



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral:***

***Obtención de arreglos regulares metálicos  
sobre superficies de sistemas nanopartícula-  
proteína y su aplicación en catálisis.***

---

***Tesista: Lic. Sofía Huggias***

***Director: Dr. Pablo J. Peruzzo***

***Codirectora: Dra. Patricia A. Bolla***

***Año: 2022***

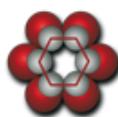
El presente trabajo de tesis doctoral se desarrolló para acceder al grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas (UNLP), y se llevó a cabo bajo la dirección del Dr. Pablo J. Peruzzo y la codirección de la Dra. Patricia A. Bolla.

La realización del mismo fue posible gracias a una beca doctoral otorgada por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

El trabajo presentado se realizó en el grupo LaCQOMS del Centro de Investigación en Ciencias Aplicadas “Dr. Jorge Ronco” (CINDECA, CIC - CONICET CCT La Plata) y el Grupo Macromoléculas del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, CIC - CONICET CCT La Plata), ambos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Buenos Aires, Argentina.



Facultad de Ciencias Exactas | UNLP



**CINDECA**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO  
EN CIENCIAS APLICADAS “Dr. Jorge J. Ronco”



**CONICET**

U N L P

A Mónica y Julio.

## AGRADECIMIENTOS

Que placer culminar esta gran etapa pudiendo agradecer a las personas e instituciones que han sido parte y, de distintas formas, hicieron posible esta tesis.

¡Gracias!

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme una beca doctoral y a la Universidad Nacional de La Plata-Facultad de Ciencias Exactas por la formación y el financiamiento. Al Centro de Investigación y Desarrollo de Ciencias Aplicadas “Dr. J. Ronco” (CINDECA) y al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) por abrirme sus puertas para realizar este trabajo de tesis.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica por el financiamiento otorgado.

Al Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS-CNPEM-Brasil) por financiar la estadía gracias a la cual se realizaron los análisis SAXS presentados en este trabajo.

A YPF-Tecnología (Y-TEC) por el uso del microscopio de transmisión electrónica. En especial a Alberto Carneiro y Alejandra Floridia por su colaboración.

A Fernanda Faisal por su ayuda durante el uso del microscopio de transmisión electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV).

A la Sociedad Argentina de Catálisis por la beca otorgada gracias a la cual realicé una pasantía formativa en el Centro Atómico Bariloche (CNEA). Gracias a Julio Azcárate por dirigir dicha pasantía, enseñándome los infinitos pormenores de la microscopía de transmisión electrónica con toda la alegría que lo caracteriza.

A mis directores. A Pablo, por enseñarme con infinitas analogías y ejemplos graciosos como resolver, casi cualquier, problema. Por acompañarme en todos y cada uno de los procesos, incluso en las titulaciones frustradas. A Pato, por la oportunidad y los constantes votos de confianza y consejos. Por abrirme la puerta y guiarme (no solo académicamente) a través de un universo, para que el pensé que no estaba hecha. ¡Gracias por tanta paciencia P&P, son geniales!

A Mónica Casella, quien por el 2014 me invitó a participar en la docencia y dio inicio a este recorrido. Desde ese momento siempre está alentando, celebrando logros, acompañando en cada instancia, aconsejando sabiamente e, incluso, riéndose de mis peores chistes. ¡Gracias Moni por el aguante y la generosidad!

A Maria Serradell, quien junto a Pato, afrontó la ardua labor de acompañar a una química en sus primeros pasos por el bio-mundo. Gracias por orientarme y enseñarme, hasta las cosas más simples, con paciencia y dedicación. ¡Gracias por tantos cultivos y Bradford Mari!

La interdisciplinariedad de la propuesta me dio la oportunidad de trabajar y compartir mis días con distintos grupos de investigación. Gracias por alegrar los espacios, darme banquitos para superar las barreras de la estatura, por las polimerizaciones felices, por cuidar las nano-hijas y por las propuestas más insólitas ante cada ayuda que necesité. Hemos compartido viajes, risas, infinitas bromas, comidas, horas (muchísimas), crisis, festejos y accidentes de los más cómicos, todo con una complicidad increíble. Marisa, Maia, Laura B., Eugenia, Mariano, Lucas, Luz, Leticia B., Tamara, Susana, Soledad, Leticia M., Pablo F., Gabriel, Hernán B., Yanina ¡Gracias por tanto! Gracias Daniela Lick por tu colaboración.

Una mención aparte merece la inmensa, desinteresada y constante ayuda de una dupla que cualquiera envidiaría. Gracias Cutu y Esteban. Ustedes saben que, desde que empieza hasta que termina el día, lo más difícil es sobrevivir a los eventos inexplicables, y ¡siempre lo hemos logrado! Gracias Esteban por medir hasta lo inmedible. Gracias Cutu por el FT-legado y las torrecitas.

Cada vez que alguien me busca digo “Si no estoy por acá, me encuentran en la cátedra”. Comparto equipo docente con un plantel con el que iría a cualquier parte. Gracias al *dream-team* por tanta diversión, enseñanzas, consejos, meriendas, aguante, festejos, por celebrar éxitos y entrar en crisis conmigo ante el caos. Gracias a quienes dan vida a las cátedras de Química Analítica Instrumental y Química Analítica III. Gracias Mónica y Pato por hacerme parte del equipo. Gracias Marisa, Tebi, Soledad, Marina, Ezequiel, Ayelén, Hernán S., Laura V., Gregorio, Edgardo, Jorge.

A mis amigas y amigos, de acá, de allá y del recorrido. En especial, a Maca y Coti quienes desde hace años festejan cada logro como propio y comparten cada tristeza de igual forma. Nos acompañamos desde Saladillo, y a donde sea que vaya sé que están ahí. Gracias por saber que decir, siempre, incluso cuando (alguna que otra vez) ni yo lo sé.

A Braian. Quien me responde con un “vos podes” a cada “esto no me va a salir jamás” (y eso que son muchos por día). Por ser un gran compañero, por bancar cada etapa desde el amor. ¡Gracias por apostar por mí, siempre!

A mi familia. En especial, a mi mamá, Mónica. Gracias por ser un ejemplo de resiliencia, por tanto amor, por acompañar cada situación, buena o mala, con las mejores comidas de festejo o consuelo. Por dejarme ser libre y esperarme en casa cuando es hora de volver.

Gracias a mi hermano, Thomas, por criticar constructivamente, transmitir calma en el huracán, por el soporte técnico y anímico. Gracias por tantos “no enloquezcas, pensalo”.

Mi familia está repartida por el mundo, y a cada rincón hago llegar un agradecimiento por estar siempre pendientes, encontrándonos o no, haciendo uso de todas y cada una de las vías tecnológicas existentes pero siempre acompañándome. Una mención especial a mi madrina, Viviana, cada vez que se

avecina el fin del mundo te pregunto qué hacer y siempre sabes cómo guiarme para salir ilesa de ahí. ¡Gracias por tanto amor!

A mi abuelo Julio. Quien ojalá pudiera acompañarme (a la ausencia no hay quien se acostumbre. Otro sol no es tu sol, aunque te alumbre). Te extraño todos los días y te agradezco inmensamente haber puesto todas tus fichas en mí cuando no había pronósticos de buen clima. Gracias por convencerme de lo más importante, que podía ser quien quisiera ser. Gracias por regalarme tanto amor, tanto que sigue acá.

Tengo el mejor equipo. Infinitas gracias.

Sofia



# RESUMEN

El diseño y preparación de arreglos regulares de nanopartículas metálicas tienen gran relevancia en la actualidad ya que han demostrado tener propiedades catalíticas excepcionales. Uno de los mayores desafíos en este campo es desarrollar métodos que permitan obtener estos ensamblados en nanoescala perfectamente dirigidos y controlados. Desde la bionanotecnología se han introducido grandes aportes, entre los que se destaca el empleo de proteínas en estrategias de construcción biomolecular. En este sentido, las proteínas de capa-S han emergido como bloques de construcción de arreglos de nanopartículas metálicas al combinar la capacidad para autoensamblarse formando arreglos nanométricos sobre distintas superficies, a su habilidad para sintetizar nanopartículas metálicas. No obstante, aún quedan muchos aspectos por explorar sobre estas proteínas con el fin de desarrollar nuevos productos tecnológicos basados en nanopartículas metálicas para su aplicación en catálisis.

Por esto, el presente trabajo de tesis propone el diseño de un sistema compuesto por proteínas de capa-S y partículas poliméricas para su posterior empleo en la síntesis de nanopartículas metálicas con la finalidad de obtener un bionanocatalizador activo frente a reacciones de hidrogenación en fase acuosa.

El mismo inicia con la síntesis de cuatro dispersiones acuosas de partículas poliméricas, diseñadas con el propósito de ofrecer a las proteínas de capa-S una variedad de superficies sobre las que adsorberse. Las dispersiones obtenidas resultaron ser coloidalmente estables, con partículas de tamaño similar y con densidad de carga superficial negativa asociada a la presencia de grupos oxhidrilos, sulfatos y/o carboxilatos. Por otra parte, se realizó la extracción y purificación de dos proteínas de capa-S de dos cepas de *Lactobacillus kefir*. Las proteínas de capa-S fueron caracterizadas fisicoquímicamente en término de su composición, peso molecular, punto isoelectrico, estructura secundaria y geometría bidimensional.

Se estudió la adsorción de las proteínas sobre las partículas poliméricas realizando isotermas de adsorción que fueron modeladas según el modelo de Langmuir-Freundlich. Los sistemas resultantes fueron caracterizados fisicoquímicamente y morfológicamente evidenciándose una morfología "core-shell".

Empleando sistemas los polímero/proteína seleccionados, se lograron obtener nanopartículas de metales nobles (Pt o Ag) soportadas. El conjunto (polímero/proteína-nanopartícula metálica) presentó una morfología "strawberry", observándose nanopartículas metálicas de entre 2 y 20 nm estabilizadas sobre los soportes polímero/proteína.

Los bionanocatalizadores obtenidos fueron evaluados frente a la reacción de reducción de *p*-nitrofenol. La performance catalítica observada fue excelente, con conversiones del orden del 95% y tiempos que variaron según la concentración del catalizador empleado en condiciones suaves de reacción. A su vez, los mismos pudieron reutilizarse en hasta 10 ciclos de uso con una disminución leve a moderada de su actividad catalítica. Estos no presentaron alteraciones fisicoquímicas importantes post-reacción.

De esta manera, se logró diseñar y obtener bionanocatalizadores con excelente desempeño catalítico formados por nanopartículas de metales nobles sintetizadas (dirigidas, estabilizadas) y soportadas sobre sistemas partícula polimérica/proteína de capa-S.

# INDICE DE CONTENIDO

I	15	<u>INTRODUCCIÓN GENERAL</u>
	17	<u>I.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SU APLICACIÓN EN CATÁLISIS</u>
	17	<u>I.1.1 Nanopartículas metálicas: Propiedades y síntesis</u>
	21	<u>I.1.2 Aplicación de las nanopartículas metálicas en catálisis</u>
	22	<u>I.1.2.1 Nanopartículas de platino</u>
	23	<u>I.1.2.2 Nanopartículas de plata</u>
	25	<u>I.2 PROTEÍNAS DE CAPA-S</u>
	28	<u>I.2.1 Autoensamblaje de proteínas de capa-S</u>
	31	<u>I.2.2 Empleo de las proteínas de capa-S como plantillas</u>
	35	<u>I.3 SISTEMAS POLIMÉRICOS</u>
	35	<u>I.3.1 Polímeros acrílicos</u>
	36	<u>I.3.1.1 Polimerización en emulsión</u>
	39	<u>I.3.1.1.1 Características microestructurales</u>
	40	<u>I.3.2 Poliuretanos</u>
	41	<u>I.3.2.1 Método del prepolímero</u>
	42	<u>I.4 INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS Y SUPERFICIES POLIMÉRICAS</u>
	42	<u>I.4.1 Adsorción de proteínas sobre superficies poliméricas</u>
	47	<u>I.4.1.1 Interacción entre proteínas y partículas poliméricas</u>
	50	<u>I.5 CATÁLISIS: CONCEPTOS BÁSICOS Y REDUCCIÓN ACUOSA DE <i>p</i>-NITROFENOL</u>
	51	<u>I.5.1 Conceptos básicos</u>
	53	<u>I.5.2 Reducción acuosa de <i>p</i>-nitrofenol</u>
II	58	<u>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>
III	61	<u>SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS POLIMÉRICAS</u>
	61	<u>III.1 INTRODUCCIÓN</u>
	61	<u>III.1.1 Síntesis de las dispersiones acrílicas</u>
	64	<u>III.1.2 Síntesis de la dispersión poliuretánica</u>
	67	<u>III.2 MATERIALES Y MÉTODOS</u>
	67	<u>III.2.1 Reactivos</u>
	67	<u>III.2.2 Obtención de las dispersiones acuosas de partículas acrílicas</u>
	69	<u>III.2.3 Obtención de la dispersión acuosa de poliuretano</u>
	70	<u>III.2.4 Caracterización de las dispersiones poliméricas</u>
	70	<u>III.2.4.1 Contenido de sólidos</u>
	70	<u>III.2.4.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)</u>
	71	<u>III.2.4.3 Potencial Z</u>
	71	<u>III.2.4.4 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</u>

72	<u>III.2.4.5 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)</u>
73	<u>III.2.4.6 Titulaciones Conductimétricas</u>
74	<u>III.2.4.7 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)</u>
75	<u>III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>
75	<u>III.3.1 Caracterización de las partículas poliméricas</u>
75	<u>III.3.1.1 Tamaño de partícula (DLS), potencial Z y contenido de sólidos</u>
76	<u>III.3.1.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</u>
78	<u>III.3.1.3 Titulaciones Conductimétricas</u>
80	<u>III.3.1.4 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)</u>
82	<u>III.3.1.5 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)</u>
85	<u>III.4 CONCLUSIONES PARCIALES</u>

## IV

88	<u>EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CAPA-S</u>
88	<u>IV.1 INTRODUCCIÓN</u>
88	<u>IV.1.1 Proteínas de capa-S empleadas en este trabajo</u>
90	<u>IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS</u>
90	<u>IV.2.1 Reactivos y Buffers</u>
91	<u>IV.2.2 Extracción y purificación de las proteínas de capa-S</u>
92	<u>IV.2.3 Caracterización de las proteínas de capa-S</u>
92	<u>IV.2.3.1 Cuantificación de proteínas en el extracto</u>
92	<u>IV.2.3.2 Peso molecular aparente</u>
93	<u>IV.2.3.3 Caracterización por FTIR-TEM-DLS y potencial Z</u>
93	<u>IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>
93	<u>IV.3.1 Extracción y cuantificación de las proteínas de capa-S</u>
93	<u>IV.3.2 Caracterización de las proteínas de capa-S</u>
93	<u>IV.3.2.1 Peso molecular aparente</u>
94	<u>IV.3.2.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y potencial Z</u>
96	<u>IV.3.2.3 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</u>
100	<u>IV.3.2.4 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)</u>
102	<u>IV.4 CONCLUSIONES PARCIALES</u>

## V

105	<u>OBTENCIÓN DE LOS SISTEMAS POLÍMERO/PROTEÍNA</u>
105	<u>V.1 INTRODUCCIÓN</u>
105	<u>V.1.1 Adsorción de proteínas de capa-S a superficies poliméricas</u>
106	<u>V.1.2 Isotermas de Adsorción</u>
106	<u>V.1.2.1 Modelo de Langmuir</u>
108	<u>V.1.2.2 Modelo de Freundlich</u>
109	<u>V.1.2.3 Modelo de Langmuir-Freundlich</u>
110	<u>V.1.2.4 Modelo de Temkin</u>
110	<u>V.1.2.5 Comparación entre los modelos</u>

