. Q. Wang, J. H. Wang, L. Y. Guan, B. F. Liu, Y. D. Zhao and H. Chen, *Anal. Chim. Acta*, 2009, **647**, 219–225.
- 29 M. Sivera, L. Kvítek, J. Soukupová, A. Panáček, R. Prucek, R. Večerová and R. Zbořil, *PLoS One*, 2014, **9**, e103675.
- 30 T. K. Khurana and J. G. Santiago, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6300–6307.
- 31 F. K. Liu and G. T. Wei, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **510**, 77–83.
- 32 F. K. Liu, Y. Y. Lin and C. H. Wu, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **528**, 249–254.
- 33 F. K. Liu, M. H. Tsai, Y. C. Hsu and T. C. Chu, *J. Chromatogr. A*, 2006, **1133**, 340–346.

## SYNTHESIS OF SMALL SILVER NANOPARTICLES AND THEIR CATALYTIC ACTIVITY IN 4-NITROPHENOL REDUCTION

Petr SUCHOMEL, Ales PANACEK, Robert PRUCEK, Radek ZBORIL, Libor KVITEK

*Palacky University Olomouc, Olomouc, Czech Republic, EU*

### Abstract

This work is aimed at preparation of small silver nanoparticles (Ag NPs) with various sizes using two-step preparation method. The silver bromide nanoparticles were prepared in the first step and they were reduced to metal silver nanoparticles in the second step. Size of prepared silver nanoparticles was controlled by using of several modifiers. Two surfactants (SDS and Tween 80) and two natural polymers (casein and gelatin) were used. Sodium borohydride was used as a reducing agent due to its high reducing power allowing preparation of small AgNPs. The prepared Ag NPs were used as heterogeneous catalysts in a model reaction based on reduction of 4-Nitrophenol using sodium borohydride under alkaline conditions. The realized experiments showed that the used modifiers significantly influence the catalytic effect of the prepared Ag NPs.

### 1. INTRODUCTION

Metal nanoparticles belong among the most studied systems in the modern nanoscience. They are predetermined for utilization in many different branches of science and technology because of their unique properties in comparison to bulk material [1], [2]. They are unique especially due to their optical, electronic and biological properties [3]-[6]. Moreover these systems have due to their nanoscale size high surface-to-volume ratio, which can be utilized in heterogeneous catalysis [7], [8]. Dominant position among noble metal nanoparticles is occupied by silver nanoparticles (Ag NPs). They are widely used in medical, cosmetic and industrial applications [9]-[15] and also in the field of analytics [16]. Silver nanoparticles are also very frequently used as a heterogeneous catalyst in redox reactions [17]-[19].

The applicability of Ag NPs as catalysts depends in general on their size and stability. Smaller nanoparticles exhibit larger surface area for the same volume of material. That means larger active area of the catalyst. Therefore there were developed various methods enabling managed producing of Ag NPs with sizes from units up to hundred nanometers [20]-[22]. Unfortunately, silver nanoparticles are not very stable which is reflected by their agglomeration. This leads to the decreasing of mentioned active area. Therefore, stabilization of Ag NPs is needed to maintaining their high catalytic activity. The Ag NPs can be stabilized by steric or electrostatic effects using surfactants or organic polymers. Such as sodium dodecyl sulphate, Triton X-100, Tween 80, polyacrylamide, citrate, polyvinylpyrrolidone or polyethylene glycol [23]-[26]. However, these stabilizers significantly influence the catalytic activity of the Ag NPs. Catalytic activity of Ag NPs is mainly studied on two model reactions. One of them is based on the reduction of rhodamine 6G [27], [28]. The second one, more frequently used, is based on the reduction of 4-nitrophenol. There is only one product of the reaction and the amount of reactant and product can be monitored by UV-Vis spectroscopy [29]. Moreover, 4-nitrophenol has been classified as a priority pollutant by US Environmental Protection Agency [30]. Therefore, it seems to be more appropriate to study catalytic activity on this reaction.

This paper describes the preparation of small and stable silver nanoparticles with different sizes. The silver nanoparticles were synthesized by two-step synthesis method consisting of silver bromide preparation and the consecutive reduction of the prepared AgBr nanoparticles to metallic silver nanoparticles. The AgBr nanoparticles were prepared in the presence of various surfactants and polymers because of stabilization and size modification. Prepared silver nanoparticles were examined as heterogeneous catalysts with very outstanding results.

