



# XX CAC 2017

## CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017  
CORDOBA-ARGENTINA

### Obtención de arreglos regulares de nanopartículas metálicas sobre proteínas de capa S aisladas de *Lactobacillus kefir*. Estudio de su capacidad catalítica.

**Bolla, Patricia A.<sup>1,2\*</sup>, Sanz, Agustina<sup>1</sup>, Huggias, Sofia<sup>1</sup>, Ruggera, José F.<sup>1,2</sup>, Serradell, M de los Angeles<sup>2,3</sup>; Casella, Mónica L.<sup>1</sup>**

*1 Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas "Dr. J. Ronco" (CINDECA), CCT-CONICET La Plata y Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, 47 N°257, 1900, La Plata (BA), Argentina.*

*2 Universidad Nacional Arturo Jauretche, Av. Calchaqui N° 6200, Florencio Varela (BA), Argentina.*

*3 Grupo de Microbiología, Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Exactas UNLP, 47 y 115, 1900, La Plata (BA), Argentina.*

*pbolla@quimica.unlp.edu.ar.*

**Palabras Claves:** Capa-S, Bionanocatálisis, Platino, Hidrogenación, *p*-nitrofenol

#### Resumen

Se desarrolla un procedimiento sencillo para la preparación de catalizadores nano estructurados que utilizan proteínas de capa-S bacteriana como plantilla para un ensamblaje ordenado de nanopartículas metálicas de platino en una matriz periódica bidimensional. La síntesis de nanopartículas de platino que se anclan a la capa S se logra mediante la reducción química de la plantilla de proteína con la sal metálica. La microscopía electrónica de transmisión revela la estructura regular de la proteína. La disposición periódica de nanopartículas es dictada por la estructura nativa de la matriz de las proteínas de capa S, ya que las ubicaciones de nanopartículas se encuentran correlacionadas con los sitios nanométricos de la matriz de las capas S. Estas estructuras Pt-capas S podrían tener un potencial uso como catalizadores ya que muestran una gran actividad catalítica con porcentajes de conversión de entre el 40 y el 80% en la reducción de *p*-nitrofenol a *p*-aminofenol utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor.

#### Abstract

We are developing a simple procedure for the preparation of nanostructured catalysts that use bacterial S-layer proteins as a template for an orderly assembly of platinum nanoparticles in a regular two-dimensional array. The synthesis of nanoparticles of platinum anchored to the S-layer is achieved by chemical reduction of the protein with the metallic salt. Transmission electron microscopy reveals the regular structure of the protein. The regular array of nanoparticles is determined by the native structure of the S-layer protein, since the position of nanoparticles correlates with nanometric sites of the S-layer proteins. These Pt-S-layer structures could have a potential use as catalysts as they show a high catalytic activity with conversion rates between 40 and 80% of reduction of *p*-nitrophenol to *p*-aminophenol using NaBH<sub>4</sub> as a reducing agent.



XX CAC 2017

## CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS

DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017  
CORDOBA-ARGENTINA

### Introducción

La nanobiotecnología es un campo de investigación emergente, que constituye una interface entre la nanotecnología y las ciencias de la vida. Esta disciplina se ocupa tanto del descubrimiento de nuevos bio-materiales en nanoescala, como del desarrollo de nuevas técnicas experimentales y teóricas para la creación de nanosistemas innovadores y materiales nanoestructurados [1]. La producción, caracterización y aplicación de nanopartículas de metales nobles se ha convertido en un tema de rápido desarrollo de la ciencia y la tecnología modernas. El área de la formación y manipulación de nanoestructuras se ha visto recientemente influenciado por el uso de plantillas biológicas que permiten transferir aspectos fundamentales de auto-ensamblaje biológico.