111	<u>V.1.2.6 Selección del mejor ajuste</u>
112	<u>V.2 MATERIALES Y MÉTODOS</u>
112	<u>V.2.1 Reactivos y Buffers</u>
112	<u>V.2.2 Construcción de las isotermas de adsorción</u>
114	<u>V.2.3 Caracterización de los soportes polímero/proteína</u>
115	<u>V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>
115	<u>V.3.1 Isotermas de adsorción</u>
119	<u>V.3.2 Selección de los soportes</u>
121	<u>V.3.3 Caracterización de los soportes polímero/proteína</u>
121	<u>V.3.3.1 Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y potencial Z</u>
122	<u>V.3.3.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</u>
125	<u>V.3.3.3 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)</u>
126	<u>V.3.3.4 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)</u>
130	<u>V.4 CONCLUSIONES PARCIALES</u>

## VI

133	<u>PREPARACIÓN DE LOS BIONANOCATALIZADORES</u>
133	<u>VI.1 INTRODUCCIÓN</u>
134	<u>VI.2 MATERIALES Y MÉTODOS</u>
134	<u>VI.2.1 Reactivos</u>
134	<u>VI.2.2 Preparación de los bionanocatalizadores de platino y plata</u>
136	<u>VI.2.3 Caracterización de los bionanocatalizadores</u>
136	<u>VI.2.3.1 Contenido metálico</u>
137	<u>VI.2.3.2 Caracterización por TEM y SAXS</u>
137	<u>VI.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>
137	<u>VI.3.1 Preparación de los bionanocatalizadores de platino y plata</u>
139	<u>VI.3.2 Caracterización de los bionanocatalizadores</u>
139	<u>VI.3.2.1 Contenido metálico</u>
139	<u>VI.3.2.2 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</u>
148	<u>VI.3.2.3 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)</u>
151	<u>VI.4 CONCLUSIONES PARCIALES</u>

## VII

154	<u>ESTUDIO DE LA PERFORMANCE CATALÍTICA: REDUCCIÓN DE <i>p</i>-NITROFENOL</u>
154	<u>VII.1 INTRODUCCIÓN</u>
155	<u>VII.1.1 Catálisis heterogénea reducción de <i>p</i>-nitrofenol: Mecanismo de Langmuir-Hinshelwood</u>
157	<u>VII.2 MATERIALES Y MÉTODOS</u>
157	<u>VII.2.1 Reactivos</u>
157	<u>VII.2.2 Evaluación del desempeño catalítico de los bionanocatalizadores desarrollados</u>
159	<u>VII.2.3 Ensayos de reutilización</u>

159	<u>VII.2.4 Caracterización de los catalizadores luego de la reacción</u>
160	<u>VII.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>
161	<u>VII.3.1 Desempeño catalítico de los bionanocatalizadores</u>
168	<u>VII.3.2 Ensayos de reutilización</u>
173	<u>VII.3.3 Caracterización de los catalizadores reutilizados</u>
173	<u>VII.3.3.1 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)</u>
177	<u>VII.3.3.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)</u>
180	<u>VII.4 CONCLUSIONES PARCIALES</u>

## VIII

### CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

182	<u>VIII.1 CONCLUSIONES GENERALES</u>
183	<u>VIII.2 PERSPECTIVAS A FUTURO</u>

### ANEXOS

184	<u>Anexo I (Análisis de proteínas mediante espectroscopía infrarroja)</u>
187	<u>Anexo II (Análisis de la permanencia en suspensión de polímeros y proteínas)</u>
188	<u>Anexo III (Análisis estadístico de los modelos de adsorción)</u>
191	<u>Anexo IV (Ensayos de reutilización)</u>

### INDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

194	<u>Esquemas</u>
195	<u>Figuras</u>
199	<u>Imágenes</u>
201	<u>Tablas</u>
203	<u>Abreviaturas</u>

## IX

206	<u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>
-----	-----------------------------------

# I

*Capítulo 1*

# INTRODUCCIÓN GENERAL



En el presente capítulo introductorio se abordarán los aspectos teóricos más relevantes involucrados en el desarrollo de este trabajo, con el fin de exponer el marco conceptual de esta tesis doctoral.

Con el propósito mencionado previamente, se presentan las nanopartículas metálicas junto con los desafíos involucrados en la obtención de las mismas, y se contextualiza la importancia de éstas en el campo de la catálisis, con particular atención a los sistemas formados por nanopartículas metálicas soportadas.

Dado que los soportes a emplear estarán constituidos por la combinación de proteínas con partículas poliméricas, se presentan las proteínas de capa-S y se describen las características generales que las han convertido en una herramienta en creciente expansión en el campo de la nanobiotecnología, y una introducción al diseño de partículas poliméricas en fase dispersa.

En adición se describe la interacción de las proteínas con diversas superficies poliméricas como parte del diseño racional de soportes que involucren estos componentes.

Por último, se presenta la reacción utilizada para evaluar el desempeño de los catalizadores, fundamentando su empleo como test catalítico, además de su importancia industrial y medioambiental.

# I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En las últimas décadas hemos entrado en la denominada "nano-era" en la cual la revolución científica tiene a la nanociencia, disciplina dedicada al estudio de los fenómenos físicos, químicos y biológicos que ocurren a escala nanométrica, en el centro del progreso tecnológico. Esto es gracias a la creciente capacidad de manipular la materia a una escala dentro del rango nanométrico. El campo multidisciplinar que relaciona estos conocimientos para la aplicación tecnológica de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través de la manipulación en forma precisa de la materia en la nanoescala se lo conoce como nanotecnología. Los posibles beneficios y consecuencias del control de la materia en la nanoescala aún no son completamente conocidas.

El interés por la utilización de los nanomateriales en diferentes ramas de la ciencia se ha incrementado en los últimos años, y todo indica que seguirá haciéndolo en los próximos [Recuperado de <https://exaly.com/trends/?q=nanomaterial>, 06/22]. Las formas en la nanoescala de derivados del carbono (fullerenos, nanotubos y grafeno) [Kumar & Kumbhat, 2016], los nanomateriales orgánicos (como los nanocristales de celulosa) [Habibi et al., 2010], las vesículas poliméricas [Rideau et al., 2018], y los nanomateriales inorgánicos (nanopartículas metálicas y cerámicas) [Thomas et al., 2015] proporcionan bloques de construcción para el montaje de materiales funcionales nanoestructurados. Las aplicaciones potenciales en diversos campos de la física, la química, la ciencia de los materiales, la medicina y la biología, hacen del estudio de las nanopartículas un área predilecta [Khan et al., 2019].

En particular, la preparación de nanopartículas metálicas (MNPs) para una amplia gama de aplicaciones ha sido muy investigada. Se han utilizado MNPs de oro en el área biomédica ya que pueden ser fácilmente funcionalizadas con un amplio abanico de ligandos (anticuerpos, polímeros, sondas de diagnóstico, fármacos, material genético, etc.) utilizándolas como test clínicos diagnósticos, como antimicrobianos, antitumorales, etc [Hu et al., 2020; Yeh et al., 2012]. Por su parte, las nanopartículas de platino y paladio han mostrado tener aplicaciones en el campo de la catálisis, biosensores y en medicina [Siddiqi & Husen, 2016; Bloch et al., 2021; Jeyaraj et al., 2019.]. Las MNPs de plata son ampliamente estudiadas para el desarrollo de diversas aplicaciones basadas en su propiedad antibacteriana y antifúngica [Zhang et al., 2016], aunque también pueden exhibir un buen desempeño como catalizadores [Yan, 2014].

Sin embargo, con la sostenibilidad ecológica como criterio emergente de diseño desde mediados de los 90s, existe todavía un margen de mejora en las metodologías de síntesis empleadas. Idealmente, las MNPs deberían prepararse empleando el precursor menos tóxico disponible, realizando la síntesis preferencialmente en agua o en solventes amigables con el medio ambiente, usando el menor número de reactivos/pasos, consumiendo la mínima cantidad de energía posible, y optimizando la generación de subproductos y residuos. Cumpliendo con estas condiciones, se debe además lograr la obtención de MNPs con características adecuadas para la aplicación requerida [Campelo et al., 2008; Gedanken, 2004; Kappe, 2008; Budarin et al., 2008; Zhang & Wang, 2006].

Otro de los desafíos tecnológicos más importantes que involucra el empleo de MNPs es el desarrollo de métodos que permitan obtener ensamblados en nanoescala perfectamente dirigidos y controlados. La posibilidad de obtener MNPs en arreglos regulares en 2D y 3D conduce no solo a nuevos materiales con estructuras más complejas, sino que abre la posibilidad a nuevas aplicaciones que aprovechen la distribución controlada en el espacio de las mismas, explotando sus propiedades electrónicas y optoelectrónicas [Mangold et al., 2016; Lin et al., 2015].

El particular ordenamiento de las estructuras biológicas encontradas en la naturaleza despertó el interés científico para desarrollos de base nanotecnológica. En este sentido, la nanobiotecnología surgió como un nuevo campo científico que influyó notablemente tanto en el descubrimiento de nuevos bionanomateriales como en el desarrollo de nuevas técnicas experimentales y teóricas para la creación de nanosistemas innovadores y materiales nanoestructurados [Phoenix & Ahmed, 2014; Nagamune, 2017]. Las estructuras paracrystalinas de las matrices biológicas se han llevado una particular atención dado su ordenamiento, distribución y su capacidad de constituirse como “*bio-templates*”. En este sentido, uno de los principales aportes de este campo ha sido el empleo de biomoléculas tanto en la síntesis de MNPs [Sardar & Mazumder, 2019; Malhotra & Alghuthaymi, 2022; Gazit, 2007] como en la obtención de arreglos regulares de las mismas [Wahl et al., 2001]. Las proteínas son unas de las biomoléculas más destacadas en este área, aportando métodos de síntesis amigables con el medio ambiente además de conducir a la obtención de nanosistemas con morfología y estructura controlada [Wahl et al., 2001; Goswami et al., 2011]. Se pueden obtener entonces, mediante el empleo de algunas moléculas de esta familia, arreglos regulares de MNPs, lo que pone de manifiesto la capacidad de esta biomolécula para actuar como un bloque de construcción en el desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados funcionales. La habilidad de algunas proteínas de autoensamblarse en solución y sobre diferentes superficies las destaca de las restantes biomoléculas, para la obtención de nanoestructuras únicas. El ordenamiento supramolecular de estas proteínas se ve fuertemente influenciado por el entorno, siendo este fundamental a la hora de construir *bio-templates* proteicos [Freeman, 2017]. La posibilidad de obtener sistemas con versatilidad operativa y robustez (estabilidad mecánica) que permitan la manipulación de los *bio-templates* en aplicaciones tecnológicas es uno de los desafíos más complejos en las ciencias aplicadas. Para esto, una de las estrategias en continuo desarrollo es la obtención de arreglos proteicos sobre superficies de diferente naturaleza que actúen como soporte [de Poel et al., 2018; De Moraes et al., 2019]. El diseño de estas superficies ofrecidas como un anclaje a las proteínas en solución tiene un rol importante, tanto en la organización como en la manipulación y aplicación de estos *templates* proteicos. No obstante, todavía resta explorar diferentes aspectos en lo que se refiere al diseño de nuevas estrategias que conduzcan a la obtención y caracterización de estos sistemas soporte-proteína. Para esto, se necesita la combinación o selección de diversos procesos, entre los que se encuentran la manipulación atómica/molecular, la síntesis orgánica, el autoensamblaje, la organización definida por el entorno, la microfabricación y algunos procesos bio-relacionados con estos, cuya interrelación confluye en lo que hoy en día ha comenzado a denominarse como nanoarquitectura [Chen et al., 2020]. Es importante resaltar que la creación de materiales y sistemas a nanoescala suele conducir a propiedades inesperadas, lo que se asocia a las

interacciones específicas que surgen entre los componentes debido a su organización [Aono & Ariga, 2016; Ariga & Azzaroni, 2022].

En este marco, abordar la obtención de arreglos de MNPs con un enfoque interdisciplinario entre la ciencia de los polímeros y la ciencias biológicas puede brindar herramientas que permitan diseñar y construir nuevas plataformas para dirigir y orientar la obtención de nanopartículas metálicas con la finalidad de obtener nanosistemas funcionales con diversas aplicaciones, con particular atención en el campo de la catálisis. Para brindar las bases que permitan comprender la estrategia desarrollada en este trabajo de tesis, esta introducción presentará aspectos vinculados a la obtención de nanopartículas de metales nobles soportadas sobre sistemas partícula polimérica-proteína para su aplicación en catálisis.

## I.1 NANOPARTÍCULAS METÁLICAS Y SU APLICACIÓN EN CATÁLISIS

### I.1.1 Nanopartículas metálicas: Propiedades y síntesis

Una de las fuerzas impulsoras del rápido desarrollo del estudio de las MNPs es la gran diferencia en cuanto a propiedades fisicoquímicas que presentan en comparación con sus contrapartes a granel (metal en “*bulk*”). Los metales a granel típicamente son dúctiles y poseen alta conductividad térmica y eléctrica producto de la deslocalización de electrones dentro de la matriz atómica. Por el contrario, cuando se reducen las partículas a tamaños muy pequeños se modifica su estructura electrónica, pasando los electrones confinados a ocupar diferentes niveles de energía. Se produce así una cuantización de los niveles de energía, de los estados de densidad electrónica y de la carga. Se observan dos efectos cuando se reduce a escala molecular el tamaño de una partícula: a) un incremento muy importante de su área superficial relativa, y b) un incremento muy importante del número de átomos en su superficie [Ramachandra et al., 2000].

Al decrecer en tamaño, el porcentaje de átomos en superficie se incrementa sustancialmente, lo que conduce en consecuencia a un aumento de la relación superficie/volumen que ejerce un efecto directo sobre las propiedades de los nanomateriales [Ndolomingo et al., 2020]. Algunas de las propiedades sobresalientes de estos materiales son la polarizabilidad óptica, la actividad antibacteriana, la conductividad eléctrica, elevada performance catalítica, etc. Dentro de las partículas metálicas encontramos un continuo de tamaño que va desde el bulk hasta el átomo metálico pasando por nanopartículas y *nanoclusters*. Mientras que el metal a granel y las nanopartículas metálicas tienen una banda continua de niveles de energía, el número limitado de átomos en los *nanoclusters* de metal da como resultado niveles de energía discretos, lo que permite, entre otras propiedades, la interacción con la luz mediante transiciones electrónicas entre niveles de energía, como se muestra en la Figura I.1. Los *nanoclusters* de metal cierran la brecha entre los átomos individuales y las nanopartículas [Diez & Ras, 2011].