## 2. EXPERIMENTAL SECTION

### 1.1. Materials

Silver nitrate (Sigma-Aldrich, p.a.), potassium bromide (Lachema, p.a.), sodium dodecyl sulfate (Lachema, p.a.), Tween 80 (Lachema, p.a.), gelatin (penta, p.a.), casein (Lachema, p.a.), 4-nitrophenol (Lachema, p.a.) and sodium borohydride (Sigma-Aldrich, p.a.) were used without additional purification. Water used for preparation of all solutions was deionized by reverse osmosis instrument AQUAL 29 (Merci, Czech Republic).

### 1.2. Methods

Silver nanoparticles with various sizes were synthesized using two-step preparation method. This method is based on preparation of silver bromide nanoparticles in the first step, which were reduced to metal silver nanoparticles in the second step. Size of prepared silver nanoparticles was controlled by addition of various modifiers during formation of silver bromide nanoparticles. Silver bromide nanoparticles were prepared by rapid injection of solution of potassium bromide and modifier to the silver nitrate solution under vigorous stirring. Final concentrations of reaction compounds were  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  for silver nitrate,  $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  for potassium bromide,  $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  for surfactants (SDS, Tween 80) and 0.1 % for natural polymers (gelatin, casein). After 5 minutes of stirring, solution of sodium borohydride was injected into reaction mixture, which resulted in formation of silver nanoparticles.

Catalytic activity of silver nanoparticles was studied by using of model reaction, based on reduction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol by sodium borohydride in aqueous solution under alkaline conditions. This reaction can be easily monitored by UV-Vis spectrometry, because 4-nitrophenol has absorption peak at 400 nm and product of the reduction, 4-aminophenol, has absorption peak at 300 nm. UV-Vis spectra was recorded in the range of 250-550 nm every 30 s. Typically, 2 ml of 1.5 mM 4-nitrophenol was mixed in quartz cuvette with 0.47 ml distilled water and 0.5 ml of 10 mM sodium borohydride. That means, that sodium borohydride was added in a 100 times higher excess. Solution was shaken and then 0.03 ml of silver colloid was rapidly injected, shaken again, placed to the UV-Vis spectrometer and kinetic measurement was started. All experiments were performed at laboratory temperature. Synthesis of silver nanoparticles and catalytic experiments were repeated three times with the same results.

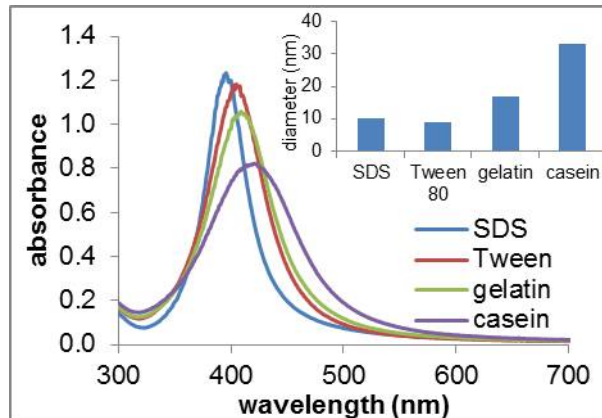
Size of silver nanoparticles was characterized by dynamic light scattering (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) and transmission electron microscopy (JEM 2010, Jeol Ltd., Japan). UV-Vis spectra of silver colloids and catalytic experiment were recorded by using of spectrophotometer S600 (Analytic Jena AG, Germany).

