

Síntesis de nanopartículas de plata soportadas sobre capa-S de *Lentilactobacillus kefir* con aplicación en catálisis y efecto antimicrobiano.

Bolla, Patricia A*¹, Minnaard Jessica², Serradell María de los Ángeles³, Casella Mónica L.¹

1- Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge J. Ronco" - (CINDECA; CONICET CCT La Plata, UNLP, CICIPBA), Calle 47 N° 257 (B1900AJK) La Plata, Argentina.

2- Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA; CONICET CCT La Plata, UNLP CICIPBA) Calle 47, (B1900AJJ) La Plata, Argentina

3- Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP) Calle 47 y 115, La Plata, Argentina.

pbolla@quimica.unlp.edu.ar

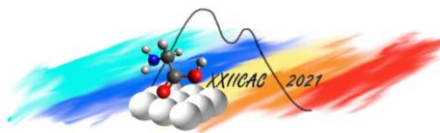
Palabras Claves: Bionanocatalizador, capa S, Plata, Antimicrobiano, Catálisis

Resumen

Las nanopartículas de plata (AgNp) exhiben buena actividad catalítica y se utilizan como agentes antimicrobianos, propiedades que dependen no solo de su tamaño y orientación, sino de su estabilidad. Por otro lado, la toxicidad y el daño medioambiental generados durante la síntesis de estos sistemas ha impulsado el desarrollo de métodos biosintéticos verdes, incluyendo la utilización de soportes biológicos como *biotemplates*. El objetivo del trabajo fue sintetizar AgNp empleando proteínas de capa-S de *L. kefir* (S8) como soporte, y evaluar su actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y su aplicación en la reducción catalítica de colorantes. Las AgNp soportadas (Ag/S8) presentaron un tamaño medio $dn=1.9$ nm ($ds=2.65$ nm; $dv/dn=1.6$) y se evidenció la estructura cristalina de las AgNp por observación de los planos cristalinos (111). El desempeño de bionanocatalizador Ag/S8 en las reacciones de reducción de Azul de metileno y Rojo Congo fue excelente, con conversiones del 100% y 91 % respectivamente, las cuales se mantuvieron inalteradas luego de 4 ciclos de reutilización. A su vez, en ensayos realizados en medio líquido, Ag/S8 mostró efecto bactericida frente a *St. aureus*, *B cereus* y *E. coli*. Estos resultados posicionan a Ag/S8 como una herramienta interesante con aplicaciones en decontaminación ambiental.

Abstract

Silver nanoparticles (AgNp) exhibit good catalytic activity and are used as antimicrobial agents, properties that depend not only on their size and orientation, but also on their stability. On the other hand, the toxicity and environmental damage generated during the synthesis of these systems has prompted the development of green biosynthetic methods, including the use of biological supports as *biotemplates*. The aim of this work was to synthesize AgNp using S-layer proteins from *L. kefir* (S8) as support, and to evaluate both their antimicrobial activity against pathogenic bacteria and their application in the catalytic reduction of dyes. The supported AgNp (Ag/S8) presented an average size of $dn=1.9$ nm ($ds=2.65$ nm; $dv/dn=1.6$) and the crystal structure of AgNp was evidenced by observation of the crystalline planes (111). The performance of Ag/S8 as bionanocatalyst in the reduction of Methylene Blue and Congo Red was excellent, showing conversions of 100% and 91 %, respectively, which remained unchanged after 4 cycles of reuse. In turn, Ag/S8 showed bactericidal effect against *St. aureus*, *B cereus* and *E. coli* in assays performed in liquid medium. These results position Ag/S8 as an interesting tool with applications in environmental decontamination.



