

Diss. ETH No. 19860

**Understanding the Toxicity of Nanosilver for
Synthesis of Biocompatible Plasmonic-
Superparamagnetic Nanocomposites**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
GEORGIOS A. SOTIRIOU
M.Sc. ETH Zurich, Switzerland

born July 25th, 1983
citizen of Greece

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Sotiris E. Pratsinis, examiner
Prof. Dr. Sven Panke, co-examiner

Zurich, 2011

Summary

Nowadays, everyday life would be inconceivable without nanotechnology. The biomedical field has already obtained a great benefit from nanotechnology as it helps the diagnosis and even therapy of diseases. The unique physicochemical properties of silver nanoparticles (nanosilver) have brought them to the foreground of such nanotechnology-based products and applications. Nanosilver can kill microorganisms very efficiently which facilitates its employment as antimicrobial agent. Furthermore, because of their small size, nanosilver particles interact in a special way with light that gives rise to their plasmonic properties. Because of these properties, nanosilver can be used in a variety of biomedical applications, such as biosensing and bioimaging.

The potential benefits, however, that nanosilver can offer have to be balanced with the potential adverse effects that its broad use may cause. Therefore, a fundamental understanding of the mechanism that nanosilver interacts with

biological systems needs to be established in order to employ its full capacity. The last few years, this has ignited a number of studies that investigate the toxicity of nanosilver particles against biological systems. However, a systematic understanding of the physical properties that influence this toxicity has yet to be established.

In chapter 1, an overview of the synthesis methods of nanosilver particles and their biological interactions with bacteria and mammalian cells is presented. The main nanosilver toxicity mechanisms are discussed focusing on the Ag^+ ion release and the physicochemical properties that influence it. The toxicity of nanosilver with different sizes and surface coatings is compared, emphasizing the limitations of the currently used systems. The biomedical applications of nanosilver particles are also reviewed in respect to their antimicrobial and plasmonic properties, summarizing the state-of-the-art processes and products but also highlighting the further challenges.

In the second chapter, the effect of the released Ag^+ ions on the antibacterial activity of nanosilver particles is investigated. This was performed by synthesizing nanosilver particles on nanostructured silica with a precise control over their size, and investigating the Ag^+ ion release of these particles in aqueous solutions. Smaller nanosilver particles release higher fractions of Ag^+ ions, indicating a size-dependent phenomenon. The antibacterial activity against *E. coli* in the presence of nanosilver particles and ions or only in the presence of ions is further investigated. When small (<10 nm) nanosilver particles are employed that release high fractions of Ag^+ ions, the antibacterial activity is dominated by these ions. In contrast, when relatively larger (>10 nm) nanosilver particles are used that do not release many Ag^+ ions, then the antibacterial activity of the particles and the ions is comparable.

In chapter 3, the dose relations for the antibacterial activity of nanosilver on nanostructured silica particles are investigated focusing on the small (<10 nm) size range where Ag^+ ion release is significant. The effect of the silicon and silver precursors on the morphology of the synthesized nanoparticles is also investigated. The resulting nanosilver particles have similar Ag^+ ion release independently of the precursors used. The antibacterial activity of these nanosilver particles against *E. coli* is investigated at various concentrations and sizes. The nanosilver surface area concentration in suspension correlates best with the antibacterial activity that is observed rather than nanosilver mass or number concentration. This indicates that the nanosilver dose expressions in toxicological studies might be most accurate when assessed in terms of surface area concentration.

The origin of the released Ag^+ ions from the nanosilver surface is investigated in chapter 4. The Ag^+ ion release of the composite Ag/SiO_2 nanoparticles made by flame- or wet-chemistry is investigated and directly correlated to their size, independently of their synthesis route. Furthermore, when nanosilver particles dispersed in water are collected and re-suspended in fresh water, their Ag^+ ion release is minimal. Additionally, when nanosilver is reduced under H_2 and converted to metallic, the Ag^+ ion release is also at minimal levels. This indicates that the Ag^+ ions originate from the dissolution of the oxide layer on the nanosilver surface. In fact, the Ag^+ ion release can be quantitatively traced back to the dissolution of one or two oxide surface layers depending on nanosilver size, closing thus the mass balance. The antibacterial activity of washed nanosilver particles is, therefore, lower than the one of as-prepared nanosilver.