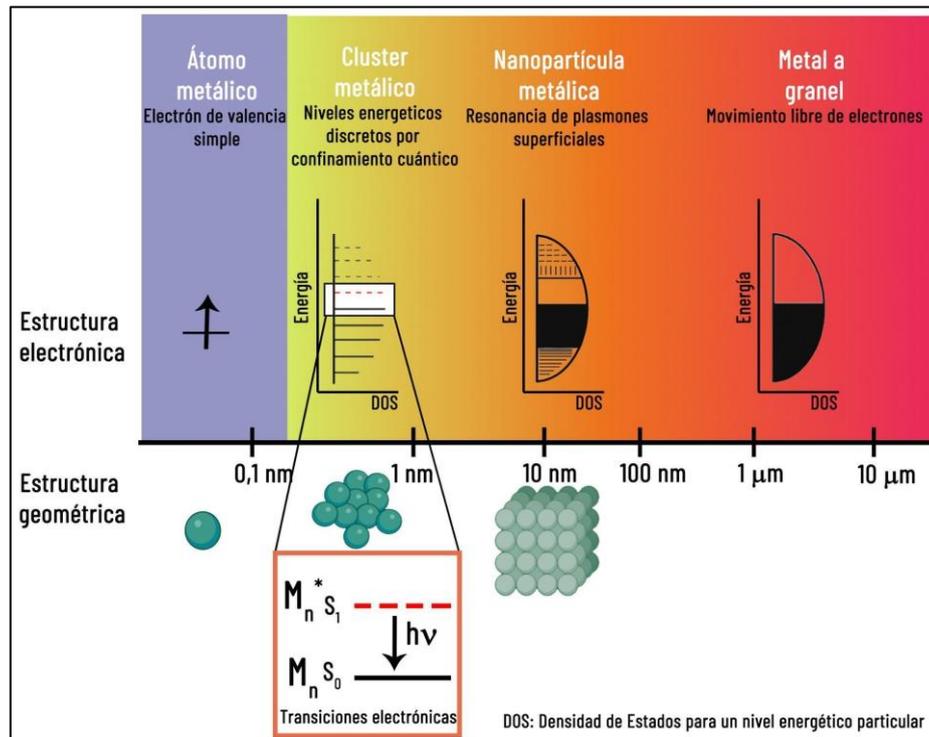


Figura I.1. Efecto del tamaño en los metales

Con el aumento del número de átomos en superficie, se incrementa la energía libre de la misma y las fuerzas de Van der Waals de las nanopartículas, por lo que tienden a atraerse entre sí y aglomerarse perdiendo como consecuencia sus propiedades distintivas, por lo que es necesario estabilizar las mismas. Para evitar este inconveniente se han desarrollado diferentes métodos de síntesis tendientes a mantener a las nanopartículas dispersas. Su síntesis se lleva normalmente a cabo siguiendo alguna de estas dos estrategias cuya clasificación se basa en la escala del material o precursor de origen: “*top down*” o “*bottom up*” (figura I.2). Las técnicas denominadas “*top-down*” (de arriba a abajo) consisten en la miniaturización o reducción de tamaño de estructuras de partida con una dimensión superior a la escala nanométrica. Dentro de este grupo podemos encontrar técnicas litográficas como la fotolitografía, litografía de rayos x, litografía de electrones, además de técnicas como la molienda mecánica, entre otras. Por otro lado, las técnicas “*bottom-up*” se basan en el crecimiento o ensamblado de estructuras nanométricas a partir de precursores moleculares con una escala inferior a la de los nanomateriales, entre las que se pueden citar la deposición química de vapor (CVD), la pirolisis por láser, la condensación atómica o molecular, sol-gel, coprecipitación, entre otras [Habibullah et al., 2002; Singh et al., 2018]. A su vez, según el fenómeno que está detrás de estos procedimientos, estos métodos pueden ser clasificados como físicos, químicos o biológicos. En el último caso, se han desarrollado metodologías bioinspiradas que incluyen el empleo de biomatrices en niveles micro y macromoleculares utilizando desde microorganismos hasta plantas, que por ser amigables con el medio ambiente se las denomina como vía “*green chemistry*” [Parandhamana et al., 2019].

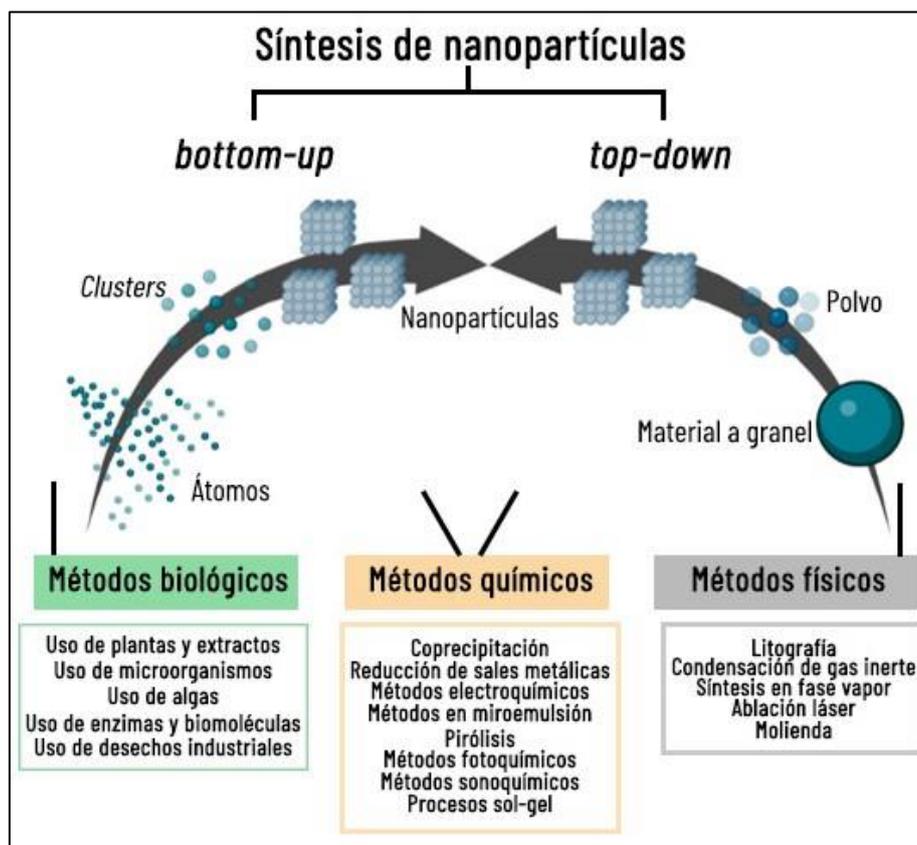


Figura I.2. Métodos de síntesis de nanopartículas

En todos los casos para lograr la estabilización de las nanopartículas durante la síntesis se recurre al empleo de distintos estabilizadores como ligandos donores [Ganesan et al., 2007; Aiken III & Finke, 1999; Toshima et al., 2001], polímeros [Rioux et al., 2005; Bianchi et al., 2000; Wilson et al., 2006] y surfactantes [Bonnemann et al., 1996] cuyo propósito es el control del crecimiento de los *nanoclusters* incipientes para prevenir la aglomeración de los mismos. La estabilización se da mediante tres mecanismos principales que involucran interacciones estéricas, electrostáticas o ambas. En algunos casos, los agentes estabilizantes cumplen también el rol de reductores [Turkevich et al., 1995].

Considerando que sus aplicaciones aprovechan principalmente su elevada superficie expuesta, el empleo de agentes estabilizantes representa una problemática. Cuanto más eficiente sea el agente estabilizante menor será el área superficial expuesta por las MNPs lo que reduce la superficie activa de la nanopartícula [Li & El-Sayed, 2001]. En este sentido, un método que se utiliza comúnmente para estabilizar las mismas es depositarlas sobre un soporte para impedir su sinterización, re-cristalización y agregación. Este tipo de materiales nanoestructurados soportados son de gran utilidad en áreas como la catálisis, aplicaciones ópticas, médicas, entre otras, y se presenta como una alternativa atractiva para la estabilización [Zanella, 2012].

Las MNPs soportadas pueden obtenerse por depósito de MNPs coloidales preformadas sobre los soportes, o por reducción "*in-situ*" de los precursores metálicos. La primera de las vías implica el contacto de los soportes con una dispersión coloidal

preformada de MNPs, lo cual se puede lograr a través de diferentes metodologías: la adsorción de las MNPs coloidales sobre el soporte [Lee et al., 2008; Dimitratos et al., 2009], el *grafting* de las MNPs sobre los soportes, las técnicas de *spray* con llama [Bonini et al., 2002; Semagina et al., 2007], los métodos de intercambio iónico [Mastalir & Kiraly, 2003; Mastalir, et al., 2001], y la técnica de Langmuir-Blodgett [Bonini et al., 2002; Ruta et al., 2008]. Los soportes sólidos más utilizados son el carbón, la sílica y diversos óxidos metálicos. Los métodos mencionados previamente, que hacen uso de partículas metálicas preformadas, cuentan con la ventaja de separar el diseño de las MNPs del diseño del soporte, ampliando los puntos de control del proceso. Sin embargo, entre las mayores desventajas de estas metodologías se encuentra el hecho de que las MNPs preformadas depositadas en la superficie de los soportes suelen ser expuestas durante su preparación o empleo a diversas condiciones (T, P, etc.), lo que frecuentemente produce la sinterización de las mismas [Chun-Jiang & Schuth, 2011].

La reducción "*in-situ*" podría evitar la sinterización y al mismo tiempo favorecer la estabilización de las MNPs. Esta metodología involucra tres etapas: la preparación del soporte sólido, el tratamiento primario de este soporte para obtener el precursor metálico soportado, y la posterior activación del precursor para dar origen a las MNPs soportadas. El tratamiento primario del soporte puede darse a través de cuatro vías: el depósito, la precipitación, la coprecipitación o la formación de geles. Entre los métodos de depósito se encuentran la impregnación, el intercambio iónico, y el depósito desde fase gaseosa. Posteriormente, la vía de activación elegida dependerá de las propiedades del soporte, encontrándose entre las opciones la hidrodesulfurización, la deamonización y la reducción [Haber et al., 1995].

Dentro de los métodos de depósito presentados, la impregnación implica el contacto del soporte sólido poroso, hidratado o seco, con una solución que contiene el precursor metálico. Este proceso se conoce comúnmente como impregnación húmeda, en este método el precursor metálico es típicamente una sal que se disuelve en la mínima cantidad de disolvente requerida. La solución resultante se agrega luego al soporte sólido poroso hasta formar una pasta espesa. El solvente es posteriormente retirado y el sólido final se seca, se calcina y reduce (de ser necesario). Se han desarrollado procedimientos de reducción alternativos a la calcinación, como el empleo de hidrazina como reductor, con el fin de mejorar el tamaño y dispersión de las MNPs [Choudary et al., 2005], aunque presentaron otras dificultades como la necesidad de utilizar un exceso del agente reductor que requiere de su posterior remoción previo a la utilización de las MNPs. Aplicando estas metodologías se ha logrado explotar una gran variedad de soportes sólidos para las MNPs. Algunos ejemplos de ellos son aerogeles de sílice [Gurav et al., 2010], esferas de sílica [Jiang et al., 2005], microemulsiones de sílica [Hori et al., 2006], hidrotalcita [He et al., 2014], zeolitas [Peng et al., 2015] y membrana de alúmina [Cheng et al., 2016]. Se ha reportado también, y en gran escala, el empleo de soportes basados en óxidos metálicos de aluminio [Raybaud et al., 2013], titanio [Bagheri et al., 2014], circonio [Ntais et al., 2014], calcio [Mori et al., 2004], magnesio [Kantam et al., 2008], manganeso [Wang et al., 2008], zinc [Wu et al., 2011], y cobalto [Yamada et al., 2010]. Distintos materiales carbonosos, como el carbón activado, o el grafito también han sido extensamente empleados como soportes [Pérez-Mayoral et al., 2016]. Los polímeros también se han utilizado en el diseño

de soportes en diferentes formas como fibras poliméricas [Marchesini et al., 2020], dendrímeros [Zhao & Crooks, 1999], polímeros porosos [Poupart et al., 2019], polielectrolitos esféricos [Yuan et al., 2012], entre otras.

Así, se dispone de diversos sistemas basados en MNPs (coloidales o soportadas) que pueden ser empleados en diferentes aplicaciones. Entre ellas, una de las más exploradas es la catálisis.

### I.1.2 Aplicación de las nanopartículas metálicas en catálisis

La catálisis tiene un rol central en las transformaciones químicas y por ello forma parte de innumerables procedimientos empleados tanto en la investigación académica a escala de laboratorio como en la industria química [Hemalatha et al., 2013]. Tan central es este rol que aproximadamente un 90% de los productos químicos más comercializados (como los combustibles, polímeros, fibras, productos de química fina, medicamentos, entre otros) son obtenidos involucrando al menos una etapa catalítica [American Chemical Society Report, 2020].

La comercialización de catalizadores a escala global ha crecido inmensamente en cortos períodos de tiempo, en 1998 involucraba 9,3 billones de dólares mientras que en 2003 el monto aumentó a 12 billones de dólares [Catalyst Business, 2004]. Recientemente, en 2020 dicha cifra escaló a los 35 billones de dólares anuales [Groot, 2021]. Porcentualmente, los catalizadores heterogéneos representan un 80% del mercado catalítico, los homogéneos participan en un 17% y los enzimáticos en un 3% aproximadamente [Bravo-Suárez et al., 2013].

Puntualizando aún más las implicancias económicas de estos materiales, los catalizadores basados en nanopartículas metálicas representan más de un 70% del mercado de catalizadores heterogéneos [Bravo-Suárez et al., 2013]. La gran irrupción de las MNPs al campo de la catálisis se debe a que estas proporcionan centros muy activos, siendo ampliamente utilizadas como catalizadores ya sea coloidales o soportadas sobre sólidos porosos. Cabe destacar que las MNPs poseen mayor eficiencia dando como consecuencia una mejora en la actividad y selectividad típicas de la catálisis heterogénea basada en otros sistemas [Ndolomingo et al., 2020]. En este sentido, se posicionaron como catalizadores importantes en las industrias de refinación de petróleo y petroquímica, conversión de energía y eliminación de gases de escape de vehículos, entre otros, ya que pueden catalizar muchos procesos que incluyen la oxidación de hidrocarburos, acoplamiento cruzado de C-C, reacciones por transferencia de electrones y de hidrogenación-deshidrogenación [Campelo et al., 2008b; Sandoval et al., 2007; Hutchings, 2008; Choi et al., 2008; Panziera et al., 2007; Tao et al., 2014; Alshammari et al., 2016].

Las nanopartículas metálicas coloidales se han utilizado con éxito como catalizadores en una gran variedad de reacciones [Bradley, 1994; Reetz & Helbig, 1994]. Entre las principales desventajas de la aplicación de MNPs coloidales en el campo de la catálisis se encuentra reportada la poca estabilidad de las partículas frente a distintas condiciones de reacción, que puede conducir incluso a la precipitación del catalizador

durante su empleo [Reetz et al., 1996; Beller et al., 1996, Li et al., 2000]. En líneas generales, los catalizadores homogéneos son muy eficientes y selectivos, pero poseen poca estabilidad térmica y su remoción del medio de reacción suele ser muy dificultosa. Diferencialmente, los catalizadores heterogéneos, toleran altas temperaturas y facilitan su recuperación del medio de reacción [Astruc, 2008; Cornils & Herrmann, 2003]. En particular, las nanopartículas metálicas coloidales, que están el límite entre catalizadores homogéneos y heterogéneos [Thathagar et al., 2002], poseen amplias limitaciones para ser separadas del medio reactivo y recicladas. Una alternativa para esto ha sido el empleo de nanopartículas magnéticas que exhiban actividad catalítica [Yeap et al., 2017].