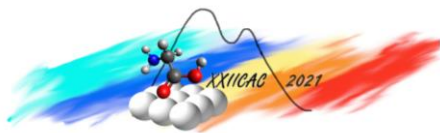
Introducción

Los catalizadores basados en nanopartículas (Np) de metales nobles con geometría controlada son muy atractivos por sus excepcionales propiedades fisicoquímicas en comparación con sus homólogos másicos. Las nanopartículas de plata (AgNp) ofrecen ventajas para aplicaciones de biosensores, (plasmónicos y electrónicos), y catalizadores, con importantes perspectivas como agentes antimicrobianos contra bacterias y hongos patógenos [1-7]. Los enfoques fisicoquímicos utilizados para la síntesis de Np metálicas implican el uso de productos químicos tóxicos y peligrosos que pueden ser perjudiciales para el medio ambiente, como los agentes utilizados para la reducción de soluciones de sales metálicas y los solventes. Estos productos químicos tóxicos absorbidos en cantidades mínimas en la superficie de las Np limitan sus aplicaciones en los campos clínicos [8]. Las razones antes mencionadas llevaron a estudiar la biosíntesis de AgNp por métodos verdes. Idealmente, los métodos de síntesis de Np deberían ser rentables, no deberían implicar peligros tóxicos y deberían ofrecer propiedades superiores a los nanomateriales sintetizados tradicionalmente. En particular, la síntesis de las AgNp conlleva dificultades asociadas con su tendencia a la agregación, oxidación y baja estabilidad [9]. La actividad catalítica de Np metálicas a bajas temperaturas está asociada a su tamaño y morfología [10,11]. En este sentido, el soporte juega un papel importante en la estabilidad de los AgNP, reduciendo su agregación y mejorando su actividad catalítica. La síntesis de clusters nanométricos y subnanométricos surge como una herramienta innovadora para el desarrollo de nuevos compuestos, componentes nanoelectrónicos y catalizadores [12-18]. La cuantificación de los niveles de energía de un pequeño grupo de metales tiene características similares a las del átomo aislado, por lo que presentan propiedades únicas. El uso de plantillas biológicas o poliméricas ha hecho posible obtener clusters de metales de tamaño controlado [12,14].

La naturaleza exhibe fascinantes estructuras regulares estrechamente relacionadas con la nanotecnología, lo que los hace candidatos para su uso como *biotemplates*. Los *biotemplates*, como las proteínas de capa-S (SLP), son una alternativa económica, fácil de usar y respetuosa con el medio ambiente para la síntesis de nanoestructuras de tamaño controlado, dirigidas y orientadas por poros de tamaño regular y característico. Además, los *biotemplates* actúan como estabilizadores de Np metálicas a temperatura ambiente. La capa S es una estructura superficial presente en ciertas bacterias y en arqueas. Por lo general, están formadas por un solo tipo de proteína, con un peso molecular que varía de 40 a 200 kDa. Normalmente, las SLP exhiben un alto contenido de aminoácidos hidrófobos, ácido glutámico y ácido aspártico y de lisina, y pueden estar o no glicosiladas. La capa S posee una estructura de celosía periódica con celdas unitarias compuestas por dos, cuatro o seis subunidades idénticas, y se han reportado simetrías oblicuas (p1, p2), cuadradas (p4) y hexagonales (p6) [19]. Dado que una red de capa S puede describirse simplemente mediante la disposición periódica de los dominios de proteínas conectados por brazos, es obvio que solo son posibles unos pocos tamaños de poros diferentes en la red de proteínas [20]. El elevado orden postula a las SLP como candidatas para la síntesis de AgNp con aplicación en catálisis y con efectos antimicrobianos.

Las AgNp presentan buena performance catalítica en reacciones de reducción [21,22]. Los colorantes orgánicos se utilizan ampliamente en industrias como la textil, la papelera, la farmacéutica y la alimentaria [23,24], pero, su uso excesivo conduce a la contaminación ambiental por aguas residuales, lo que ha sido una gran preocupación durante mucho tiempo. Por eso, el control de los efluentes industriales es un trabajo indispensable que ayuda en la creación de un ambiente limpio e inocuo. El Azul de metileno y el Rojo Congo son colorantes de naturaleza catiónica y aniónica, respectivamente [25]. Estos colorantes se utilizan ampliamente en las industrias textil, del papel, del caucho y del plástico, y provocan graves daños ecológicos al medio ambiente si se descargan sin la debida acción. Por tanto, el desarrollo de un método sencillo para la degradación eficaz de estos tintes es de gran importancia.

Por otro lado, la implementación de AgNp como agentes antimicrobianos contra bacterias y hongos patógenos está en constante estudio [26-28], y requiere de un equilibrio entre la síntesis estructurada y dirigida, y una obtención amigable con el medio ambiente. La aparición de cepas bacterianas patógenas resistentes a antibióticos es un serio problema a nivel mundial, y requiere del desarrollo de nuevas



estrategias terapéuticas. La combinación de AgNp con antibióticos podría ser beneficiosa, aumentando la eficacia antibacteriana sinérgica [7,29].