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

### 2.1. Preparation of silver nanoparticles

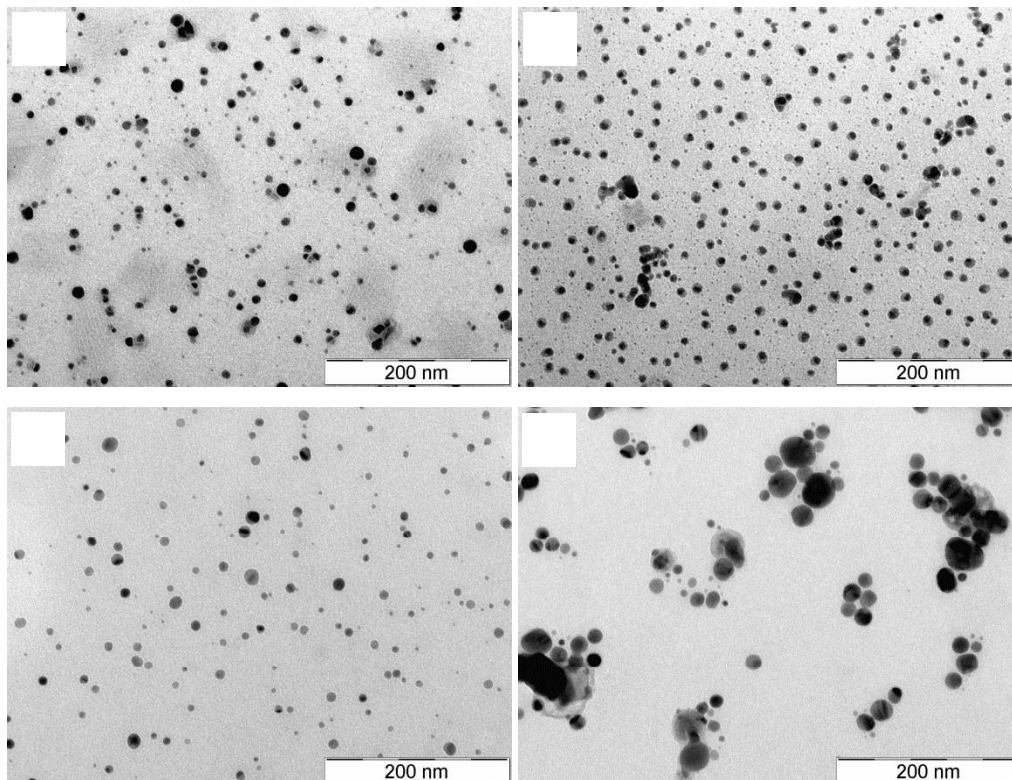
Silver nanoparticles were prepared by the procedure described in the method section. First, the silver bromide nanoparticles were prepared by mixing of solution of silver nitrate with solution of potassium bromide and modifier. In the next step silver bromide nanoparticles were reduced to the silver nanoparticles. We chose two surfactants (SDS and Tween 80) and two natural polymers (gelatin and casein). These compounds were added to the reaction mixture for two purposes. For the stabilization of silver bromide and silver nanoparticles against agglomeration and for the size modification of silver bromide and the resulting silver nanoparticles. UV-Vis spectra of prepared silver colloids in Fig. 1 show that mentioned modifiers really have different influence on silver nanoparticles. Position of surface plasmon indicate, that the smallest particles can be prepared in the presence of SDS and Tween 80, bigger in the presence of gelatin and the

biggest particles from four used modifiers can be prepared in the presence of casein. This assumption was confirmed by measuring of particle size using dynamic light scattering technique (Fig. 1, inset).



**Fig. 1:** UV-Vis spectra of prepared silver nanoparticles in the presence of various modifiers. Inset: size of prepared silver nanoparticles measured by DLS

Results containing particle sizes of silver nanoparticles prepared in the presence of mentioned modifiers were verified by transmission electron microscopy (Fig. 2). TEM images show the real size of silver nanoparticles and confirm results obtained from DLS and UV-Vis measurements. There are nearly same-sized nanoparticles in the presence of SDS and Tween 80. The only difference is the value of polydispersity, where colloid prepared in the presence of SDS is more polydisperse than colloid prepared in the presence of Tween 80. TEM image of Ag nanoparticles modified by gelatin confirmed existence of particles with diameter up to 20 nm and in the presence of casein, more polydisperse colloid system with particles from 20 up to 40 nm was observed. The polydispersity of casein stabilized silver colloid corresponds with wider UV-Vis absorption peak on Fig. 1.



**Fig. 2:** TEM images of silver nanoparticles prepared in the presence of a) SDS, b) Tween 80, c) gelatin, d) casein



Stabilizing effect of mentioned modifiers was verified by collecting of UV-Vis spectra during 5 days (Fig. 3). UV-Vis spectra show, that reduction of silver bromide colloid using sodium borohydride is not immediate process and formation of silver nanoparticles take approximately 24 h. After 24 hours, there were formed stable silver nanoparticles and there were not observed any changes during next 72 hours.