Las propiedades estructurales de las plantillas biomoleculares pueden ser utilizadas para un depósito controlado de material inorgánico. Partículas de diferentes metales nobles de tamaño nanométrico se pueden utilizar en catálisis [2], biomedicina [3], así como en biosensores y quimiosensores ópticos [4]. Junto con la gran variedad de plantillas utilizadas para la producción de nanopartículas metálicas, las plantillas biológicas son ventajosas ya que proporcionan una matriz no tóxica para el medio ambiente. El elevado orden de las capas superficiales proteicas paracristalinas de algunas bacterias se utilizaron como matrices para la producción de nanopartículas de platino, paladio, y oro sin modificaciones químicas [5,6,7]. Dentro de las proteínas superficiales con capacidad de formar plantillas se destacan las proteínas de capa-S. Presentan una estructura regular bidimensional cuasi cristalina, constituidas por proteínas o glicoproteínas con un peso molecular que oscila entre los 40 y 200 kDa, con un espesor de 5 a 15 nm, y constituyen la envoltura celular más externa de muchas bacterias y arqueas [8]. La capa S muestra diferentes simetrías: oblicua (P1, P2), cuadrada (P4) o hexagonal (P3, P6), con constantes de red que van de 3 a 30 nm y tienen tamaños de nanoporos bien definidos. Las subunidades de la proteína se unen entre sí por enlaces no covalentes y por esta razón tienen la capacidad de ser liberadas fácilmente por tratamiento con agentes caotrópicos, quelantes, o por cambios en el pH y la fuerza iónica [8]. La capa-S está compuesta por subunidades idénticas dispuestas periódicamente, lo cual conduce a una distribución espacial precisa de sitios con características fisicoquímicas particulares que pueden ser utilizadas para llevar a cabo una reacción química específica.

Una de las propiedades más importantes de las subunidades aisladas de proteínas de capa-S es su capacidad de autoensamblarse formando arreglos monomoleculares, a escala nanométrica, tanto en suspensión, como en interfaces aire-líquido, sobre superficies sólidas (materiales plásticos, siliconas, láminas de oro), sobre monocapas lipídicas o sobre liposomas o partículas [9]. Estas particulares características permiten emplear a las capas-S como plantillas para la obtención de *clusters* metálicos con una estrecha distribución de tamaños de partícula [10]. Por otra parte, la posibilidad de reconstituir capas-S *in vitro* en cristales bidimensionales de gran superficie hace de ellas una plantilla biomolecular casi ideal para la ingeniería supramolecular.

Se han generado con éxito nanopartículas de Pd y Pt sobre capa-S por reducción de  $K_2PdCl_4$  y  $K_2PtCl_4$  en soluciones de capa-S [10]. El enlace de los complejos de las sales de los metales de transición con el *biotemplate* ha demostrado ser el paso crucial en este proceso, pero el mecanismo de enlace aún no está dilucidado. De acuerdo con los resultados obtenidos en algunos experimentos llevados a cabo con diferentes complejos de platino [11], es bastante probable que las interacciones electrostáticas del complejo con los sitios cargados de la capa-S desempeñen un papel importante. Así, por ejemplo, se ha encontrado que un complejo neutro tal como  $PtCl_2(H_2O)_2$  es capaz de unirse en mayor proporción que un complejo aniónico tal como  $PtCl_4^{2-}$ . Las capas-S de especies tales como *Sporosarcin aureae* y *Bacillus sphaericus* son capaces de unir tanto como 200-300 complejos de Pd o Pt por monómero de proteína, lo que sugiere un enlace con los grupos de aminoácidos [12]. Tanto la reducción *in vitro* de complejos de Pd enlazados a una capa-S con agentes reductores suaves [5, 12] o su reducción *in-situ* con un haz electrónico en un equipo de TEM [12] condujo a la formación de arreglos regulares de nanopartículas de Pd.



**XX CAC 2017**

## **CONGRESO ARGENTINO DE CATÁLISIS**

**DEL 1 AL 3 DE NOVIEMBRE DE 2017  
CORDOBA-ARGENTINA**

En este trabajo se plantea el desafío de obtener bionanocatalizadores de Pt, utilizando como *template* proteínas de capa-S de lactobacilos. Los sistemas obtenidos se estudian en su desempeño frente a la reacción de reducción de *p*-nitrofenol, utilizando NaBH<sub>4</sub> como agente reductor.