En este trabajo se propone sintetizar AgNp orientadas y dirigidas por las SLP de *L. kefir*, y evaluar su actividad antimicrobiana y aplicación en catálisis y medioambiente.

Experimental

Extracción y aislamiento de proteínas de capa S.

Las proteínas de capa S (SLP) fueron extraídas de la cepa *L. kefir* CIDCA 8348 (S8). Para la extracción y purificación de las SLP se empleó cloruro de guanidinio 5M como agente disruptor, siguiendo el protocolo descrito por Bolla y col [21].

Preparación de AgNp soportadas sobre SLP S8.

Las AgNp se prepararon poniendo en contacto proteína S8 (1 mg/ml) con una solución de AgNO₃ de 0,85 mg/mL durante 24 h a 25°C. Luego, la reducción de Ag se llevó a cabo bajo flujo de H₂ a presión atmosférica y 25°C. Las AgNp soportadas sobre SLP (Ag/S8) se centrifugaron y los sedimentos se lavaron repetidamente con base Tris 0,05 M (pH=7,2). Finalmente, los sólidos se resuspendieron en agua MilliQ hasta su uso.

Caracterización de los bionanocatalizadores de plata (Ag/S8)

El catalizador Ag/S8 se caracterizó utilizando un microscopio Philips CM200-UT (LaB6) (Amsterdam, Países Bajos) operado a 200 kV. Este instrumento también permitió realizar análisis de rayos X de energía dispersiva (EDS). La muestra se preparó colocando una gota de la dispersión de Ag/S8 directamente sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono. La distribución del tamaño de partícula se determinó contando más de 300 AgNp utilizando el software ImageJ. La cantidad de metal en el catalizador se determinó por espectroscopía de absorción atómica

Estudio de la performance del bionanocatalizador Ag/S8 frente a las reacciones de reducción de colorantes Azul de metileno (AM) y Rojo Congo (RC)

La performance catalítica de Ag/S8, se evaluó estudiando la reducción de AM y RC con NaBH₄. El progreso de cada reducción se siguió observando la disminución de los máximos de absorción correspondientes (665 nm para el AM y 475 nm para el RC). Las reacciones se llevaron a cabo usando una celda de cuarzo, mezclando 0,05 mL del catalizador con 0,15 mL de AM o RC 200 mg/L, NaBH₄ 10 mM y agua MilliQ hasta volumen final de 1,5mL. La reducción se realizó a presión atmosférica y temperatura ambiente en un espectrofotómetro Cintra 20 (GBC Scientific Equipment, Braeside, Victoria, Australia). Los espectros de absorción entre 400 y 700 nm se registraron periódicamente. La conversión (X%) se calculó de la siguiente manera: $X\% = (A_0 - A_t) \cdot 100 / A_0$; donde A₀ y A_t son las absorbancias a cero y a tiempo t (min), respectivamente. Las reacciones estudiadas mostraron una cinética de pseudo-primer orden con respecto a la concentración del reactivo. Se obtuvieron las curvas ln(A/A₀) vs tiempo mediante las cuales se determinó la constante de velocidad inicial K_{app}. Los (TOF) se calcularon mediante la ecuación:

$$TOF = \frac{n(C)K_{app}M_{Ag}}{m_{Ag}D}$$

donde n(C) son moles de AM o RC, m_{Ag} es la masa de Ag en el catalizador, M_{Ag} es la masa atómica de plata y K_{app} es la constante de tasa aparente.

Actividad antimicrobiana de las AgNps soportadas sobre SLP S8

La actividad antimicrobiana de Ag/S8 se evaluó frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* ATCC 10876 (ambas Gram-positivas) y *Escherichia coli* ATCC 25912 (Gram-negativa). Se realizaron cultivos en agar LB durante 24 h a 37°C, luego se resuspendió una colonia en caldo LB, y se incubó a 37°C hasta DO=0,1. Se pusieron en contacto distintas cantidades de Ag/S8 (25, 50 y 80 µL) con 10 µL de patógeno (1×10^5 UFC/ml) en placas de 96 pocillos, y se incubaron durante 18 h a 37°C. Luego de ello, se sembraron 10 µL del contenido de cada pocillo en placas de agar nutritivo (AN) y se incubaron 24 h a 37°C para evaluar el desarrollo de colonias. En todos los casos se realizaron controles de crecimiento de los patógenos, esterilidad del medio de cultivo y efecto de la SLP S8 sin AgNp. Los ensayos realizaron por triplicado y en tres experimentos independientes.