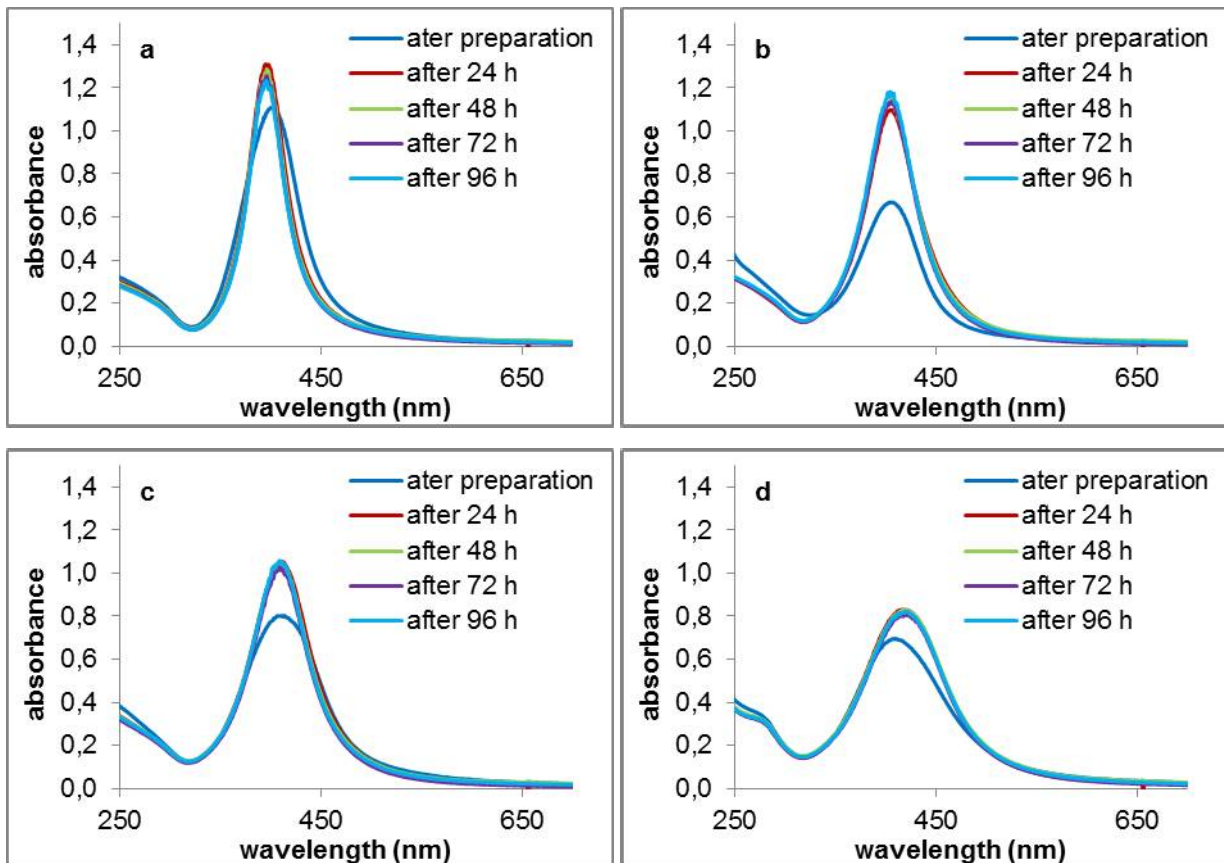


Fig. 3: Time dependence of UV-Vis spectra of silver nanoparticles prepared in the presence of a) SDS, b) Tween 80, c) gelatin, d) casein