### **Experimental**

#### *Selección de cepas bacterianas.*

Se utilizaron las cepas de *L. kefir* CIDCA 8348 y *L. kefir* CIDCA 83111 pertenecientes a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-CIC-UNLP), disponibles en la Cátedra de Microbiología de la FCE de la UNLP. Las bacterias se cultivaron en caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) durante 48 h a 32°C, en aerobiosis.

#### *Extracción de Proteínas de Capa-S*

A partir de los cultivos en fase estacionaria en caldo MRS, ajustado a DO=1 a 600 nm, las células se cosecharon por centrifugación a 16000 g durante 20 min a 4 °C. Después de la primera etapa de centrifugación, las células se lavaron tres veces por resuspensión repetida / centrifugación a 16 000 g con buffer fosfato-salino (PBS). Después de las etapas de lavado, el sedimento se resuspendió en un volumen de 10 veces de buffer 5x 10<sup>-2</sup> M Tris-Cl pH=7.2, clorhidrato de guanidinio 5 M, se agitó durante 20 min a temperatura ambiente, y se centrifugó a 40000 g de 30 min a 10 °C. El sobrenadante que contenía a la proteína de capa S se recogió y se centrifugó de nuevo a 40000 g durante 30 min a 10 °C (2 veces). El sobrenadante clarificado se sometió a cromatografía de exclusión de tamaño utilizando una columna Superdex 200 (GE Healthcare). Las fracciones que contenían la capa S se agruparon y se dializaron frente a buffer 5x 10<sup>-2</sup> M Tris pH=7.8, 10<sup>-3</sup> M tetra acetato de etilendiamina (EDTA). Finalmente, las soluciones de de capa S purificada se ajustaron para dar una concentración de proteína de stock de aproximadamente 5x 10<sup>-6</sup> M, y se almacenaron a 4 °C. La pureza de la proteína de capa S se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) y se tiñó con Coomassie Blue.

#### *Caracterización de la proteína*

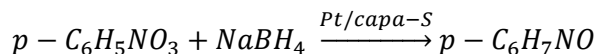
La caracterización de la proteína se llevó a cabo fundamentalmente por microscopía electrónica de transmisión (TEM) Las grillas carbon-coated copper que contenían la proteína de capa-S se analizaron en un instrumento de microscopía electrónica de transmisión JEOL modelo 1200EX operado a una tensión de aceleración de 80 kV. Se utilizó ácido fosfotúngstico como contraste.

#### *Preparación de biocatalizadores soportados de nanopartículas de Pt.*

La preparación de los biocatalizadores, correspondientes a las 2 capa-S aisladas (CBS83111 y CBS8348), se realizó utilizando soluciones de cloro complejos de platino 5% p/v, los cuales se redujeron sobre la capa-S usando H<sub>2</sub> como reductor. Típicamente, 1.50mL de suspensión de proteína de capa-S de concentración aproximada 1 mg/mL, se puso en contacto con 300 µL de solución de PtCl<sub>4</sub><sup>-2</sup> 5% p/v, durante 24 h a 25°C. Luego de la etapa de depósito de Pt, se centrifugó a 3500 rpm y se colectaron ambas fracciones. Se realizaron lavados exhaustivos con buffer Tris-Cl por resuspensión repetida y centrifugación a 16000 g, recuperando ambas fracciones. Los sobrenadantes se conservaron a fin de determinar el contenido de Pt no adherido; el sólido corresponde al catalizador a evaluar. El catalizador se resuspendió en 5 mL de agua nanopura y se redujo en corriente de H<sub>2</sub> a 25°C.

Un procedimiento análogo se utilizó para preparar un catalizador partiendo de una solución 2.5%p/v de PtCl<sub>4</sub><sup>-2</sup>.