Respecto a esta última problemática, las nanopartículas metálicas soportadas ofrecen una alternativa exitosa frente a la separación del medio reactivo y posterior reutilización. El uso como soporte de sistemas con sitios de adsorción específicos, con tamaños y características de poro definidos, ofrece la ventaja de limitar el crecimiento de las partículas y reducir su agregación. Seleccionando y manipulando las propiedades texturales del soporte se podría controlar el tamaño y la forma de las nanopartículas resultantes. La relación entre la interacción metal-soporte, la interacción metal-metal intrapartícula, la forma de las partículas y la geometría de empaquetamiento atómico determinará la eficacia de las MNPs para diversas aplicaciones [White et al., 2009]. Esto conduce a la posibilidad de obtener catalizadores heterogéneos con MNPs de tamaño específico.

Entre los nanocatalizadores metálicos existentes, aquellos basados en nanopartículas de metales nobles atraen especialmente la atención debido a sus propiedades electrónicas, químicas e incluso ópticas ya que, gracias a su elevado potencial de reducción estándar logran resistir la oxidación [Pradeep & Anshup, 2009].

En este trabajo se propone la síntesis de nanopartículas de platino y plata soportadas sobre sistemas partícula polimérica/proteína. En este sentido, a continuación se profundizará en algunos aspectos de las MNPs de estos metales.

### I.1.2.1 Nanopartículas de platino

El uso del platino en catálisis representa una de las aplicaciones más importantes de este metal [Wang et al., 2008a]. Esto se encuentra asociado principalmente a sus propiedades distintivas respecto al resto de los metales nobles. Las particulares características electrónicas del platino le otorgan una excepcional resistencia a la corrosión lo cual lo ha hecho triunfar en sus aplicaciones como catalizador en industrias de alto rendimiento, como la petroquímica, química, electromotriz y farmacéutica [Chen & Holt-Hindle, 2010]. Por otro lado, el platino posee una elevada estabilidad y gran actividad electrocatalítica lo cual lo convirtió en el metal predilecto para catalizar reacciones en celdas de combustible [Chen & Holt-Hindle, 2010].

La preparación de nanopartículas de platino (PtNP) soportadas normalmente requiere de precursores de alto costo, además de procesos con altas temperaturas o procesos de síntesis ecológicamente incompatibles [Sellin et al., 2009; Ye et al., 2015; Melke et al., 2016]. Por esto, los estudios se han enfocado en optimizar la eficiencia

catalítica de los materiales nanoestructurados basados en platino y disminuir la cantidad utilizada de metal [Peng et al., 2009; Manthiram, et al., 2008]. La optimización de los métodos de fabricación de los materiales nanoestructurados basados en platino tiene el potencial de ofrecer una solución superior en términos costo-efectivos [Xu & Zhang, 2014]. Se han desarrollado múltiples técnicas entre las que se encuentran métodos hidrotermales y solvotermales [Masala et al., 2004], el método sol-gel, [Schubert, 1996], el depósito por haz de electrones o iones [Plank et al., 2008], el depósito electroquímico [Zhong et al., 2008], entre otras. Una estrategia interesante es el empleo de *templates*, clasificada en tres categorías duros, blandos y de sacrificio. Los *templates* duros involucran materiales rígidos por ejemplo de origen mineral [Liu et al., 2009]. Los *templates* blandos incluyen macromoléculas biológicas, estructuras biológicas, o estructuras sintéticas como micelas, microemulsiones y liposomas [Song et al., 2007]. Finalmente los *templates* de sacrificio suelen estar compuestos por metales, y óxidos metálicos que son removidos al formarse el producto final [Zhang et al., 2012<sup>b</sup>].

Las PtNP soportadas se utilizan para catalizar diferentes reacciones, incluida la oxidación de compuestos orgánicos varios [Ovejero et al., 2011; Gomes et al., 2004], la hidrogenación de compuestos derivados de la biomasa [Lange et al., 2010], la reducción del monóxido de nitrógeno, el reformado de etilenglicol [Liu et al., 2011] y una variedad de procesos como los utilizados en la refinería de petróleo [Stanislaus et al., 2010]. Las PtNP también se han utilizado en reacciones de oxidación y reducción de mayor complejidad [Abu-Reziq et al., Mallat et al., 1997]. Recientemente, se ha reportado un incremento en la actividad catalítica de las PtNP al ser inmovilizadas en la superficie de materiales mesoporosos, favoreciendo la oxidación en fase gaseosa completa del etanol [Bingwa et al., (n. f.)].

Así, gracias a las bondades de este metal sumadas a la eficiencia catalítica de los catalizadores basados en él en diversas reacciones, este metal noble es el preferido frente a otros metales a la hora de seleccionar un catalizador o diseñar uno nuevo. No obstante, su elevado costo, entre otros factores, hace que las investigaciones se orienten a la exploración de otros metales.

### I.1.2.2 Nanopartículas de plata

Las nanopartículas de plata (AgNP) han sido objeto de gran interés científico debido a sus múltiples aplicaciones, entre las que se destacan su empleo en catálisis, electroquímica, sensores, en sistemas de liberación de drogas y en aplicaciones diagnósticas [Owoseni-Fagbenro et al., 2019]. La respuesta plasmónica de las AgNPs les confiere potenciales aplicaciones en celdas solares [Arun Kumar et al., 2018]. Además, han sido empleadas en estudios biológicos como agentes antimicrobianos y antioxidantes, y actualmente se encuentra en expansión el estudio de su empleo como agentes antitumorales [Elemike et al., 2019]. La plata ha tomado gran notoriedad para aplicaciones catalíticas debido a su costo relativamente bajo en comparación con otros metales nobles, como por ejemplo el platino, lo que permite sustituir a otros metales más costosos por uno más abundante, manteniendo una buena actividad catalítica y selectividad, [Dong et al., 2015; Owoseni-Fagbenro et al., 2019; Liao et al., 2017].

Se ha descubierto que las AgNPs son eficaces catalizadores en muchos procesos de reducción selectiva, incluida la reducción del grupo carbonilo y de compuestos nitroaromáticos [Dong et al., 2015; Gawande et al., 2013; Bingwa & Meijboom, 2015]. Sin embargo, las AgNPs cuentan con la desventaja de agregarse y oxidarse fácilmente, dando lugar a una disminución en la superficie activa expuesta con la consecuente pérdida de eficiencia catalítica [Elemike et al., 2019].

Con el propósito de disminuir dicha tendencia a la agregación de las AgNPs, se han desarrollado distintos métodos de síntesis [Iravani et al., 2014]. Los métodos de reducción química generalmente implican el uso de reactivos peligrosos y altamente contaminantes [Natsuki et al., 2015]. Los esfuerzos por disminuir el impacto ambiental de estas técnicas han llevado al desarrollo de vías de síntesis alternativas que hacen uso de sistemas biológicos [Wan Mat Khalir et al., 2020; Zhao et al., 2018]. El uso de carbohidratos y polisacáridos para obtener AgNPs coloidales ha sido explotado debido a la capacidad estabilizante de estos compuestos, entre ellos, los más utilizados son el alginato, el quitosano y la carboximetilcelulosa [Shervani & Yamamoto, 2011; Thangaraj et al., 2017; Hasan et al., 2020; Li et al., 2018]. En estos casos se ha reportado la obtención de sistemas de AgNPs bien dispersos, estables, cristalinos, y los carbohidratos empleados han actuado también como agentes reductores.

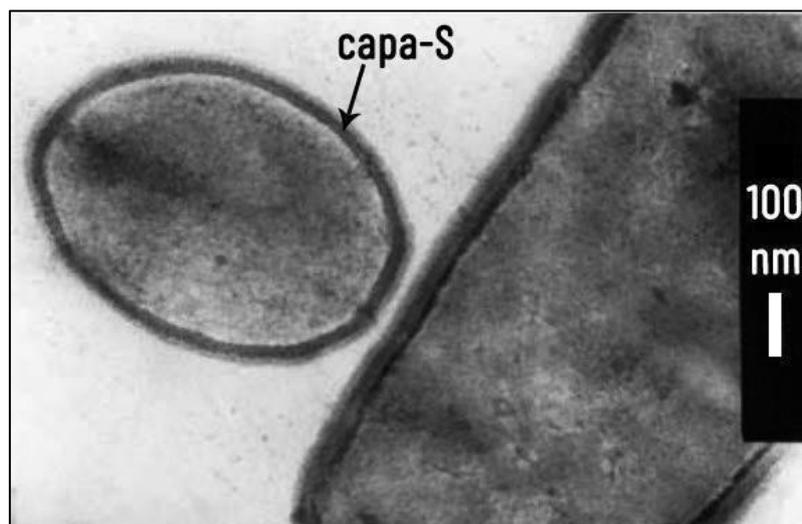
Para evitar el empleo de estabilizantes, el uso de soportes se presenta como una alternativa atractiva [Esumi et al., 2004]. El soporte y su interacción con las AgNP juegan un papel importante para impedir la agregación y mejorar la superficie expuesta, optimizando así sus propiedades catalíticas. Se ha demostrado que la fuerte interacción entre las AgNP y algunos soportes como polímeros, óxidos y MOF (Metal-Organic Frameworks) de carbono reduce su aglomeración, por lo tanto, aumenta su actividad catalítica [Mudassir et al., 2017]. Por otro lado, varios nanocatalizadores heterogéneos de plata han sido presentados como potentes catalizadores para la oxidación de alcoholes [Nemanashi-Maumela et al., 2017], silanos y olefinas, y transformaciones oxidativas relacionadas [Chaki et al., 2007].

Uno de los aspectos fundamentales en el campo de estudio de las MNPs es el desarrollo racional de nuevos soportes que permitan obtener MNPs con características definidas, reduciendo su tendencia a la agregación y mejorando su desempeño catalítico. Como se mencionó antes, recientemente ha surgido el interés por emplear proteínas que poseen la capacidad de actuar como plantillas biológicas ("*bio-templates*") para la síntesis de MNPs. Bajo esta óptica se presenta en el siguiente apartado a las proteínas de capa-S las cuales, gracias a su estructura regular bidimensional y a sus propiedades fisicoquímicas de afinidad con metales, se proyectan como grandes candidatas a ocupar un espacio dentro del diseño de nuevos "*bio-templates*".

## I.2 PROTEÍNAS DE CAPA-S

Las matrices biológicas han cobrado gran interés bionanotecnológico dado su elevado orden y su compatibilidad con el medio ambiente. En la naturaleza se ha desarrollado una amplia gama de sistemas con capacidad de autoensamblaje a lo largo de miles de millones de años de evolución. Los principios que rigen la construcción de muchos de estos sistemas se encuentran extensamente estudiados y los bloques moleculares de construcción fueron completamente caracterizados. Entre los sistemas cuyo autoensamblaje es bien conocido podemos mencionar el ADN [Chen & Seeman, 1991; Rothmund, 2006], las monocapas autoensambladas de diversas macromoléculas [Ulman, 1996; Whitesides, 1991], y las capas más superficiales de arqueas y células bacterianas, denominadas proteínas de capas-S [Pum & Sleytr, 2014].

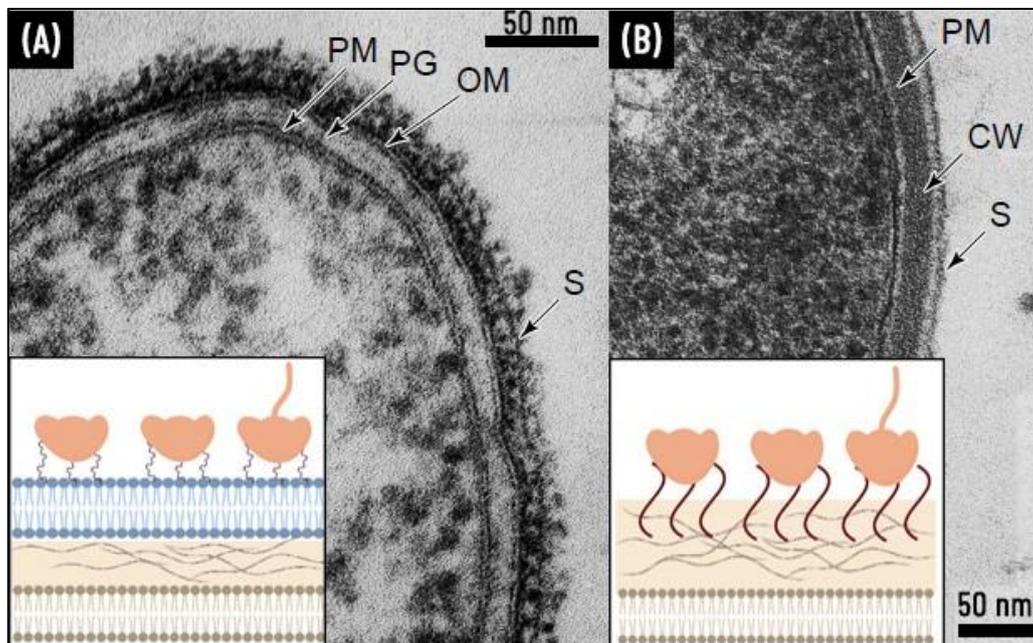
Las proteínas de capas-S (SLP) constituyen la capa más externa de algunas bacterias y arqueas, como puede verse en la imagen I.1. Las SLP cumplen varias funciones entre las que se destacan su rol como capas protectoras (en la conservación de la forma y protección celular), como estructuras involucradas en la adhesión y el reconocimiento de superficies, como tamices moleculares, y como trampas moleculares y de iones [Messner et al., 2009].



**Imagen I.1** Micrografía TEM de *L. kefir* 8321 en la cual se puede apreciar la capa-S en esta bacteria [Garrote et al., 2004].

La capa-S observada en la imagen I.1 se forma producto del ensamblaje de subunidades proteicas (proteínas de capa-S) en la superficie de las células dando origen a redes monomoleculares paracristalinas [Sleytr & Beveridge, 1999]. La forma de anclaje de la SLP a la superficie bacteriana es no covalente y depende del tipo de microorganismo. En las bacterias Gram negativas las SLP se encuentran adheridas al lipopolisacárido de la membrana externa (imagen I.2-A), mientras que en las bacterias Gram positivas las SLP se encuentran ligadas a la capa rígida de peptidoglicano (imagen I.2-B) [Sleytr et al., 2014]. En cuanto a la conformación de estos arreglos regulares, una vez secretadas, las subunidades proteicas interactúan entre sí y con la superficie celular a través de enlaces

no covalentes. Se ha demostrado que un conjunto de propiedades fisicoquímicas superficiales son las responsables de la adecuada orientación de las subunidades y de su inserción y anclaje durante el crecimiento celular [Sleytr, 1978].



**Imagen I.2** Micrografías e ilustración esquemática de la arquitectura supramolecular de las proteínas de capa-S en bacterias Gram negativas **(A)** y Gram positivas **(B)**.

Abreviaturas: CW, pared celular Gram-positiva; OM, membrana externa; PG, capa de peptidoglicano; PM, membrana plasmática; S, capa-S.