## 2.2. Kinetic experiment

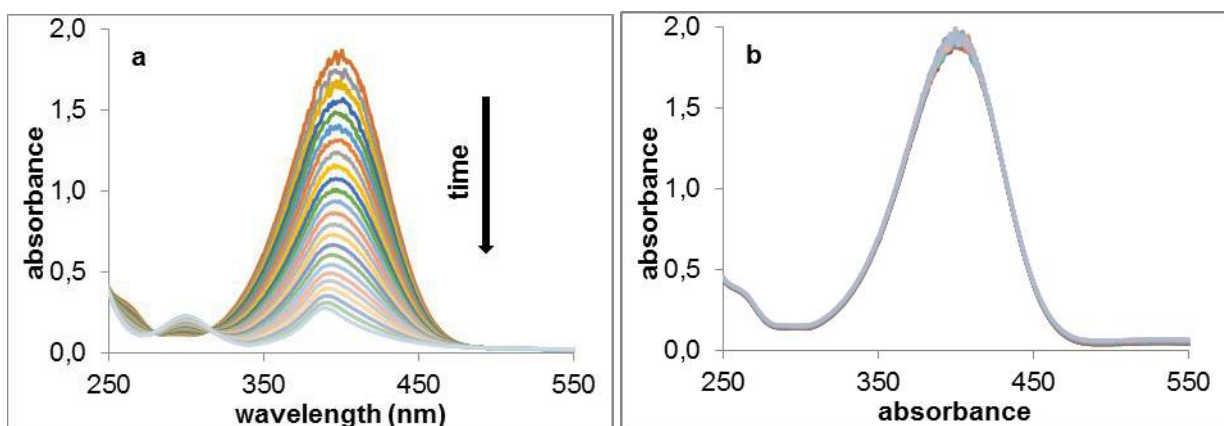


Fig. 4: UV-Vis spectra of reaction systems recorded every 30 seconds a) with catalyst (Ag NPs in the presence of SDS), b) without catalyst

Prepared silver nanoparticles were used as heterogeneous catalysts for reduction of 4-nitrophenol by sodium borohydride. Catalytic activity of the prepared silver nanoparticles was monitored by measuring of UV-Vis spectra in the range of 250-550 nm. Spectra of all catalytic experiments with four samples of Ag NPs

catalysts had similar characteristics and differ only in the speed of descent of the absorption peak. Therefore, only spectrum of reaction system with SDS modified Ag NPs catalyst and without catalyst is showed in Fig. 4. Reduction of 4-nitrophenol was observed by decreasing of absorption peak at 400 nm and by formation and increasing of peak at 300 nm, that represents product of reaction, 4-aminophenol. Reduction of 4-nitrophenol does not start immediately after addition of sodium borohydride. Induction period that took approximately 360 seconds was observed. This period is usually ascribed to the diffusion time needed for adsorption of 4-nitrophenol onto the silver surface [31]. Start of 4-nitrophenol reduction was indicated by the first decreasing of absorption peak ( $t_0$ ). All spectra recorded before  $t_0$  were removed for clarity.

Experimental data showed, that reaction rate decreased with decreasing concentration of 4-nitrophenol. This observation, together with excess of reducing agent (concentration of sodium borohydride can be considered as constant), corresponds to the first order reaction kinetics equation.

$$\ln(A/A_0) = -kt \quad (1)$$

where  $A_0$  is an initial absorbance of the reaction system,  $A$  is absorbance in time  $t$  and  $k$  is rate constant. Fig. 5 shows kinetic curves expressed as decreasing absorbance at the wavelength of 400 nm, that represents reduction of 4-nitrophenol. From these kinetic curves, rate constants ( $k$ ,  $s^{-1}$ ) were calculated for each reaction system. Results showed that the rate constant of the 4-nitrophenol reduction decreases with increasing size of silver nanoparticles. Rate constants of measured samples increased from  $0.0004 s^{-1}$  for nanoparticles prepared in the presence of casein, over  $0.0011 s^{-1}$  for gelatin modified nanoparticles, up to  $0.0023 s^{-1}$  and  $0.003 s^{-1}$  for Tween 80 and SDS modifiers respectively. This observation corresponds with Langmuir-Hinshelwood model of the heterogeneous catalyzed reduction. According to this model borohydride ions are adsorbed on the surface of the nanoparticles and give them the electrons. At the same time molecules of 4-nitrophenol adsorbed on silver surface are reduced by these electrons. After reduction, reaction product 4-aminophenol is desorbed from the silver surface. The reaction rate therefore depends on the size of the surface, which means that the smallest particles should have the highest catalytic activity, which was confirmed by performed experiments.