*Actividad Catalítica. Aplicación en la reacción de reducción de p-nitrofenol*



Se evaluaron los dos catalizadores correspondientes a la utilización de cada una de las proteínas de capa-S como *template*, en 5 cantidades diferentes (**Tabla 1**). Cada catalizador se evaluó frente a la mezcla de reacción de 0,5 mL de *p*-nitrofenol  $2.5 \times 10^{-5}M$  con 0.5 mL de  $NaBH_4$  1M. El avance de la reacción se siguió mediante la utilización de espectroscopía UV-visible (*espectrofotómetro Thermo modelo Helios  $\gamma$* ), siguiendo el cambio de color del medio al reducirse el *p*-nitrofenol.

**Tabla 1.** Diseño del experimento. Las condiciones son las mismas para el catalizador CBS8311 como para el CBS8348.

Componentes	M1	M2	M3	M4	M5
<i>p</i> -nitrofenol	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
$NaBH_4$	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL	0.5 mL
Catalizador	0.2 mL	0.4 mL	0.6 mL	0.8 mL	1.0 mL
Agua miliQ	1.8mL	1.6 mL	1.4 mL	1.2 mL	1.0 mL

Los datos serán expresados como porcentaje de conversión ( $x\%$ ):

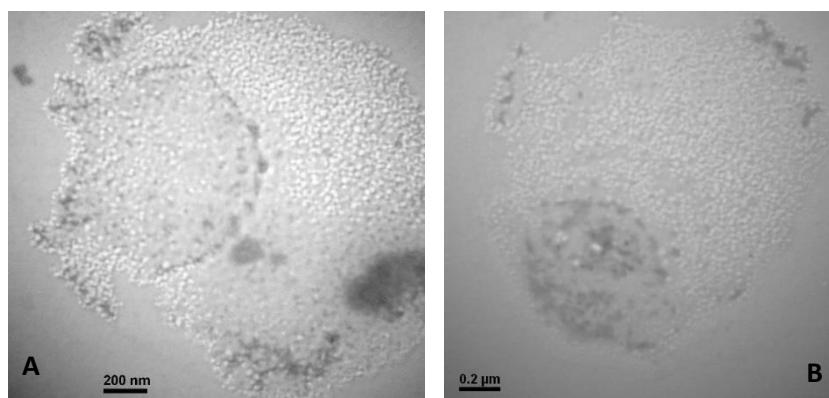
$$x\% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

donde  $A_0$  es la absorbancia inicial y  $A_t$  la absorbancia medida al tiempo  $t$ .

## Resultados y Discusión

### Caracterización de la proteína

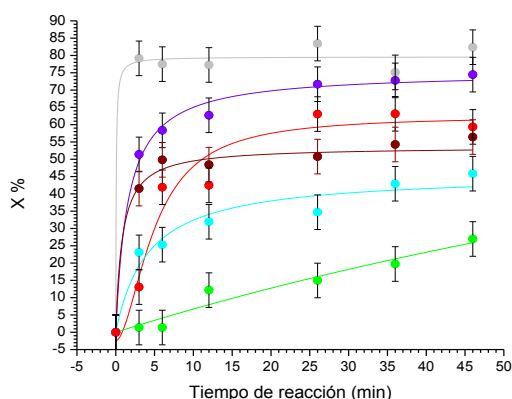
A fin de conocer el despliegue estructural que presentan las proteínas de capa-S que se utilizaron como *template* para los nuevos catalizadores, se obtuvieron imágenes de microscopía TEM. En la **Figura 1** se muestran imágenes obtenidas por microscopía TEM de la proteína purificada. Se observan arreglos regulares de la proteína con tendencia hacia una geometría hexagonal de partículas nanométricas de dimensión entre 30-40 nm. Este ordenamiento regular hace a la proteína un candidato adecuado para la constitución de catalizadores nanoestructurados. Sin embargo, la resolución debería ser mayor para tener una idea más acabada de la estructura.