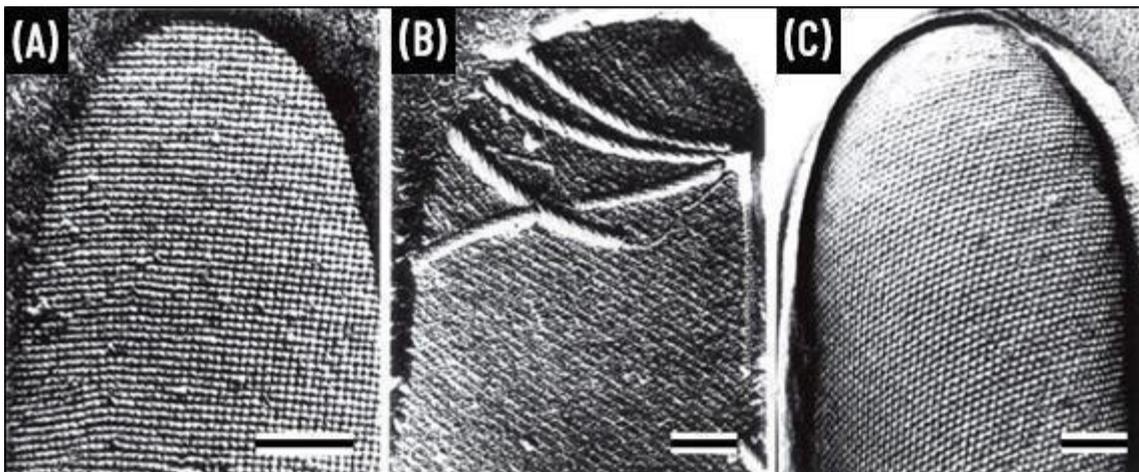
[Sleytr & Beveridge, 1999; Sleytr et al., 2014].

Generalmente las proteínas de capa-S se encuentran formadas por una misma proteína cuyo peso molecular se encuentra entre los 40 y 170 kDa [Sleytr et al., 2011]. La mayoría de las SLP bacterianas son débilmente ácidas, cuentan con un contenido del 40-60% de aminoácidos hidrofóbicos, y poseen pocos o ningún aminoácido que contenga azufre. Los aminoácidos presentes en mayor proporción son el ácido glutámico, el ácido aspártico (alrededor de 15%) y la lisina (aproximadamente 10%). Cabe destacar que los aminoácidos hidrofílicos e hidrofóbicos se encuentran distribuidos aleatoriamente, a diferencia de otras proteínas que presentan regiones de polaridad diferencial. Por otro lado, el punto isoeléctrico (PI) de las proteínas de la capa-S oscila entre 3 y 6 típicamente, mientras que para algunas el PI reportado es de entre 8 y 10. Finalmente, la carga superficial de la capa-S suele ser neutra para la cara externa (con respecto a la célula bacteriana), mientras que la cara interna puede ser negativa o positiva, dependiendo del balance entre los grupos ácido y amino expuestos [Pum & Sleytr, 2014]. En algunos casos, en SLP tanto de origen bacteriano como en las pertenecientes a arqueas, se encontraron evidencias de glicosilación, por lo que se las denomina como glicoproteínas de capa-S (SLGP). Típicamente, el grado de glicosilación de estas SLP varía entre el 1 y el 10 %p/p [Messner et al., 2009]. Generalmente, las cadenas de glicósidos suelen tener una extensión

lineal de entre 15 y 20 unidades repetidas (monosacáridos), sin embargo, también se han reportado cadenas ramificadas y compuestas por más de un monosacárido [Madhurantakam et al., 2014]. El anclaje de los glicanos a las proteínas se da con frecuencia por enlace O-glicosídico a serina, treonina y tirosina, en bucles superficialmente accesibles de las proteínas donde suelen encontrarse de 2 a 4 sitios de glicosilación [Messner et al., 2009]. Se han reportado también enlaces N-glicosídicos principalmente con asparagina [Madhurantakam et al., 2014].

Una de las propiedades más interesantes de las SLP se encuentra relacionada con su estructura periódica 2D, compuesta por subunidades idénticas que poseen poros de igual tamaño y morfología, con idénticas propiedades fisicoquímicas a escala subnanométrica. Este aspecto ha disparado el interés en el empleo de estas proteínas en la construcción biomolecular con prometedoras aplicaciones en el área de la nanobiotecnología [Sleytr et al., 2011].

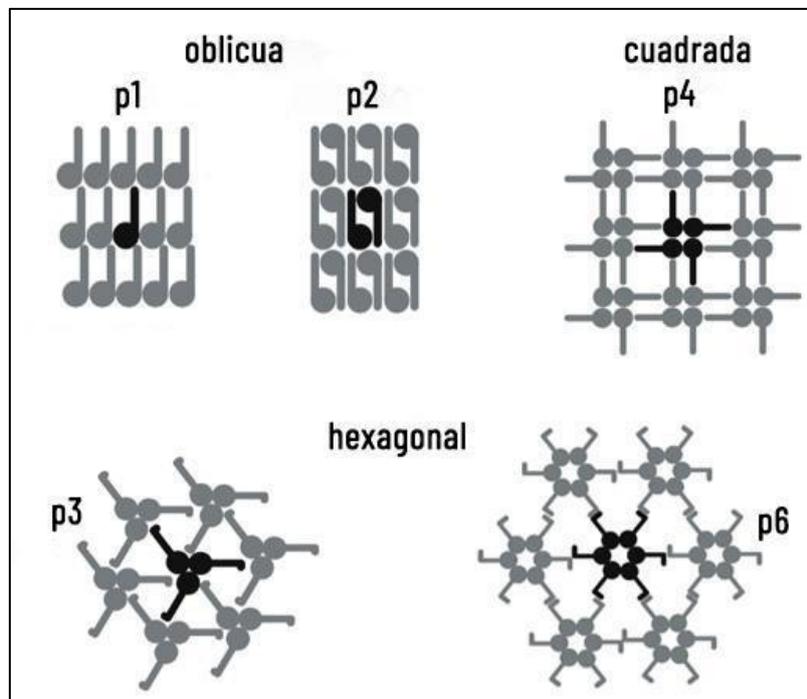
La información más precisa sobre la disposición 2D de estas proteínas se ha obtenido a través de la microscopía de transmisión electrónica de alta resolución, con la cual se han obtenido imágenes claras del arreglo espacial regular como puede verse en la imagen I.3 [Sleytr et al., 2011].



**Imagen I.3** Imágenes TEM (barra:100 nm) tomadas de (A) *Lysinibacillus Sphaericus* CCM 2177 (p4), (B) *Geobacillus stearothermophilus* PVT2/p2 (p1) y (C) *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus* L111-69 (p6) [Sleytr et al., 2011]

Se observó que la estructura 2D posee una simetría espacial que depende de la posición relativa de las subunidades proteicas, encontrándose diferentes alineaciones (oblicuas (p1, p2), cuadradas (p4) o hexagonales (p3, p6)) como se representa en la figura I.3. En consecuencia, el tipo de simetría determina el número de proteínas por unidad morfológica: uno, dos, tres, cuatro o seis respectivamente. En general, las dimensiones de la celda unitaria de las proteínas de capa-S varían de 3 a 30 nm, con un grosor de 5 a 20 nm. Estos arreglos de unidades idénticas exhiben poros con igual tamaños y morfologías, cuya dimensión es de entre 2 y 8 nm aproximadamente, y pueden ocupar entre el 30% y el

70% de la superficie [Sleytr & Beveridge, 1999; Sleytr et al., 1999; Albers & Meyer, 2011; Pavkov-Keller et al., 2011].



**Figura I.3** Representación esquemática de los tipos de arreglos 2D de las proteínas de capa-S agrupados de acuerdo con las posibles simetrías. En gris oscuro se muestra la unidad morfológica seleccionada arbitrariamente [Schuster & Sleytr, 2013].

### I.2.1 Autoensamblaje de las proteínas de capa-S

Una de las propiedades más importantes y distintivas de las (glico)proteínas de capa-S es que, una vez aisladas, presentan la capacidad de reensamblarse en un arreglo monomolecular tanto en suspensión, como en la interface aire-agua, sobre superficies sólidas, encima de monocapas lipídicas y sobre liposomas o partículas diversas como se muestra en la figura I.4 [Pum & Sleytr, 2014].

En este sentido, se han desarrollado distintas técnicas para llevar a cabo el aislamiento de las subunidades proteicas. Entre las estrategias más utilizadas se encuentra el empleo de agentes caotrópicos (por ejemplo, clorhidrato de guanidinio, urea), la modificación del pH, o aplicación de agentes quelantes (como EDTA o EGTA) o agentes disociantes como el cloruro de Litio, e incluso de surfactantes como el SDS o el Tritón X-100 [Sleytr et al., 2011].

El proceso de reensamblado de las subunidades proteicas en solución ha sido extensamente estudiado por Teixeira y col. (2010) quienes comprobaron que el mismo se encuentra termodinámicamente impulsado por el factor entrópico. El ensamblaje de las

subunidades se acompaña por la liberación de moléculas de agua propias de la capa de hidratación ligada a los dominios hidrofóbicos de las SLP y, como consecuencia, se da una pérdida neta de superficies hidrofóbicas en el arreglo de SLP ensambladas.

Como se mencionó previamente, las SLP tienen una alta proporción de aminoácidos poco polares lo que justifica la preponderancia de las interacciones hidrófobas en el proceso de ensamblaje. Los estudios sobre la distribución de grupos funcionales en la superficie han demostrado que los grupos carboxilato y amino están dispuestos en proximidad contribuyendo a la cohesión de las proteínas por interacciones electrostáticas [Sleytr et al., 2002].

Además, el entorno influye sobre el proceso de autoensamblaje. Factores como la temperatura, el pH, la fuerza iónica y el tipo de iones presentes condicionan el producto de ensamblaje, por ejemplo, en cuanto al número de capas [Sleytr et al., 2011; Rad y col. 2015].

Si además, a las SLP se les ofrece una determinada superficie, es relevante mencionar que la formación de un arreglo proteico regular dependerá, primordialmente, de las propiedades de la misma como la hidrofobicidad y la carga superficial [Sleytr et al., 2011]. Al respecto, se ha demostrado que ante la exposición de una superficie hidrófoba, las proteínas de capa-S extraídas de *Bacillus Sphaericus* CCM 2177 forman una monocapa exponiendo la cara externa de las mismas, mientras que al enfrentarlas a una superficie hidrófila se obtiene una doble capa con intercalación de las caras expuestas [Gyorvary et al., 2004]. La morfología del producto de autoensamblado de las SLP ante las diversas superficies de anclaje ofrecidas puede verse resumida en la figura I.4.

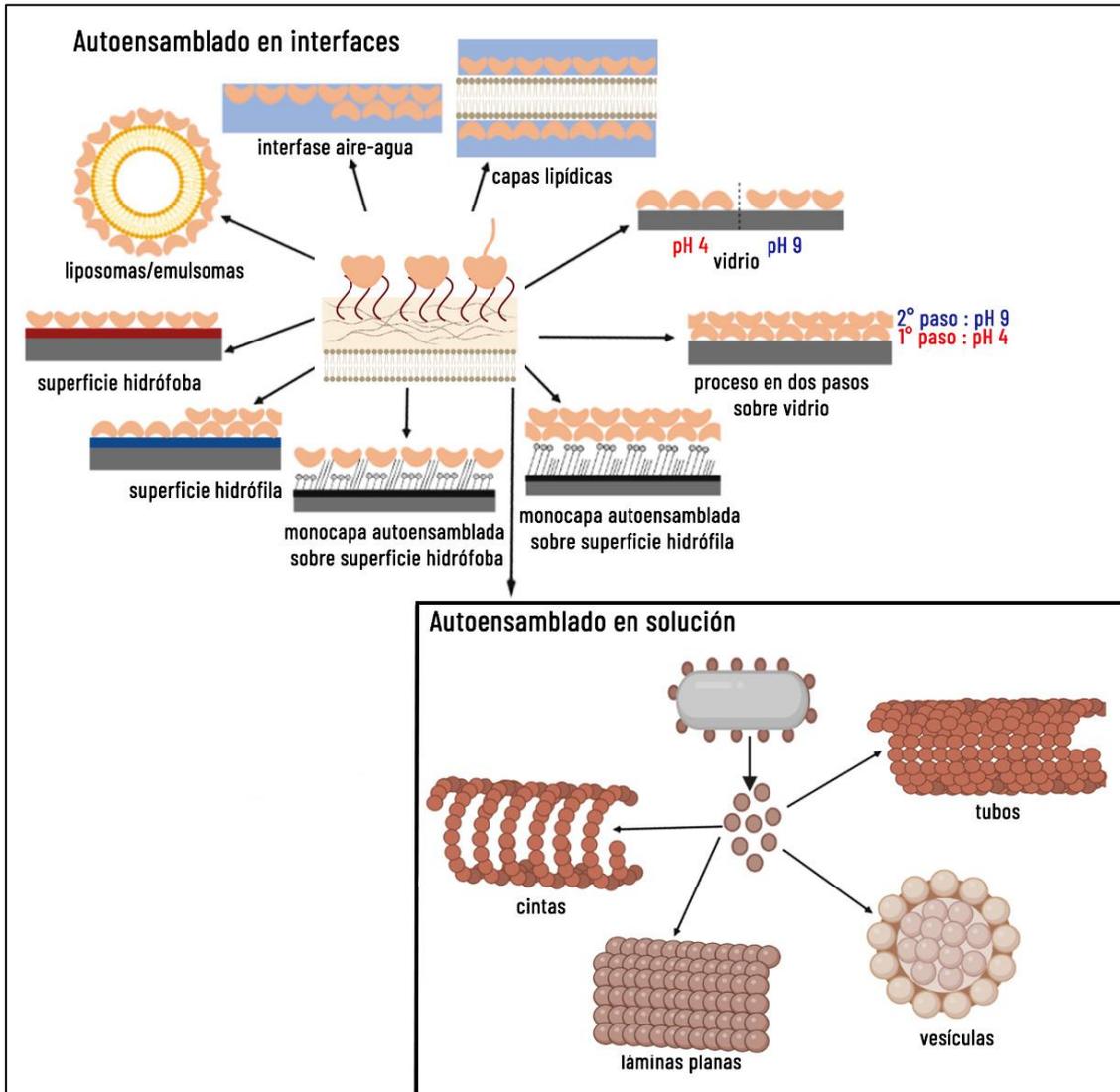


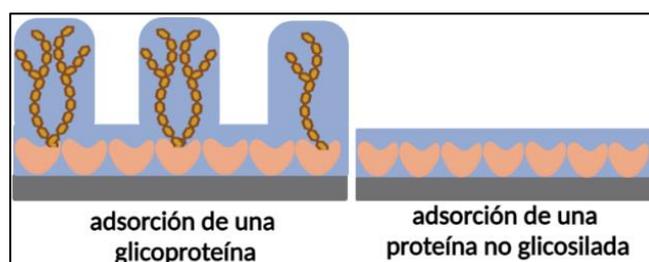
Figura I.4 Arquitectura del autoensamblado de las proteínas de capa-S sobre diferentes superficies [Pum & Sleytr, 2014; Sleytr et al., 2011].

Respecto a los aspectos cinéticos del proceso de autoensamblaje, todos los parámetros mencionados anteriormente tienen un efecto directo sobre la movilidad de las proteínas de capa-S en la superficie y su probabilidad de quedar atrapadas en la zona frontal alineando sus dominios en crecimiento. Este reordenamiento continuo de subunidades durante el proceso conduce a una configuración estable que es característica del crecimiento de cristales en equilibrio donde se forman matrices grandes y perfectamente regulares.

Pum & Sleytr (1995) comprobaron que al inicio del proceso de reensamblado los bordes del arreglo en construcción avanzan rápidamente no dando tiempo a la fase más estable a adquirir el estado energético más bajo a nivel microscópico y como resultado se obtiene una microestructura metaestable tipo "dedos extendidos". Este tipo de estructuras de crecimiento rápido son abiertas porque se forman huecos durante el crecimiento desigual sobre la superficie, donde la formación de arreglos regulares de SLP en interfaces

está determinada por un rápido proceso de nucleación y ensamblaje que involucra a las subunidades cercanas a la interfaz y una lenta incorporación de subunidades desde el seno de la solución.