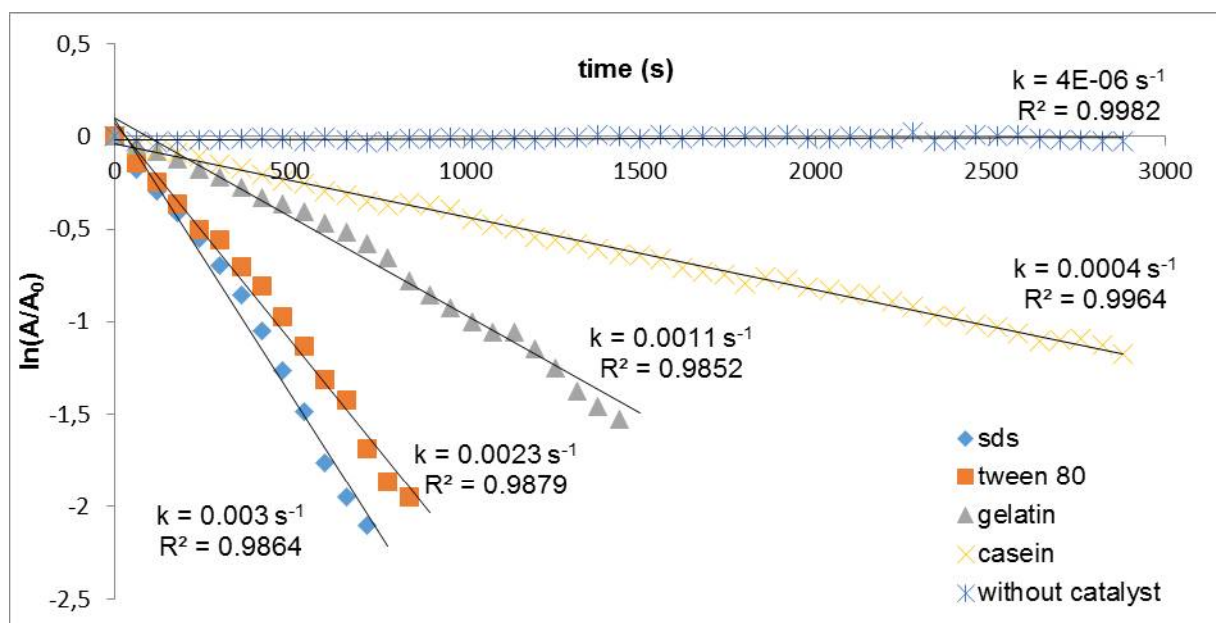


Fig. 5: Kinetic curves of 4-nitrophenol reduction catalyzed by various silver nanoparticles and without silver nanoparticles.

### 3. CONCLUSION

In this study the novel method of silver nanoparticles preparation was described. Silver nanoparticles were synthesized using two-step preparation method consisting of silver bromide nanoparticles formation and their consecutive reduction to metallic silver nanoparticles. Moreover, two surfactants and two natural polymers were used not only as stabilizers but also as size modifiers of the synthesized nanoparticles.

The catalytic activity of prepared silver nanoparticles was tested on the reduction of 4-nitrophenol leading to the formation of 4-aminophenol. The highest catalytic activity was observed for nanoparticles prepared in the presence of SDS and Tween 80, because the smallest nanoparticles with the largest surface area were prepared using these surfactants.

### ACKNOWLEDGEMENTS

***This work has been supported by the the Operational Program Research and Development for Innovations - European Regional Development Fund (project CZ.1.05/2.1.00/03.0058 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), Operational Program Education for Competitiveness - European Social Fund (CZ.1.07/2.3.00/20.0056 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic), Technology Agency of the Czech Republic (TA03010799) and also by internal grant of Palacký University in Olomouc (PřF\_2013\_031).***