The understanding obtained by the above results was employed in chapter 5 in order to design nanosilver particles that do not exhibit toxicity but retain their

desired optical properties. So rather large (>30 nm) nanosilver particles were made and coated in situ with a nanothin SiO₂ layer. In that way, the fully-coated nanosilver particles were not toxic against *E. coli* cells in contrast to the partially-coated ones. The inert SiO₂ coating enabled the easy dispersion of these nanosilver particles in aqueous solutions and significantly prevented their flocculation. This facilitated their employment as plasmonic biosensors. Their biosensing performance was investigated by detecting bovine serum albumin in a flow cell and monitoring the shift of the plasmon absorption band. The fully-coated nanosilver particles outperformed the partially-coated ones, enabling them to be used as non-toxic plasmonic biosensors.

Finally, in chapter 6, the further employment of nanosilver particles in bioimaging was investigated. This time, nanosilver particles were synthesized along with iron oxide particles, forming the so-called Janus-like structures. The composite particles were also coated in situ by a nanothin SiO₂ layer. These specially designed multifunctional nanoparticles exhibited the desired plasmonic and magnetic properties of the nanosilver and iron oxide particles, respectively. In addition, the SiO₂ coating prevented their flocculation in aqueous and biological buffer solutions and most importantly, inhibited significantly the toxic Ag⁺ ion release from the nanosilver particles. As a result, these multicomponent plasmonic-magnetic nanoparticles exhibited no cytotoxicity against HeLa cells for 24 hours incubation. Furthermore, their surface functionalization with an antibody was verified by monitoring the shift in their plasmon absorption band. These biofunctionalized multifunctional nanoparticles were selectively bound to target cells (HeLa and Raji cells) and their detection was possible under dark field illumination.

The potential of nanosilver to be used as a multifunctional biomaterial was mainly limited because of its inherent toxicity. In this thesis, it was shown that when a fundamental understanding on the parameters that influence this toxicity is established, then nanosilver particles can be synthesized that maintain the desired properties without exhibiting the adverse ones. This understanding could assist the development of nanosilver products with superior performance that could be employed in a broad range of applications.

Zusammenfassung

Das Alltagsleben wäre heutzutage nahezu unvorstellbar ohne Nanotechnologie. In der Biomedizin ist Nanotechnologie für das Erkennen und Behandeln von Krankheiten schon von grossem Nutzen. Die besonderen physikochemischen Eigenschaften von Silber Nanopartikel (Nanosilber) hat sie in den Vordergrund von solchen, auf Nanotechnologie basierenden, Produkten und Anwendungen gerückt. Nanosilber kann sehr effizient Mikroorganismen töten, was die Anwendung als antimikrobieller Wirkstoff ermöglicht. Auf Grund ihrer kleinen Grösse wechselwirken Silber Nanoteilchen in einer speziellen Art mit Licht und plasmonischen Eigenschaften der Partikel zur Folge hat. Auf Grund dieser Eigenschaften, kann Nanosilber in einer Vielfalt von biomedizinischen Anwendungen, z.B. als Biosensoren und für Bioimaging, eingesetzt werden.

Der mögliche Nutzen von Nanosilber muss dennoch mit den eventuellen nachteiligen Auswirkungen, die eine weit verbreitete Anwendung verursachen könnte, abgeglichen werden. Um die volle Leistung von Nanosilber ausschöpfen zu können, muss ein grundlegendes Verständnis der Wechselwirkungen von Nanosilber

mit biologischen Systemen entwickelt werden. Dies hat in den letzten Jahren eine grosse Anzahl von Studien angeregt, die die Toxizität von Nanosilber gegenüber biologischen Systemen untersucht. Ein systematisches Verständnis der physikalischen Eigenschaften die die Toxizität beeinflussen, muss dennoch erstellt werden.