En el caso de las SLGP, Schuster y Sleytr (2015) observaron que éstas se reensamblan más lentamente que sus análogas no glicosiladas. Ambas capas de proteína resultaron ser homogéneas, sin embargo la proteína glicosilada presentó una mayor viscoelasticidad, lo cual asociaron a las porciones de glicanos elongadas hacia el exterior del arreglo proteico como se representa en la figura I.5. A su vez, también observaron diferencias en la rigidez del arreglo de proteína, particularmente, el arreglo proveniente de la proteína glicosilada condujo a una capa de proteína recristalizada menos rígida.



**Figura I.5** Adsorción de proteínas en función de la presencia de glicósidos [Schuster & Sleytr, 2015].

## I.2.2 Empleo de las proteínas de capa-S como plantillas

Las características mencionadas anteriormente permiten vislumbrar que las SLP son grandes candidatas a ser empleadas como “*bio-templates*”. Al combinar su capacidad de autoorganización junto a la formación de un ordenamiento periódico a escala nanométrica, ofrecen posibilidades únicas para la obtención de arreglos regulares de MNPs.

Un ejemplo de esto es el empleo de arreglos de SLP como plantillas periódicas para la nucleación “*in situ*” de sistemas ordenados y uniformes de nanopartículas de sulfuro de cadmio y oro [Shenton et al., 1997]. En otra oportunidad se obtuvieron superredes con simetría oblicua o cuadrada de aproximadamente 10 nm de distancia de repetición y tamaños de partículas de 4 a 5 nm mediante la exposición de SLP autoensambladas a las respectivas soluciones de sales metálicas (por ejemplo, Cd (II)) seguido de una reacción lenta con un agente reductor como H<sub>2</sub>S o un agente más rápido como el haz de electrones en un microscopio electrónico de transmisión [Shenton et al., 1997; Dieluweit et al., 1998].

Las SLP se utilizaron ampliamente como matrices para obtener nanopartículas a partir de diversos precursores metálicos: paladio (PdCl<sub>2</sub>), níquel (NiSO<sub>4</sub>), platino (KPtCl<sub>6</sub>), plomo (Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), y hierro ((KFe(CN)<sub>6</sub>)) [Mertig et al., 1999; Mertig et al., 2001; Shenton et al., 1997; Wahl et al., 2001, Dieluweit et al., 1998]. Generalmente, las nanopartículas obtenidas fueron microcristalinas pero no estaban cristalográficamente alineadas a lo largo del arreglo. Se observó en los mencionados trabajos que el espaciado entre las nanopartículas se parecía a los parámetros de distancia simétricos de la capa-S. Como la

precipitación de los metales fue confinada a los poros de las SLP, las nanopartículas tenían una morfología similar a la de estos.

Se ha informado que las SLP de especies como *Sporosarcina ureae* y *Bacillus sphaericus* son capaces de unirse a 200-300 complejos de Pd o Pt por subunidad proteica, lo que sucedería por interacción con diferentes residuos de aminoácidos que se encuentran en sitios de metalización específicos en la superficie de las SLP [Wahl et al., 2001; Wahl et al., 2005].

Las SLP de *Bacillus sphaericus* JG-A12 pueden unir Pd(II), que al reducirse con H<sub>2</sub> genera nanopartículas de 0,85 a 1 nm [Merroun et al., 2007]. Wahl en su trabajo de tesis doctoral propone que los grupos carboxílicos de las SLP podrían ser los responsables de la unión al Pd (II) [Wahl, 2003]. Los poros de las SLP constituyeron los sitios de nucleación para las nanopartículas de Pd. En este sentido, tanto la topografía de la superficie de las SLP como la interacción específica de las sales metálicas con algunos de sus grupos funcionales contribuyeron a dirigir los arreglos regulares de las MNPs.

En relación a esto, se obtuvieron arreglos regulares de nanopartículas de Pt y Pd empleando las SLP de *Bacillus sphaericus* NCTC9602 como soporte. La síntesis dirigida de nanopartículas de Pt y Pd utilizando a los poros como sitios de nucleación constituyó un sistema novedoso. Para ello, se cristalizó dicha SLP en dos formas diferentes (láminas y tubos), que luego se trataron con sales clorocomplejas de Pt o Pd (K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> o K<sub>2</sub>PdCl<sub>4</sub>, respectivamente) para posterior reducción con NaN<sub>3</sub>. Las SLP dirigieron la formación de nanopartículas metálicas tanto en grupos distribuidos en la superficie de la proteína (4-10 nm de diámetro), como en grupos ubicados en los poros (1-3 nm de diámetro). Las nanopartículas reducidas se encontraron distribuidas periódicamente reproduciendo la simetría p4 de la capa S de *Bacillus sphaericus* NCTC9602 y mostraron características estructurales idénticas [Wahl et al., 2001].

El depósito de Pt (reducción *in situ* con NaN<sub>3</sub> de sales metálicas) como partículas esféricas cristalinas sobre SLP de *Sporosarcina ureae* condujo a la formación de conjuntos altamente ordenados de *clusters* metálicos, siguiendo la simetría de la plantilla de SLP [Mertig et al., 1999]. Mertig y col. (1999) pudieron identificar los poros centrales y huecos en la estructura de la proteína como sitios específicos para el depósito de los *clusters* de Pt. Los diámetros medios de las MNPs obtenidas fueron de 1,2 a 1,9 nm, en acuerdo con el diámetro aparente de los poros de las SLP. De esta manera, no solo la posición de las partículas de Pt sino también el crecimiento de las mismas pueden controlarse al empleando las SLP como *bio-templates* lo que demuestra que estas son adecuadas para la manipulación dirigida de pequeños grupos de metales con una distribución de tamaño estrecha [Mertig et al., 1999].

Como se indicó anteriormente, después del aislamiento, las SLP son capaces de volver a ensamblarse sobre soportes sólidos. Por lo tanto, podrían lograrse arreglos de nanopartículas metálicas con un crecimiento controlado combinando las propiedades de nanoestructuración proporcionadas por las plantillas basadas en SLP con las propiedades de los soportes.

Una de las estrategias utilizadas para la preparación de arreglos de MNPs soportadas sobre SLP es el uso de partículas metálicas pre-sintetizadas, con tamaños y propiedades bien definidos. Como metodología general, se incubó una dispersión de las MNPs sobre una superficie (típicamente una rejilla TEM) sobre la que se ha depositado previamente la plantilla SLP. Al poner en contacto este sistema con las MNPs, estas se disponen siguiendo un patrón determinado principalmente por la disposición espacial que ha adquirido el biocomponente sobre la superficie propuesta.

Se ha reportado la preparación de matrices de NP de Au y Ag mediante el ensamblaje de las MNP preformadas en una matriz SLP depositada en una grilla de TEM recubierta por carbono [Puranik et al., 2008]. En este caso se empleó una SLP aislada de *Bacillus subtilis*. Las grillas se colocaron en la interface líquido-aire de una suspensión de la proteína y posteriormente fijadas con glutaraldehído. La grilla recubierta con la monocapa proteica fue expuesta a una dispersión de nanopartículas de Au y Ag, obteniendo así un arreglo regular de las mismas.

Hall y col. (2001) obtuvieron redes de nanopartículas de Au empleando plantillas biomoleculares de SLP aisladas de *Deinococcus radiodurans* sobre una grilla TEM (cobre-formvar) recubierta de carbono, obteniendo una estructura hexagonal empaquetada con una estructura periódica de unidades hexaméricas en forma de cono hueco con un canal central cargado positivamente. Después de eso, las grillas fueron puestas en contacto con dispersiones de nanopartículas de Au (AuNP) de diferente diámetro medio (5, 10 y 20 nm), cargadas negativa o positivamente debido a la presencia de iones citrato en la superficie o al recubrimiento de la superficie con poli-L-lisina, respectivamente. Para las AuNP cargadas negativamente con diámetros medios de 5 y 10 nm, obtuvieron matrices de nanopartículas espaciadas regularmente organizadas en una red hexagonal. En el caso de las partículas más grandes, no se obtuvo una periodicidad, distribuyéndose al azar a través de la plantilla molecular, lo que sugiere que estas no existe un ordenamiento periódico cuando el tamaño de las partículas es mayor que los parámetros de red de la SLP. Las AuNP cargadas positivamente también se distribuyeron al azar independientemente de su tamaño, probablemente debido a que su carga superficial fue similar a la del sitio de interacción específica de la superficie SLP. Por lo tanto, el autoensamblaje espontáneo de las nanopartículas preformadas está controlado por la interacción electrostática con las SLP en conjunto con el tamaño de las AuNP.

La interacción electrostática de AuNP de diferente tamaño estabilizadas con SLP aisladas de *Bacillus sphaericus* CCM2177 ensambladas en rejillas recubiertas de SiO<sub>2</sub> también demostró ser dependiente del tamaño de las MNP [Györvary et al., 2004]. Cuando se usaron nanopartículas de 5 nm se obtuvieron arreglos regulares respetando una simetría cuadrada, el empleo de nanopartículas de 10 nm dio como resultado una distribución aleatoria de las mismas sobre la superficie cristalina de la SLP, mientras que las partículas más pequeñas (2 nm) formaron una monocapa compacta. Sobre la base de sus experimentos, en dicho trabajo se afirma que las NP de Au de 5 nm se unen en la región de los poros de la red cristalina de la SLP, esta unión parece ocurrir a través de interacciones electrostáticas entre las nanopartículas cargadas negativamente y los restos catiónicos expuestos en los poros.

Una variante interesante de los ejemplos anteriores es la incubación de las bioplantillas de SLP obtenidas sobre el soporte seleccionado con una solución de una sal del metal de interés. También es posible incubar las bioplantillas de SLP en suspensión con la sal metálica antes de depositarlas sobre un soporte. Posteriormente, en ambos casos, es necesario utilizar un método de reducción para la obtención *in-situ* de las nanopartículas metálicas. Este método presenta la ventaja de evitar el uso de reactivos caros y poco ecológicos. Los experimentos han demostrado que esta es una estrategia versátil para la preparación de nanopartículas soportadas de diferentes metales nobles, evitando el uso de agentes estabilizantes.

Mertig y col. (1999) obtuvieron nanopartículas de Pt y Pd mediante la formación *in-situ* de *clusters* metálicos inducida por la incidencia de un haz de electrones en un TEM. Después de un tratamiento de activación con la solución del complejo metálico ( $K_2PtCl_4$  o  $K_2PdCl_4$ ), una SLP aislada de *Bacillus sphaericus* NCTC 9602 se colocó en una grilla TEM (cobre recubierta de carbono). Al exponer la muestra al haz de electrones de alta energía en un TEM, se observó la formación de grupos de MNPs. En esas muestras, se pudieron ver nanopartículas de 5 a 7 nm de diámetro dispuestas periódicamente reproduciendo exactamente tanto la simetría p4 de la plantilla de la capa S como su constante de red. Por otro lado, cuando no se usó SLP como soporte, Mertig y col. observaron la formación de aglomerados no regulares de MNPs con diámetros superiores a 20 nm, lo que demuestra que la matriz de proteínas determina directamente el ordenamiento de las nanopartículas.

También se obtuvieron arreglos regulares de AuNP utilizando SLP extraídas de *Bacillus sphaericus* CCM2177 [Dieluweit et al., 2005]. Las SLP se ensamblaron como monocapas sobre grillas de TEM recubiertas con una película de polivil butiral (Pioloform®). Para ello, las grillas se sumergieron en una solución de la proteína y posteriormente se fijaron con glutaraldehído. Posteriormente, se colocaron sobre gotas de una solución de  $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$  y luego se llevaron a un desecador que contenía una solución de  $Na_2S$  acidificada con HCl. Así, se produjo una reacción lenta de las muestras con el gas  $H_2S$  en el desecador. El tratamiento con gas dio como resultado una superficie decorada con nanopartículas de oro de 5 nm dispuestas regularmente de acuerdo con la geometría reticular de la plantilla de proteína.

Empleando plantillas autoensambladas sobre grillas de TEM recubiertas con carbono de SLP aisladas de *Bacillus subtilis* se obtuvieron arreglos de nanopartículas de Au y Ag. Para esto, las grillas se colocaron en la interfaz líquido-aire de una solución de la proteína y posteriormente se fijaron con glutaraldehído. La grilla recubierta con la monocapa de proteína se expuso a una solución de ácido cloroáurico. La síntesis de AuNP se logró exponiendo la grilla recubierta a hidracina, obteniendo un conjunto ordenado de nanopartículas de oro de alrededor de 6-7 nm, que replicaron la geometría de la bioplantilla de SLP. Se siguió un proceso similar para la síntesis de AgNP, para esto la incubación se realizó con nitrato de plata. Nuevamente, la obtención de AgNP (4-5 nm) dispuestas en un ensamblaje periódico que confirmó la formación de las MNPs dentro de los poros de la SLP [Puranik et al., 2008].

Finalmente y en palabras de Pum & Sleytr (2014), “... no se conoce de la existencia de otra matriz biológica que proporcione las mismas propiedades universales excepcionales como sistemas de autoensamblaje que las ‘proteínas de capas-S’”, por lo que recientemente comenzaron a ser explotadas en una gran variedad de áreas tanto biológicas y médicas como tecnológicas y aplicadas.

Por lo mencionado en este apartado, el conocimiento y el control del proceso de autoensamblaje de las SLP y de su interacción con las superficies son de primordial importancia para el desarrollo de nuevos materiales que aprovechen sus propiedades [Szeifer, 1997].

Hay pocos estudios sistemáticos que exploren la interacción de SLP con superficies de diversa naturaleza con la intención de sintetizar arreglos regulares de MNPs. Como se presentó en este apartado, la mayoría de las investigaciones se basan en la utilización de las grillas de TEM/SLP como soporte para la síntesis de MNPs. Una clase de materiales que despiertan gran interés son los polímeros, entre sus distintas formas, las partículas poliméricas en dispersión acuosa aparecen como candidatas como soporte dada la versatilidad que pueden ofrecer en su diseño, además de las aplicaciones que pueden derivarse de su empleo. Por tales motivos, a continuación se presentarán los conceptos más relevantes sobre las partículas poliméricas y su interacción con las proteínas.

## I.3 SISTEMAS POLIMÉRICOS

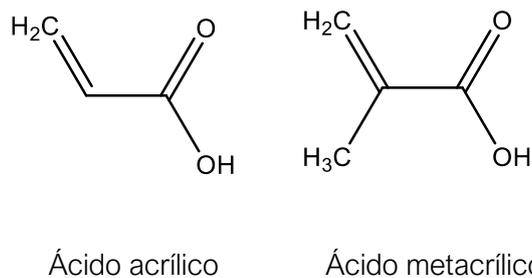
Los avances en la química de polímeros y la fisico-química de los polímeros coloidales permiten la preparación de nanopartículas poliméricas con propiedades a medida en una amplia variedad de composición, tamaño, estructura y funcionalidad superficial que se pueden utilizar para generar plataformas multifuncionales [Rao & Geckeler, 2011; Vauthier & Bouchemal, 2009; Asua, 2002]. Dos de los polímeros más empleados en la preparación de dispersiones acuosas son los poliacrílicos y los poliuretanos, para los cuales existen técnicas de síntesis bien descritas [Makshina et al., 2019; Sardon et al., 2015]. Dado que en este trabajo se emplearán dispersiones acuosas de partículas acrílicas y poluretánicas, en esta sección se presentarán los principales aspectos vinculados a estos polímeros.