### LITERATURE

- [1] LU, Y., MEI, Y., SCHRINNER, M., BALLAUFF, M., MOLLER, MW., BREU, J. In Situ Formation of Ag Nanoparticles in Spherical Polyacrylic Acid Brushes By UV Irradiation. J. Phys. Chem. C., 2007, year 111, nr. 21, page 7676.
- [2] SIGNORI, AM., SANTOS, KO., EISING, R., ALBUQUERQUE, BL., GIACOMELLI, FC., DOMINGOS, JB. Formation of Catalytic Silver Nanoparticles Supported on Branched Polyethyleneimine Derivatives. Langmuir, 2010, year 26, nr. 22, page 17772.
- [3] AHMADPOOR, P., NATERI, AS., MOTAGHITALAB, VJ. The Optical properties of PVA/TiO<sub>2</sub> Composite Nanofibers. Appl. Polym. Sci., 2013, year 130, nr. 1, page 78.
- [4] PRISTINSKI, D., TAN, SL., EROL, M., DU, H., SUKHISHVILI, SJ. In Situ SERS Study of Rhodamine G6 Adsorbed on Individually Immobilized Ag Nanoparticles. Raman Spectrosc. 2006, year 37, nr. 7, page 762.
- [5] YANG, WS., XIE, TF., JIANG, TF., WANG, DJ. Facile Preparation of Ag<sub>2</sub>S Nanoparticles with Broad Photoelectric Response Region. Colloid Surf. A-Physicochem. Eng. Asp., 2013, year 433, page 55.
- [6] LV, Y., LI, K., LI, YP. Surface Modification of Quantum Dots and Magnetic Nanoparticles with PEG-conjugated Chitosan Derivates for Biological Applications. Chemical Papers, 2013, year 67, nr. 1, page 1404
- [7] KUSIOR, A., KLICH-KAFEL, J., TRENCZEK.ZAJAC, A., SWIERCZEK, K., RADECKA, M., ZAKRZEWSKA, K. TiO<sub>2</sub>-SnO<sub>2</sub> Nanomaterials for Gas Sensing and Photocatalysis. J. Eur. Ceram. Soc., 2013, year 33, nr. 12, page 2285.
- [8] SON, HS., KO, G., ZOH, KD. Kinetic and Mechanism Study of Photolysis and TiO<sub>2</sub> Photocatalysis of Triclosan. J. Hazard. Mater., 2009, year 166, nr. 2-3, page 954.
- [9] ABRAHAM, R. M. E., LESTER, M. Optical Properties of Silver-Coated Silicon Nanowires: Morphological and Plasmonic Excitations. Plasmonics, 2013, year 8, nr. 3, page 1417.
- [10] CHEN, SL., LIU, KH., LUO, YF., JIA, DM., GAO, H., HU, GJ., LIU, L. In Situ Preparation and Sintering of Silver Nanoparticles For Low-cost and Highly Reliable Conductive Adhesive. Int. J. Adhes. Adhes., 2013, year. 45, page 138.
- [11] BUTEL, GP., COUGHENOR, BM., MACLEOD, HA., KENNEDY, CE., ANGEL, JRP. Reflectance optimization of second-surface silvered class mirrors for concentrating solar power and concentrating photovoltaics application. J. Photon. Energy, 2012, year 2, nr. 4.
- [12] KUMAR, ABVK., BAE, CW., PIAO, L., KIM, SH. Silver Nanowire Based Flexible Electrode With Improved Properties: High Conductivity, Transparency, Adhesion and Low Haze. Mater. Res. Bull., 2013, year 48, nr. 8, page 2944.