Im Kapitel 1, wird ein Überblick über die Herstellungsverfahren von Silber Nanoteilchen und deren biologischen Wechselwirkungen mit Bakterien und Säugetierzellen präsentiert. Es werden die wichtigsten Mechanismen der Nanosilber Toxizität mit einem Schwerpunkt auf die Freilassung von Ag^+ Ionen diskutiert sowie die physikochemischen Eigenschaften, die diese beeinflussen. Die Toxizität von Nanosilber von unterschiedlicher Grösse und mit verschiedener Oberflächenbeschichtungen werden verglichen, um die Einschränkungen der heute verwendeten Systeme zu unterstreichen. Die biomedizinischen Anwendungen von Nanosilber werden auch in Bezug auf deren antimikrobiellen und plasmonischen Eigenschaften besprochen, moderne Prozesse und Produkte werden zusammengefasst, aber auch weitere Herausforderungen werden aufgezeigt.

Im zweiten Kapitel wird der Einfluss von freigesetzten Ag^+ Ionen auf die antibakterielle Aktivität von Silber Nanoteilchen untersucht. Dafür wurden Silber Nanoteilchen mit genauer Kontrolle ihrer Grösse auf nanostrukturiertem Siliziumdioxid hergestellt und die Freisetzung von Ag^+ Ionen von diesen Teilchen in wässrigen Lösungen erforscht. Kleinere Silber Nanoteilchen setzten höhere Anteile von Ag^+ Ionen frei, was auf ein grössenabhängiges Phänomen hindeutet. Die antibakterielle Aktivität gegenüber *E. coli* in der Gegenwart von Nanosilberteilchen und Ionen oder nur von Ionen wurde weiter untersucht. Wenn kleine (< 10 nm) Nanosilberteilchen die einen hohen Anteil von Ag^+ Ionen freisetzen, eingesetzt

werden, wird die antibakterielle Aktivität von diesen Ionen beherrscht. Wenn aber im Vergleich grössere (> 10 nm) Nanosilberteilchen, die nicht viele Ag^+ Ionen freisetzen, verwendet werden, ist die antibakterielle Aktivität der Partikel und der Ionen vergleichbar.

Im dritten Kapitel, wird die Dosis-Beziehung der antibakteriellen Aktivität von Nanosilber auf nanostrukturiertem Siliziumdioxidteilchen mit Schwerpunkt auf dem kleinen Grössenbereich (< 10 nm) untersucht wo die Freisetzung von Ag^+ Ionen von grosser Bedeutung ist. Der Einfluss der Silikon- und Silberausgangsstoffen auf die Morphologie der hergestellten Nanoteilchen wird auch erforscht. Diese Nanosilberteilchen haben ähnliche Ag^+ Ionenfreisetzung unabhängig von den verwendeten Ausgangsstoffen. Die antibakterielle Aktivität von diesen Nanoteilchen gegenüber *E. coli* mit verschiedenen Konzentrationen und Grössen wurde untersucht. Die Nanosilber Oberflächenkonzentration in der Suspension, eher als Nanosilber Masse- oder Anzahlkonzentration, entspricht am besten der gemessenen antibakteriellen Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass Nanosilber Dosis-Beziehungen in toxikologischen Studien am genauesten sein könnten, wenn sie hinsichtlich der Silber Oberfläche ausgewertet werden.

Der Ursprung der freigesetzten Ag^+ Ionen von der Nanosilber Oberfläche wird im Kapitel 4 untersucht. Die Ag^+ Ionenfreisetzung von der Ag/SiO_2 Verbundstruktur in den Nanoteilchen, die mittels Flammen- oder Nassphasensynthese hergestellt worden sind, wird untersucht und in direkter Verbindung zu ihrer Grösse gesetzt, unabhängig von dem Herstellungsverfahren. Ausserdem ist die Ag^+ Ionenfreisetzung minimal, wenn Nanosilber mittels H_2 reduziert und in metallisch umgewandelt wird. Dies deutet darauf hin, dass die Ag^+ Ionen von der Auflösung der Oxidschicht der Silberteilchen stammen. Tatsächlich