### I.3.1 Polímeros acrílicos

Durante las últimas décadas, la ciencia de los polímeros se ha desarrollado significativamente, dando como resultado el diseño y la síntesis de materiales duraderos y versátiles para múltiples aplicaciones de la vida cotidiana incluidos los textiles, electrónica, juguetes y envases para alimentos [O’dea et al., 2020].

Los poliacrilatos y polimetacrilatos (comúnmente conocidos como polímeros acrílicos) son polímeros preparados a partir del ácido acrílico y metacrílico y sus correspondientes ésteres, presentados en el esquema I.1. Estos polímeros exhiben propiedades muy interesantes como buenas propiedades mecánicas, estabilidad térmica, y transparencia que permiten su empleo en diversas aplicaciones [Veith et al., 2012].

Los polímeros acrílicos son parte de la familia conocida como polímeros vinílicos y la polimerización de estos monómeros se da gracias a la presencia de un doble enlace reactivo. La reacción de polimerización procede por adición sucesiva de monómeros en un mecanismo conocido como crecimiento de cadena, existiendo diferentes técnicas para llevar a cabo esta polimerización por adición radicalaria. En general, las técnicas más empleadas son la polimerización en masa, polimerización en solución, polimerización en suspensión, polimerización en emulsión y polimerización en miniemulsión, de ellas, las tres últimas conducen a la obtención de dispersiones acuosas.



**Esquema I.1** Estructura del ácido acrílico y del ácido metacrílico, de los cuales se deriva la familia de los monómeros acrílicos (ésteres acrílicos).

En este trabajo, para la preparación de las partículas poliacrílicas en dispersión acuosa que se emplearon, se utilizó la polimerización en emulsión, por lo que se profundizará a continuación la explicación de esta técnica.

### I.3.1.1 Polimerización en emulsión

La polimerización en emulsión consiste en dispersar un monómero insoluble en agua en una fase acuosa mediante la ayuda de surfactantes o emulsificantes, formando de esta manera una emulsión (dispersión coloidal de un líquido en otro). Posteriormente se lleva a cabo una polimerización mediante un procedimiento de radicales libres por el agregado de un iniciador. Esta técnica presenta algunas ventajas respecto a otras, entre las cuales se destacan un mejor control del proceso gracias al estado físico del sistema y una menor injerencia de problemáticas asociadas a aspectos térmicos o de viscosidad [Odián, 2004].

Los principales monómeros empleados en polimerización en emulsión pueden clasificarse en dos subgrupos según el valor de su Tg. Un grupo denominado “*hard*” (de alta Tg) incluye al estireno, cloruro de vinilo, acetato de vinilo, metacrilato de metilo, mientras que al grupo denominado *soft* (de baja Tg) pertenecen el butadieno, acrilato de butilo, y acrilato de 2-etilhexilo, entre otros. El surfactante más comúnmente utilizado es el laurilsulfato de sodio, de naturaleza iónica. El iniciador empleado puede ser de activación térmica como el persulfato de potasio o el persulfato de amonio, como también de activación redox como el bisulfito de sodio. Los iniciadores térmicos usados generalmente requieren de una temperatura de la mezcla de reacción acorde a su temperatura de

descomposición, mientras que los iniciadores redox ofrecen la posibilidad de trabajar a temperaturas más bajas [Asua, 2007].

Esta técnica conduce a la obtención de partículas poliméricas dispersas en un medio continuo, comúnmente agua, denominadas como látex. Estas partículas de polímero son en su mayoría esféricas, sin embargo esta morfología puede modificarse variando las condiciones de síntesis permitiendo su adecuación a distintas aplicaciones. El diámetro promedio de las partículas obtenidas varía entre los 50 y 1000 nm, más comúnmente en el rango de 80 a 300 nm [Barandiaran et al., 2007; Wang et al., 1994; Asua, 2007].

La polimerización en emulsión puede llevarse a cabo en tanques agitados semicontinuos, continuos, o en *batch*, empleándose este último método cuando se desea copolimerizar monómeros cuya reactividad es similar.

La polimerización en “*batch*” utilizada en este trabajo implica la adición de todos los reactivos al reactor desde el inicio, lo que la convierte en un proceso simple. Típicamente, en primer lugar se prepara y calienta la emulsión del/los monómero/s en presencia del surfactante hasta alcanzar la temperatura de reacción. Posteriormente, se agrega una solución de un iniciador para dar comienzo al proceso de polimerización. La mezcla de reacción debe agitarse durante todo el período de polimerización con el objetivo de lograr una buena homogeneización del sistema y una óptima disipación del calor [Lovell & Schork, 2020].

Cuando un surfactante se adiciona al agua, sus moléculas se reorientan para formar agregados hidratados conocidos como micelas. Para que se dé esto, el surfactante debe alcanzar una concentración determinada conocida como “concentración micelar crítica”. Si a este sistema formado por micelas se le adicionan monómeros insolubles o de baja solubilidad, estos pueden existir en tres formas dentro de la fase acuosa:

I. dentro de las micelas: algunas moléculas del monómero pueden estar dentro de las micelas, volviéndose de esta forma “solubles” en agua.

II. aglomerados emulsificados (gotas): éstos son parcialmente “solubles” en agua por adsorción del emulsificante.

III. moléculas discretas en la fase acuosa: debido a que los monómeros no son totalmente insolubles en agua, algunas moléculas del mismo se encuentran disueltas en esta fase

Antes de que ocurra la polimerización, el sistema se encuentra en un equilibrio dinámico entre las diferentes partes del mismo. Cuando se inicia la reacción de polimerización, el iniciador se disocia en radicales libres y éstos reaccionan con el monómero disuelto formando la especie que se propaga en el medio acuoso. Así, los radicales formados en fase acuosa desde los iniciadores hidrosolubles reaccionan con los monómeros disueltos formando los oligoradicales que pueden:

- I. Entrar en las partículas poliméricas
- II. Entrar en la micela (nucleación heterogénea)

- III. Propagarse en fase acuosa hasta volverse insolubles y precipitar formando nuevas partículas poliméricas (nucleación homogénea)
- IV. Terminar con otros radicales en fase acuosa

La probabilidad de cada evento depende de las condiciones del sistema en cuanto al número de partículas poliméricas, la concentración del emulsionante, la concentración del iniciador y la de monómero, y del tipo de polimerización.

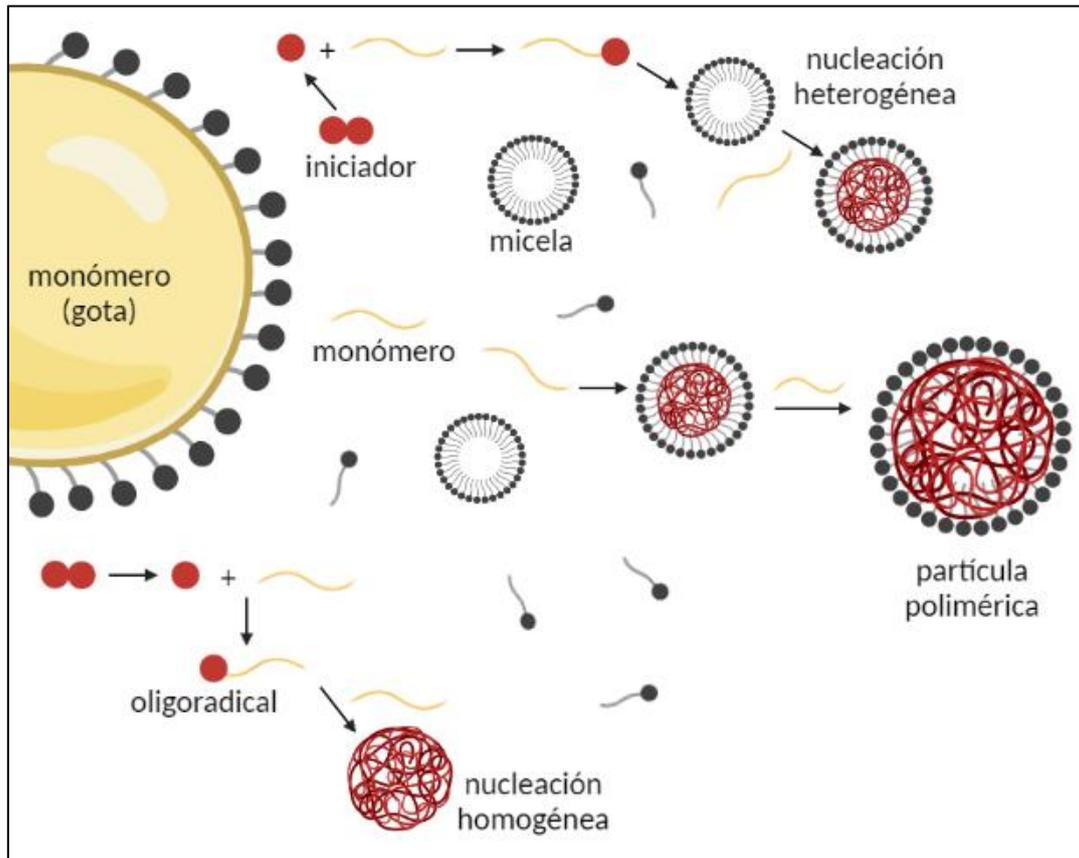


Figura I.6 Representación del mecanismo de polimerización en emulsión

Dentro de la micela, en un entorno rico en monómero, comienza la polimerización formando rápidamente una cadena en un proceso conocido como nucleación heterogénea (formación del polímero por ingreso del radical a la micela). Sin embargo, también existirá polimerización cuando los oligoradicales en solución crecen en la fase acuosa y luego de alcanzar un determinado tamaño (largo de cadena) precipitan estabilizados por el emulsificante en lo que se conoce como nucleación homogénea (más predominante cuanto más hidrosolubles sean los monómeros). Por lo mencionado previamente, durante la nucleación coexisten en la mezcla: gotas de monómeros, monómeros en micelas y polímeros en micelas, como puede verse representado en la figura I.6. Las partículas poliméricas compiten por los radicales libres permanentemente. Cuando el monómero es consumido para formar con el radical el polímero, este es reemplazado por más monómero que difunde desde las gotas a través de la fase acuosa aumentando el tamaño de la partícula y disminuyendo el de la gota monomérica. Las micelas desaparecen luego de un tiempo y se convierten en partículas de polímero por la entrada directa de un radical, y por

su destrucción para proveer surfactante que estabilizará las cadenas poliméricas ya formadas que precipitarán hacia la fase acuosa. Luego de un tiempo, se agota la disponibilidad de micelas, dándose así por finalizado el proceso de nucleación conocido como intervalo I, luego del cual ya no se formarán nuevas partículas, no habrá más nucleación heterogénea, ni surfactante libre para estabilizar la nucleación homogénea. A continuación comienza el denominado intervalo II. En esta etapa el sistema está conformado por las gotas de monómero y el polímero formado previamente. Los monómeros consumidos se van reemplazando por más monómero que difunde desde las gotas que actúan como repositorio de monómeros para la micela atravesando la fase acuosa. Con el paso del tiempo las gotas de monómero desaparecerán marcando el final del intervalo II. Por último, en el intervalo III, se observa la mayor tasa de conversión, consecuentemente, la cantidad de monómero en la partícula polimérica decrece continuamente.

### I.3.1.1.1 Características microestructurales

Los polímeros obtenidos por emulsión son materiales complejos y sus aplicaciones estarán determinadas, principalmente, por sus características microestructurales. Algunas de las más importantes son su composición y distribución de la secuencia de monómeros (MSD), la distribución de peso molar (MWD), la arquitectura del polímero (ramificado, injertado, reticulado, con determinado contenido de fracción gel), la funcionalidad superficial en la partícula, su morfología y la distribución de tamaño.

A continuación, se discutirán brevemente los principales métodos de control de las características microestructurales de mayor interés en este trabajo:

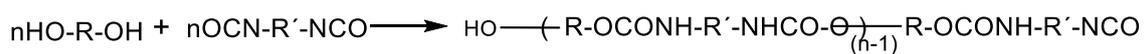
- I. **Composición del copolímero:** La composición del polímero se define principalmente a través de la selección de los monómeros a utilizar en su síntesis. Mediante la adecuada selección de los monómeros es posible producir polímeros con diferente funcionalidad, confiriéndoles diferentes características superficiales a las partículas poliméricas además de afectar a las propiedades del polímero.
- II. **Distribución de peso molecular:** La longitud de la cadena polimérica formada por adición radicalaria estará dada por el resultado de la competencia entre las reacciones de prolongación y de terminación. El peso molecular se verá afectado por variaciones en la concentración y el tipo de iniciador, el número y tamaño de las partículas poliméricas y la concentración de monómero.
- III. **Distribución de tamaño de partícula:** La distribución de tamaño de las partículas afecta el comportamiento reológico del látex, que a su vez afecta la transferencia de calor y masa en el sistema, la estabilidad coloidal, la capacidad de formar films y limita así las posibles aplicaciones. El tamaño de la partícula polimérica depende directamente del proceso de nucleación, la forma más eficiente de modificarlo es el aumento en la concentración del surfactante.
- IV. **Morfología de la partícula:** La morfología de las partículas será producto de la interacción entre el control termodinámico y difusional del proceso.

Termodinámicamente será preferencial aquella morfología que posea la menor energía superficial (esférica). Si se desea obtener algún tipo de morfología particular esta deberá ser convertida en la preferencia termodinámica del sistema, modificando la energía superficial a través de la variación en las tensiones interfaciales.

Gracias al control sobre las propiedades de las partículas que ofrece la polimerización en emulsión, en un proceso relativamente sencillo, la misma es una de las técnicas más empleadas para la preparación de sistemas poliméricos en fase acuosa [Asua, 2007].

### I.3.2 Poliuretanos

Los poliuretanos se sintetizan mediante una reacción de poliadición en etapas a partir de compuestos polihidroxilados (ya sean moléculas sencillas o polímeros como poliéteres o poliésteres) normalmente conocidos como polioles, y poliisocianatos (también sencillos o poliméricos), ambos con funcionalidad igual o superior a dos, formando enlaces uretano [Charlon et al., 2014 ;Weil, 1993]. Esto se representa en esquema I.2.



**Esquema I.2** Esquema de síntesis de los poliuretanos

La amplia variedad de sustancias disponibles para la elección de las materias primas permite realizar diversas combinaciones en la síntesis de estos sistemas, pudiéndose obtener en consecuencia un gran número de poliuretanos con propiedades muy diferentes. Las propiedades finales del material poliuretánico estarán determinadas por la funcionalidad del polirol y el poliisocianato, la naturaleza química de R y R' y la relación polirol/poliisocianato, como también por la temperatura a la cual es llevada a cabo la reacción, el solvente utilizado, tipo y cantidad de catalizador empleados, entre otras variables [Charlon et al., 2014; Pauzi et al., 2014].