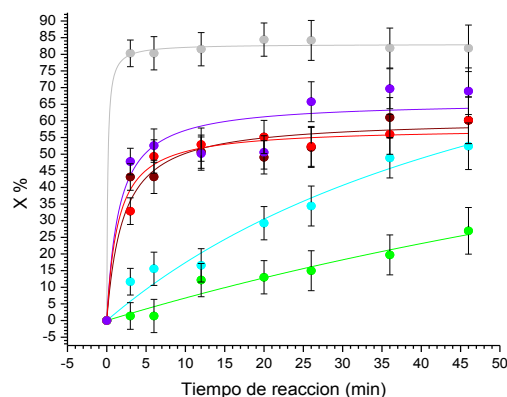
**Figura 1:** imagen tomada con microscopio de transmisión TEM de proteínas de capa-S de *L. kefir*. Proteína de capa-S 8348 (A), proteína de capa-S 83111 (B).

### Actividad Catalítica. Aplicación en la reacción de reducción de *p*-nitrofenol

Bajo condiciones neutras o ácidas, el *p*-nitrofenol muestra un fuerte pico de absorción a 317 nm. Con la adición de NaBH<sub>4</sub>, aumenta la alcalinidad de la solución y los iones *p*-nitrofenolatos se convierten en la especie dominante, lo cual provoca un desplazamiento espectral a 400 nm para el pico de absorción. Este pico permanece inalterado con el tiempo en ausencia de un catalizador. La adición de una pequeña cantidad del catalizador Pt-Proteína de capa-S provoca el desvanecimiento y el blanqueo final del color amarillo de la mezcla de reacción, conduciendo a valores de conversión que van entre el 40 y el 80% según la cantidad de catalizador adicionado (**Figuras 2 y 3**). Estos resultados indican que la nanoestructura Pt-Capa-S puede catalizar con éxito la reacción de reducción. A estos elevados valores de conversión se llega rápidamente, aproximadamente 3 min, en cualquiera de las combinaciones catalizador-reactivos.

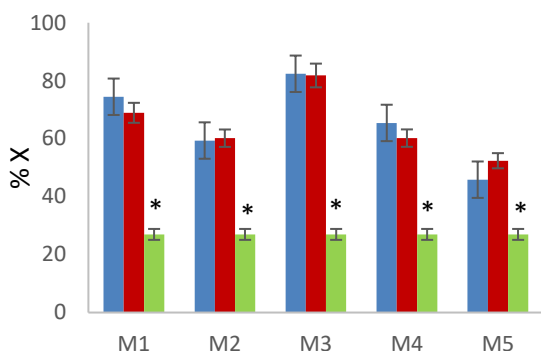


**Figura 2:** Conversión de *p*-nitrofenol para los catalizadores preparados con la cepa CBS8311. Las curvas corresponden a distintas cantidades de catalizador Pt/capa-S: M3 (●), M1 (●), M4 (●), M2 (●), M5 (●), Blanco (●)

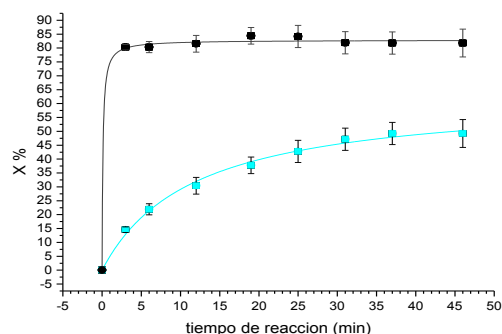


**Figura 3:** Conversión de *p*-nitrofenol para los catalizadores preparados con la cepa CBS8348. Las diferentes curvas representan distintas cantidades de catalizador Pt/capa-S: M3 (●), M1 (●), M4 (●), M2 (●), M5 (●), Blanco (●)