kann die Ag^+ Ionenfreisetzung quantitativ auf die Auflösung von eine oder zwei Oxidoberflächensichten, abhängig von der Nanosilber Grösse, zurückgeführt werden und somit wird die Massenbilanz geschlossen. Die antibakterielle Aktivität von gewaschenen Nanosilberteilchen ist tiefer als die von den hergestellten, unbehandelten Nanosilber, da Ag^+ Ionen nicht freigesetzt werden. Stattdessen kann die antibakterielle Aktivität auf den Kontakt der Bakterien mit der Nanosilberoberfläche zurückgeführt werden.

Das von den oben erwähnten Ergebnissen erzielte Verständnis wurde eingesetzt um Nanosilberteilchen, die keine Toxizität aber ihre erwünschten optischen Eigenschaften aufweisen, im Kapitel 5 zu entwickeln. Eher grosse (> 30 nm) Nanosilberteilchen wurden hergestellt und in situ mit einer nanodünnen SiO_2 Schicht umhüllt. Die vollständig beschichteten Nanosilberteilchen waren gegenüber *E.coli* nicht toxisch im Gegensatz zu den nur teilweise beschichteten Partikeln. Die inerte SiO_2 Beschichtung ermöglichte die einfache Dispersion von diesen Nanosilberteilchen in wässrigen Lösungen und verhinderte erheblich die Flockenbildung. Dies vereinfachte deren Verwendung als plasmonische Biosensoren. Die biosensorischen Eigenschaften wurden durch die Erkennung von Rindenserumalbumin in einer Durchflusszelle untersucht und die Verschiebung von dem plasmonischen Absorptionsband wurde verfolgt. Die vollständig umhüllten Nanosilberteilchen übertrafen die teilweise Beschichteten, und sie könnten deshalb als nicht-toxische plasmonische Biosensoren verwendet werden.

Schliesslich im Kapitel 6, wurde die weitere Anwendung von Nanosilberteilchen in Bioabbildung untersucht. Hier wurden Nanosilberteilchen zusammen mit Eisenoxidteilchen hergestellt, und sogenannte Janus-ähnliche Strukturen sind entstanden. Die Verbundteilchen wurden auch in situ mit einer

nanodünnen SiO₂ Schicht umhüllt. Diese speziell entworfenen multifunktionellen Nanoteilchen zeigten die jeweiligen erwünschten plasmonischen und magnetischen Eigenschaften von Nanosilber und Eisenoxidteilchen. Ausserdem verhinderte die SiO₂ Schicht die Flokkulation der Teilchen in wässrigen und biologischen Pufferlösungen und verhinderte erheblich die toxische Ag⁺ Ionenfreisetzung von den Nanosilberteilchen. Daher wiesen diese mehrkomponenten plasmonisch-magnetisch Nanoteilchen keine Zytotoxizität gegenüber HeLa Zellen während 24 Stunden Inkubation auf. Des Weiteren, wurde ihre Oberflächenfunktionalisierung mit einem Antikörper bestätigt indem die Verschiebung ihrer plasmonischen Absorptionsbande verfolgt wurde. Diese biofunktionalisierten multifunktionellen Nanoteilchen wurden selektiv an Zielzellen (HeLa und Raji Zellen) gebunden und konnten mittels in Dunkelfeldbeleuchtung nachgewiesen werden.

Das Potential von Nanosilber, als multifunktionelles Biomaterial verwendet zu werden, war hauptsächlich durch ihre inhärente Toxizität eingeschränkt. In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass, wenn ein grundlegendes Verständnis der Kenngrössen die die Toxizität beeinflussen ermittelt wird, Nanosilberteilchen hergestellt werden können, die die gewünschten Eigenschaften ohne den nachteiligen aufweisen. Dieses Verständnis könnte bei der Entwicklung von Nanosilberprodukten mit ausgezeichneten Leistungen helfen, die in einer Vielfalt von Anwendungen eingesetzt werden könnten.