Resultados

Caracterización del bionanocatalizadores de plata.

EL bionanocatalizador Ag/S8 obtenido mostró tamaños de partículas de tamaño medio $d_n = 1.9$ nm ($d_s = 2.65$ nm; $d_v / d_n = 1.6$) (Figura 1A). La microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM), la transformada rápida de Fourier (FFT) y la difracción electrónica de área seleccionada (SAED) de los AgNp se muestran en la Figura 1B. La presencia de AgNp fue confirmada por EDS (no mostrado). Además, se evidenció la estructura cristalina de las AgNp por observación de los planos cristalinos (111) en cada patrón de difracción (Figura 1B). El contenido de Ag obtenido por absorción atómica fue de 0.28%p/p.

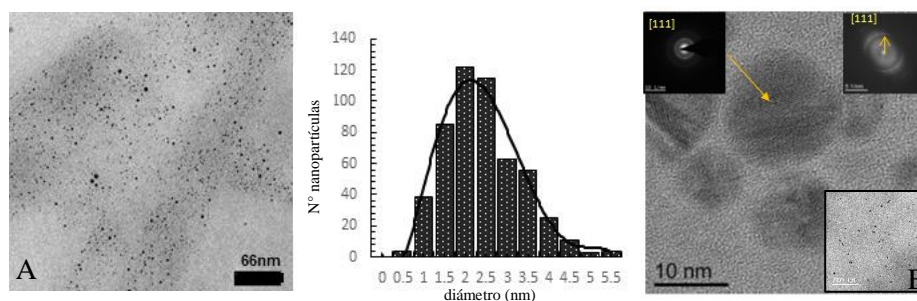


Figura 1: Imágenes TEM y HRTEM de AgNp depositadas sobre SLP S8. Histograma de distribución de tamaño

Estudio de la performance del bionanocatalizadores Ag/S8 frente a las reacciones de reducción de colorantes AM y RC.

Las reacciones de reducción de AM y RC se estudiaron espectrofotométricamente por desaparición de los picos a 665 y 475 nm, respectivamente, como se observa en las Figuras 2A y 2B. El desempeño de bionanocatalizador Ag/S8 frente a las reacciones de reducción de AM y RC fue excelente, con conversiones del 100% y 91 % respectivamente. En la Tabla 1 se observan las velocidades de reacción en términos de las Kapp. Si bien ambas Kapp mostraron valores elevados, la reducción de AM transcurre más rápidamente que la de RC. Se obtuvieron valores de TOF muy elevados que acompañan la excelente performance de los bionanocatalizadores Ag/S8 (Tabla 1).