Con ambos catalizadores se observa que existe una proporción óptima (M3), si bien en todos los casos existe una mayor conversión en presencia de catalizador respecto a la reacción control (**Figura 4**). La caída en la conversión en la reacción donde se utilizan cantidades crecientes de catalizador podría deberse a que al aumentar la concentración de catalizador la proteína utilizada como plantilla produzca agregados disminuyendo la superficie específica expuesta de Pt/capa-S. Tomando en cuenta la proporción M3 como la cantidad óptima de catalizador a utilizar en la mezcla de reacción, se evaluó el efecto producido por un catalizador construido a base de la misma cantidad de proteína, pero menor concentración de K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> (2.5%p/v). Como puede verse en la **Figura 5**, a menor concentración de PtCl<sub>4</sub><sup>-2</sup> se observa una disminución del porcentaje de conversión al cabo de 40 min. Este comportamiento podría ser una consecuencia de (i) cambios en los tamaños de las nanopartículas en las superficies de la proteína y (ii) una disminución en el contenido de metal en la superficie de la proteína. Al respecto serían necesarios estudios estructurales de alta resolución y condiciones de entorno adecuadas para encontrar conclusión acabada obre este comportamiento.



**Figura 4:** Conversión de *p*-nitrofenol al cabo de 46 min para las diferentes cantidades de catalizador Pt/capa-S, utilizando como soporte las cepas CBS8348 (■) y CBS8311 (●) respecto al control de reacción sin catalizador (◻). Test Student  $p < 0.05$  (\*)



**Figura 5:** Conversión de *p*-nitrofenol en función del tiempo para las condiciones M3 utilizando la cepa CBS8348 y diferentes contenidos de Pt: 5%p/v (●) y 2.5% p/v (◻).

### Conclusiones

Se obtuvieron bionanocatalizadores de Pt, utilizando como *template* proteínas de capa-S de dos cepas diferentes de *L. kefir*. Los sistemas generados resultaron activos para la reducción de *p*-nitrofenol en presencia de  $\text{NaBH}_4$ , en particular aquellos que contienen un 5 %p/v de Pt. Se requiere profundizar con estudios estructurales de alta resolución y en condiciones adecuadas para completar el análisis del comportamiento de los mismos frente a este tipo de reacciones.

### Agradecimientos

Agradecemos al CONICET (PIP 0276) por el financiamiento aportado para el desarrollo de este trabajo. Al CINDECA y Laboratorio de Microbiología por poner a disposición el material y equipamiento para el desarrollo del mismo.

### Referencias

- [1] Phoenix D. A. and Ahmed W., Nanobiotechnology. Manchester, U.K.: One Central Press, 2014.
- [2] Ilk N, Egelseer EM, Sleytr UB 2011 Curr Opin Biotechnol 22 824-831.
- [3] M. Gerstmayr, N. Ilk, I. Schabussova, B. Jahn-Schmid, E.M. Egelseer, U.B Sleytr, C. Ebner, B. Bohle, J. Immunol. 179 (2007) 7270-7275.
- [4] Scheicher SR, Kainz B, Köstler S, Reitingner N, Steiner N, Dittlbacher H, Leitner A, Pum D, Sleytr UB, Ribitsch V. Biosens. Bioelectron. 40(1) (2013) 32-37.
- [5] Wahl R., Mertig M., Raff J., Selenska-Pobell S., Pompe W. Advanced Materials, vol. 13, pp. 736-740, 2001.
- [6] Fahmy K., Merroun M., Pollmann K., Raff J., Savchuk O., Hennig C., Selenska-Pobell S., Biophysical Journal, vol. 91, pp. 996-1007, 2006.
- [7] Jankovski U., Merroun M., Selenska-Pobell S., Fahmy K. Spectroscopy, vol. 24, pp. 177-181, 2010.
- [8] Sára M, Sleytr UB. J. Bacteriol. 2000, 182: 859-868.
- [9] Schuster B, Sleytr UB 2013 Nanotechnology with s-layer proteins Methods Mol Biol 996 153-175.
- [10] Mertig M, Kirsch R, Pompe W, Engelhardt H. Eur. Phys. J. D 1999, 9: 45.
- [11] Wahl R., Reguläre bakterielle Zellhüllen proteine als biomolekulares Templat, PhD Thesis, University of Technology, Dresden (2003).
- [12] Wahl R., Engelhardt H., Pompe W., Mertig M., Chemistry of Materials 17 (2005) 1887.