- [13] POLITANO, A., FORMOSO, V., CHIARELLO, G. Interplay Between Single-particle and Plasmonic Excitations in the Electronic Response of Thin Ag Films. *J. Phys.-Condens. Matter.*, 2013, year 25, nr. 30
- [14] PANACEK, A., KVITEK, L., PRUCEK, R., KOLAR, M., VECEROVA, R., PIZUROVA, N., SHARMA, VK., NEVECNA, T., ZBORIL, R. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J. Phys. Chem. B*, 2006, year 110, nr. 33, page 16248.
- [15] ZHOU, H., LIU, YF., CHI, WD., YU, CY., YU, YJ. Preparation and Antibacterial Properties of Ag@polydopamine/grapheme Oxide Sheet Nanocomposite. *Appl. Surf. Sci.*, 2013, year 282, page 181.
- [16] PRUCEK, R., PANACEK, A., FARGASOVA, A., RANC, V., MASEK, V., KVITEK, L., ZBORIL, R. Re-crystalization of Silver Nanoparticles in a High Concentrated NaCl Environment-a New Substrate for Surface Enhanced IR-visible Raman Spectroscopy. *Crystengcomm*, 2011, year 13, nr. 7, page 2242.
- [17] GOLUBEVA, OY., TERNOVAYA, NY., MALTSEVA, NV., MEYERSTEIN, D. Catalytic Hydrogen Oxidation Using Zeolite RHO Modified by Silver Nanoparticles. *Glass Phys. Chem.*, 2013, year 38, nr. 5, page 455,
- [18] BIABANI-RAVANDI, A., REZAEI, M., FATTAH, Z. Catalytic Performance of Ag/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for the Low Temperature Oxidation of Carbon Monoxide. *Chem. Eng. J.*, 2013, year 219, page 124.
- [19] LUNHONG, AI., HAITAO YUE., JING, J. Environmentally Friendly Light-driven Synthesis of Ag Nanoparticles In Situ Grown on Magnetically Separable Biohydrogels as Highly Active and Recyclable Catalysts for 4-nitrophenol Reduction. *J. Mater. Chem.*, 2012, year 22, page 23447.
- [20] XIAO, SL., XU, WL., MA, H., FANG, X. Size-tunable Ag Nanoparticles immobilized in Electrospun Nanofibers: Synthesis, Characterization, and Application for Catalytic reduction of 4-nitrophenol. *RSC Adv.*, 2012, year 2, nr. 1, page 319.
- [21] MORI, K., KUMAMI, A., YAMASHITA, H. Size-controlled Deposition of Ag Nanoparticles on Alumina With the Assistance of a Photo-induced Chromic Reaction, and Study of Their Catalytic properties. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2011, year 13, nr. 35, page 15821.
- [22] TALEBI, J., HALLADJ, R., ADKARI, S., Sonochemical Synthesis of Silver Nanoparticles in Y-zeolite Substrate. *J. Mater. Sci.*, 2010, year 45, nr. 12, page 3318.
- [23] AL-THABAITI, SA., AL-NOWAISTER, FM., OBAID, AY., AL-YOUBI, AO., KHAN, Z. Formation and Characterization of Surfactant Stabilized Nanoparticles: A Kinetic Study, *Colloid Surf. B-Biointerfaces*, 2008, year 67, nr. 2, page 230.
- [24] LI, X., LENHART, JJ. Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Natural Surface Water. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, year 46, nr. 10, page 5378.
- [25] XIONG, J., XUE, QJ., WU, XD. Synthesis of Stable Dispersions of Water-soluble And Sers Active Silver Nanoparticles Using PAM. *NANO*, 2013, year 8, nr. 5
- [26] TEJAMAYA, M., ROMER, I., MERRIFIELD, RC., LEAD, JR. Stability of Citrate, PVP and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media. *Environ. Sci. Technol.*, 2012, year 46, nr. 13. Page 7011.
- [27] ZHAI, HJ., SUN, DW., WANG, HS. Catalytic Properties of Silica/Silver Nanocomposites. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, year 6, nr. 7, page 1968.
- [28] CHAUDHARI, VR., SAMANT, KM., INGOLE, PP., HASSAN, PA. Catalytic Activity and Stability of Silver Supported on Multiwalled Carbon Nanotubes. *Int. J. Nanotechnol.*, 2011, year 8, nr. 10-12, page 988.
- [29] PRAUS, P., TURICOVA, M., KARLIKOVA, M., KVITEK, L., DVORSKY, R. Nanocomposite of Montmorillonite and Silver Nanoparticles: Characterization and Application in Catalytic Reduction of 4-nitrophenol. *Mater. Chem. Phys.*, 2013, year 140, nr. 2-3, page 493.
- [30] LAI, TL., YONG, KF., YU, JW., CHEN, JH., SHU, YY., WANG, CB. High Efficiency Degradation of 4-nitrophenol by Microwave-enhanced Catalytic Method. *J. Hazard. Mater.*, 2011, year 185, nr. 1, page 366.
- [31] HERVES, P., PEREZ-LORENZO, M., LIZ-MARZAN, LM., DZUBIELLA, J., LU, Y., BALLAUFF, M. Catalysis by Metallic Nanoparticles in Aqueous Solution: Model Reaction. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, year 41, nr. 17, page 5577.