Tabla 1: Parámetros inherentes a la performance catalítica

Reactivo (30mg/L)	Kapp (min ⁻¹)	TOF (min ⁻¹)
AM	0.9227	64700
RC	0.2571	8005

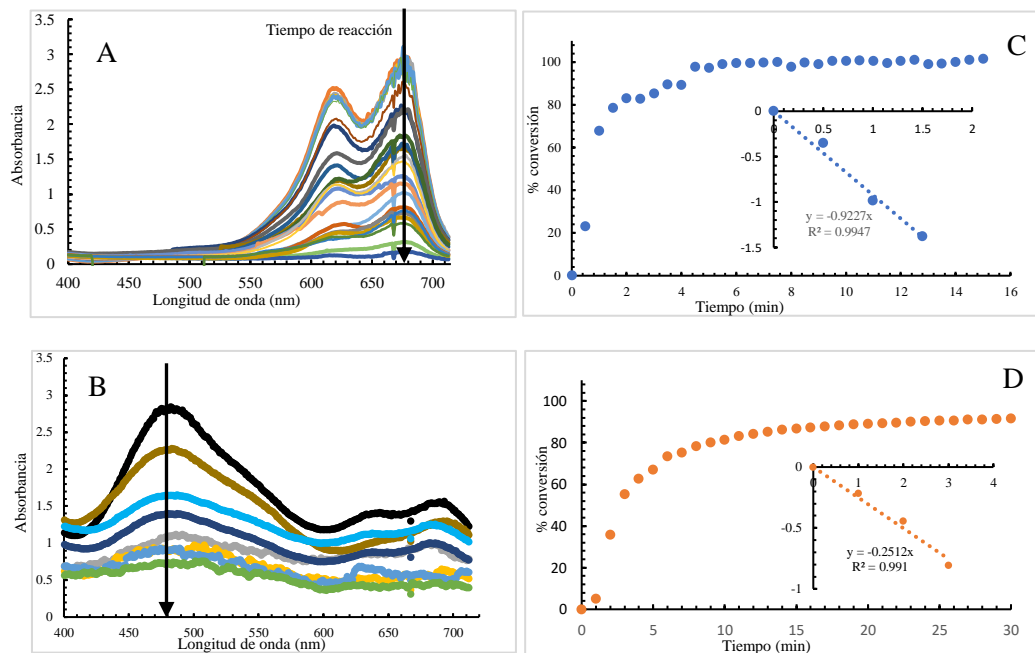


Figura 2: Espectros de absorción en función del tiempo: AM (A) y RC (B). Curvas de conversión vs tiempo de AM (C) y RC(D) con las correspondientes curvas de $\ln A_0/A$ vs tiempo.

La reutilización del catalizador a lo largo de 4 ciclos mostró un comportamiento inalterado para ambas reacciones, con una caída significativa en la conversión a partir del sexto ciclo para el RC con un porcentaje de conversión de 80% (Figura 3).

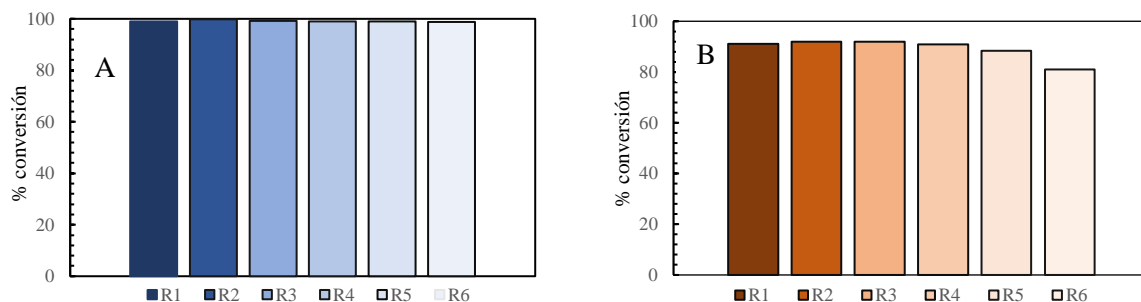
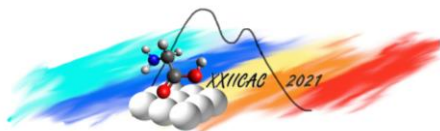


Figura 3: Conversión en cada reutilización del bionanocatalizador Ag/S8 frente a la reacción de reducción de Azul de metileno (A) y Rojo Congo (B).

Actividad antimicrobiana de las AgNps soportadas sobre SLP S8.

Los resultados de la actividad antimicrobiana del sistema Ag/S8 se muestran en la Tabla 2. Se observó un efecto bactericida sobre las tres bacterias patógenas estudiadas en las condiciones en las que se utilizó mayor cantidad de Ag/S8 (50 y 80 μL). En el caso de *E. coli*, dicho efecto se observó aún con la menor concentración de Ag/S8 ensayada. Sin embargo, para este patógeno, la SLP S8 pareciera contribuir en cierta medida al efecto bactericida observado.

**Tabla 2.** Resultados del desarrollo de colonias en AN. (+): detectable; (-) no detectable.

	<i>E. coli</i>	<i>St. aureus</i>	<i>B. cereus</i>
80 μ l Ag/SLPS8	-	-	-
50 μ l Ag/SLPS8	-	-	-
25 μ l Ag/SLPS8	-	+	+
80 μ l SLPS8	-	+	+
50 μ l SLPS8	+	+	+
25 μ l SLPS8	+	+	+

Conclusiones

Se obtuvieron AgNp soportadas sobre proteína de capa-S (S8) de dimensiones nanométricas, estables, dirigidas y orientadas, utilizando con excelente modo de síntesis amigable con el medio ambiente. El sistema mostró propiedades antimicrobianas frente a tres bacterias patógenas estudiadas y una excelente performance catalítica en la reducción de dos colorantes, convirtiéndose en una herramienta sustentable para la descontaminación de efluentes industriales.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la ANPCyT, al CONICET y a la UNLP por el financiamiento recibido para la realización de este trabajo.

Referencias

- [1] K. Rajamanickam, S. Sudha, M. Francis, T. Sowmya, J. Rengaramanujam, P. Sivalingam, K. Prabakar. *Spectrochim. Acta A* 113 (2013) 10–14.
- [2] K.D. Arunachalam, S.K. Annamalai. *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 2375–2384.
- [3] D.P. Tamboli, D.S. Lee, J. Hazard. *Mater.* 260 (2013) 878–884.
- [4] A. Javed Musarra. *Technol.* 101 (2010) 8772–8776.
- [5] R. Thomas, K.R. Soumya, J. Mathew, E.K. Radhakrishnan, J. Photochem. *Photobiol. B* 149 (2015) 68–77.
- [6] M. Vivek. *AJMB* 3 (2011) 143–148.
- [7] I. Ghiuț, D. Cristea, C. Croitorub, J. Kost, R. Wenkert, I. Vyrides, A. Anayiotos, D. Munteanu. *Appl. Surf. Sci.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.09.163>.
- [8] P. Jena, S. Mohanty, R. Mallick, B. Jacob, A. Sonawane. *Int. J. Nanomed.* 7 (2012) 1805–1818.
- [9] G. Liao, W. Zhao, Q. Li, Q. Pang, Z. Xu. *Water. Chem. Lett.* 46 (2017) 1631–1634.
- [10] C. Kästner, A.F. Thünemann. *Langmuir* 32 (2016) 7383–7391.
- [11] P. Zhao, X. Feng, D. Huang, G. Yang, D. Astruc. *Co-ord. Chem. Rev.* 287 (2015) 114–136.
- [12] A. Corma, P. Concepción, M. Boronat, M.J. Sabater, J. Navas, M.J. Yacaman, E. Larios, A. Posadas, M.A. López-Quintela, D. Buceta, et al. *Nat. Chem.* 5 (2013), 775–781.
- [13] Y. Lu, W. Chen. *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 3594–3623.
- [14] Y. Zhang, H. Dai. *Appl. Phys. Lett.* 77 (2000) 3015–3017.
- [15] L.A. Peyser, D. Roos, C.C. Winterbourn. *Science* 291 (2001) 103–106.
- [16] M. Brust, C.J. Kiely, D. Bethell, D.J. Schirrin. *Am. Chem. Soc.* 120 (1998) 12367–12368.
- [17] A. Okrut, R.C. Runnebaum, X. Ouyang, J. Lu, C. Aydin, S.-J. Hwang, S. Zhang, O.A. Olatunji-Ojo, K.A. Durkin, D.A. Dixon, et al. *Nat. Nanotechnol.* 9 (2014) 459–465.
- [18] Y.A. Attia, D. Buceta, C. Blanco-Varela, M.B. Mohamed, G. Barone, M.A. López-Quintela, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 1182–1185.
- [19] M. Bobeth, A. Blecha, A. Blüher, M. Mertig, N. Korkmaz, K. Ostermann, G. Rodel, W. Pompe. *Langmuir* 27 (2011) 15102–15111.
- [20] D. Pum, A. Breitwieser, U.B. Sleytr. *Crystals* (2021), <https://doi.org/10.3390/cryst11080869>
- [21] P.A. Bolla, A. Sanz, S. Huggias, J.F. Ruggera, M.A. Serradell, M.L. Casella. *Mol. Catal.* 481 (2020) 110262.
- [22] P.A. Bolla, S. Huggias, M.A. Serradell, J.F. Ruggera, M.L. Casella. *Nanomaterials* 10 (2020) 2322.
- [23] B.H. Hameed, L. Ahmad, K.N. Latiff. *Dye. Pigment.* 75 (2007) 143–149.
- [24] W.C. Wanyonyi, J.M. Onyari, P.M. Shiundu. *Energy Proc.* 50 (2014) 862–869.
- [25] N. Narband, M. Uppal, C.W. Dunnill, G. Hyett, M. Wilson, M. Parkin. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 10513–10518.
- [26] K. Rajamanickam, et al. *Spectrochim. Acta A* 113 (2013) 10–14.
- [27] K.D. Arunachalam, S.K. Annamalai. *Int. J. Nanomed.* 8 (2013) 2375–2384.
- [28] D.P. Tamboli, D.S. Lee, J. Hazard. *Mater.* 260 (2013) 878–884.
- [32] K.B. Laupland. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 (2008) 1041–1047.