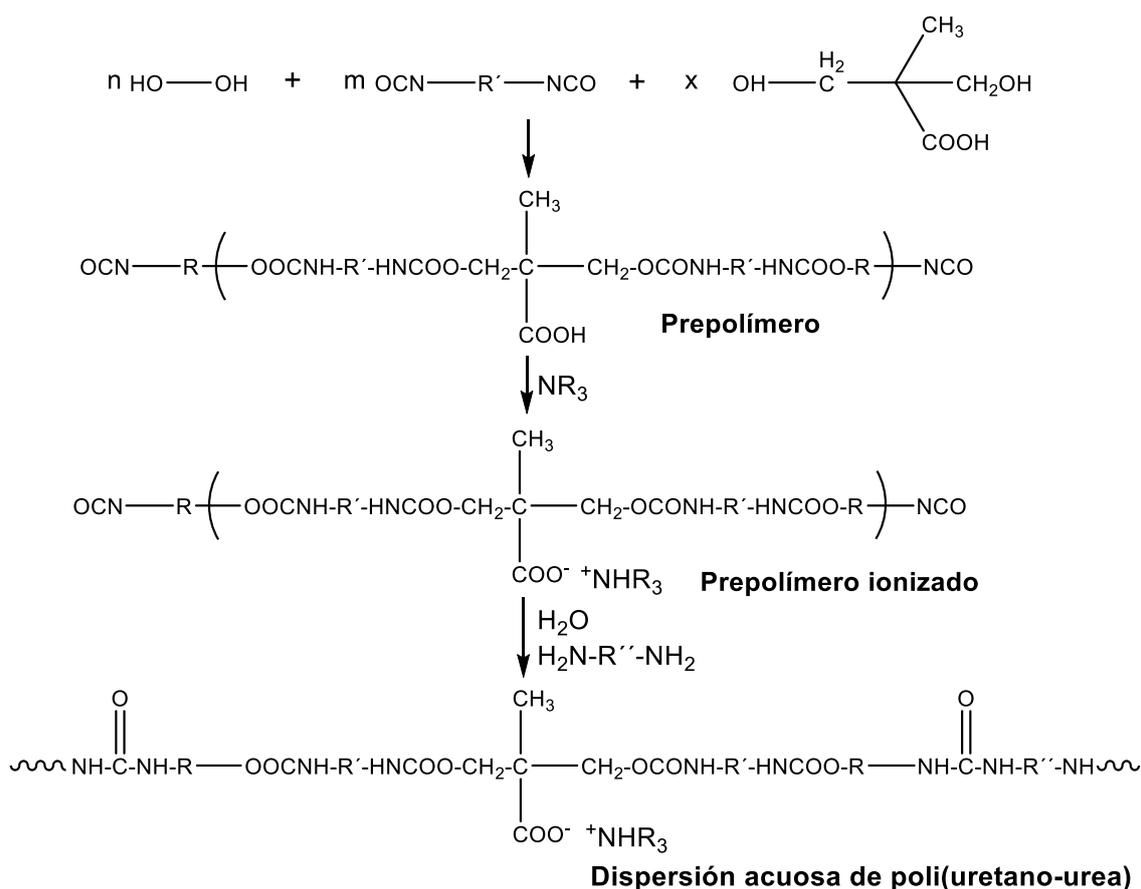
Gracias a esta versatilidad en el proceso de obtención se pueden sintetizar poliuretanos con una variada gama de propiedades como resistencia mecánica, tenacidad, buena resistencia a la abrasión, la corrosión y el ataque químico y una buena flexibilidad a baja temperatura. En función de las distintas propiedades microestructurales, los poliuretanos han sido utilizados en las formulaciones de pinturas, revestimientos, aislantes, recubrimientos, etc. [Taheri & Sayyahi, 2016; Sridaeng et al., 2015; Ismail, et al., 2011].

Los sistemas poliuretánicos que se obtuvieron en este trabajo fueron dispersiones acuosas de poliuretanos, cuyo desarrollo e interés se ha incrementado continuamente debido a las distintas leyes que restringen la cantidad de compuestos orgánicos volátiles permitidos, lo que impulsa la producción de estas dispersiones más amigables con el medio ambiente [Akindoyo et al., 2016]. Dentro de los métodos desarrollados para la obtención de poliuretanos dispersables en agua se encuentran el método del prepolímero en masa o en solución, por fusión-dispersión-condensación, vía cetimina-cetazina, en miniemulsión y

por métodos no-isocianato. En este trabajo se optó por el primero de ellos, el método del prepolímero en masa, sobre el cual se profundizará a continuación.

### I.3.2.1 Método del prepolímero

El método del prepolímero es un proceso de múltiples etapas que involucra inicialmente la reacción en masa de un poliol con un exceso molar de diisocianato, con participación de una molécula que aporte un grupo funcional ionizable. Un esquema de las reacciones involucradas en este procedimiento se muestran en el esquema I.3 A través de la reacción entre éstos, se obtiene un prepolímero de bajo peso molecular con grupos isocianato terminales, que posteriormente se convierte a un prepolímero ionómero mediante una reacción ácido-base. La molécula que se emplea para introducir el grupo ionizable suele ser un diol conteniendo un grupo carboxílico (como por ejemplo el ácido dimetilolpropiónico-DMPA) dará origen a un anionómero, o puede incluir una funcionalidad básica y dar origen a un cationómero luego de la ionización (se puede emplear por ejemplo N-metildietanolamina) [Delpech , 1996].



Esquema I.3 Representación esquemática de la síntesis de poliuretanos en dispersión acuosa preparados por el método de prepolímero en masa.

Para la neutralización del prepolímero uretánico se utiliza habitualmente una amina terciaria (si se tratara de un aniónómero) o con un ácido orgánico (en caso de tratarse de un cationómero) [Król & Król, 2020].

En una etapa siguiente se lleva a cabo la dispersión en agua del ionómero en simultáneo con un aumento del peso molecular producto de una reacción de extensión de cadena, la que se logra por el empleo de una molécula bifuncional (una diamina o un diol de bajo peso molecular) que reaccione con los grupos isocianato terminales. El paso de dispersión debe realizarse en un período corto de tiempo a una temperatura por debajo del punto crítico donde los grupos -NCO comienzan a reaccionar con el agua [Honarkar, 2017], con una viscosidad de la mezcla de reacción adecuada. De ser necesario, puede agregarse a la mezcla alrededor de un 12-15 % p/p de un solvente orgánico para reducir su viscosidad y facilitar la dispersión del prepolímero.

La naturaleza y la cantidad de grupos ionizables introducidos en la cadena del PU tienen efectos significativos sobre sus propiedades. En el caso de los ionómeros, variando la cantidad de la molécula que aporta los grupos ionizables (por ej., el DMPA en un aniónómero) se logra modificar las propiedades fisicoquímicas de las dispersiones, como por ejemplo su tamaño y densidad de carga superficial [Król & Król, 2020].

Se ha confirmado que la estabilidad coloidal de los PUD aumenta conforme la cadena se torna más hidrofílica. Esto se da como resultado del aumento del potencial zeta conforme se incrementa la relación molar DMPA/políol, producto de lo cual se da una disminución en el tamaño promedio de las partículas [Zhou et al., 2016].

## I.4 INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS Y SUPERFICIES POLIMÉRICAS

La interacción entre partículas de polímero y proteínas ha atraído la atención en los últimos años, dado que su explotación deriva en numerosas aplicaciones potenciales, incluidas las bioseparaciones, diagnóstico por imágenes, biosensores, administración de fármacos y biochips, entre otras [Hoshino et al., 2014; Kim & Yoon, 2002]. La combinación de polímeros sintéticos con proteínas imparte a las últimas características y funciones adicionales, incluyendo anfilicidad a medida, diversos modos de autoensamblaje, comportamiento de separación de fases entre otros. El peso molecular de las cadenas poliméricas, el sitio y tipo de interacción utilizada, entre otros, son parámetros de importancia crítica para mantener la bioactividad y propiedades de las proteínas en el sistema proteína-polímero resultante [Boyer, et al., 2011].

### I.4.1 Adsorción de proteínas sobre superficies poliméricas

La adsorción de proteínas se puede definir como la adhesión o el pegado de proteínas sobre una variedad de superficies. Las proteínas pueden ser proteínas séricas, enzimas, anticuerpos, antígenos, etc., mientras que algunas de las superficies más utilizadas son superficies inorgánicas (metales, cerámicos), y polímeros. Los términos comúnmente empleados para describir a quienes participan del proceso son: adsorbato y

adsorbente. En la adsorción de proteínas sobre partículas de polímero, el adsorbato es proteína y el adsorbente las partículas de polímero [Kim & Yoon, 2002].

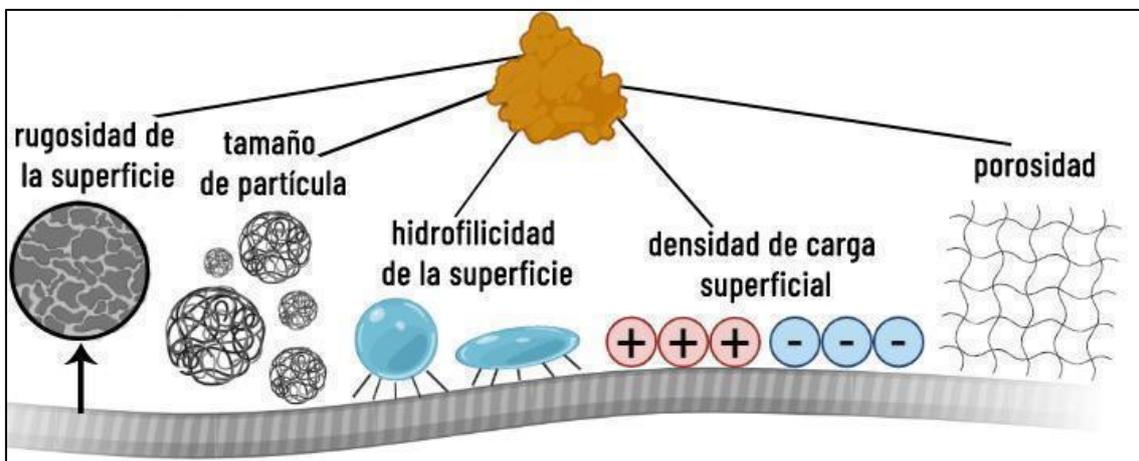
La adsorción de las proteínas sobre las superficies poliméricas puede darse de dos formas. Una de ellas, denominada adsorción química, involucra la generación de un enlace covalente entre la superficie y la proteína a través de diversas estrategias [Nobs et al., 2004; Zeng et al., 2006], una de las más usadas es la reacción entre los grupos amino de los residuos proteicos y los grupos ácido o aldehído de los polímeros [Ge et al., 2007; Kim et al., 2005]. Otra de las estrategias químicas utilizada implica la vinculación de los residuos de cisteína a la superficie por química tiol-alqueno en reacciones tipo tiol-maleimida [Boyer et al., 2009]. Finalmente, se han desarrollado técnicas de enlace covalente vía química azida-alquino mediante la cual se ha logrado unir proteínas a polímeros con éxito [Boyer et al., 2008; Droumaguet & Velonia, 2008; Agut et al., 2007].

Por otro lado, la adsorción física (empleada en este trabajo) es la que resulta de interacciones débiles entre los componentes (interacciones de tipo electrostáticas, hidrofóbicas, de Van der Waals, puente de hidrógeno). En esta línea, se ha explotado en gran escala la interacción electrostática entre los grupos carboxilato de la superficie polimérica y los residuos catiónicos, con grupos amino, de las proteínas [Schmidt et al., 2006; Sandanaraj et al., 2005]. Si bien esta estrategia no implica selectividad de enlace, se han reportado casos en los que la interacción electrostática presenta selectividad para algunas proteínas [He et al., 2009].

La estrategia no covalente (física) presenta algunas ventajas respecto a la vía covalente, principalmente la facilidad y rapidez de las técnicas y la posibilidad de aplicarlas a un gran rango de proteínas. Sin embargo, las interacciones físicas son débiles en comparación con las covalentes y en algunos casos puede derivar en la liberación de la proteína. Finalmente, debido a este último aspecto, las estrategias covalentes con enlaces fuertes pueden conducir a una pérdida de actividad biológica de la proteína [Boyer et al., 2011].

Aunque los mecanismos de adsorción de las proteínas sobre las superficies poliméricas no se comprenden completamente, se conocen algunas características fisicoquímicas que influyen en estos fenómenos [Nakanishi et al., 2001; Van Tassel, 2003]. Estas se relacionan con las características de la proteína (tamaño, estabilidad, concentración, funcionalidades e interacciones proteína-proteína); la energía libre superficial del soporte (balance hidrofílico/hidrofóbico y polaridad); la carga superficial y las interacciones electrostáticas relacionadas; naturaleza química, espesor, densidad y movilidad de los grupos funcionales superficiales; micro y nano topografías y rugosidades; despliegue en el tiempo; efecto de la adsorción competitiva; entorno (pH, sales, temperatura, etc.). Los principios termodinámicos que gobiernan la adsorción involucran términos entrópicos y de entalpía que favorecen o no la adsorción. La entalpía implica fuerzas intermoleculares como las de van der Waals, las de Coulomb, y las ácido-base de Lewis, mientras que la entropía se basa en interacciones hidrofóbicas, entropía conformacional y movilidad restringida. La adsorción ocurrirá cuando el cambio en la energía de Gibbs ( $G$ ) se vuelva negativo y haya un resultado neto entre las interacciones de atracción y repulsión entre la superficie del material, las moléculas de proteína y el

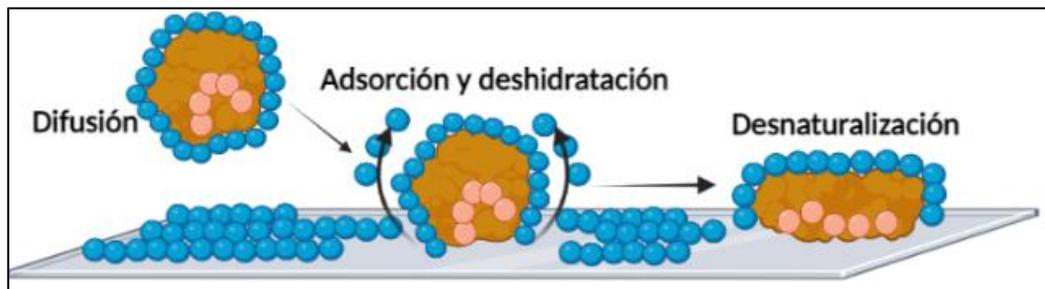
solvente. En general, se cree que la adsorción de proteínas ocurre a través de varios estados de equilibrio. Primero, las proteínas son transportadas a la superficie, luego forman una capa límite energética con unión y algunos reordenamientos estructurales. Además, se pueden separar y transportar fuera de la superficie. Durante el paso de adsorción, una proteína puede desplegarse rápidamente en la superficie para adaptar su energía al nuevo entorno. La adsorción en sí ocurre en microsegundos a milisegundos, mientras que la relajación exige períodos mucho más largos, que van desde horas hasta días. En el caso de una afinidad de proteína por la superficie muy fuerte, los estados de no equilibrio pueden ser retenidos o, en otras palabras, se adsorberán irreversiblemente a la superficie [Norde & Haynes, 1995]. La primera capa de proteínas puede adsorberse de forma reversible o irreversible, mientras que la segunda capa tiende a adsorberse de forma reversible debido a la poca o ninguna afinidad entre las propias moléculas causada por retención de agua [Lundström, 1985] o debido a su estado compacto altamente regular y al desdoblamiento incompleto causado por su débil flexibilidad [Norde & Haynes, 1995]. La adsorción de proteínas también se verá influenciada por las heterogeneidades de la superficie y la presencia de moléculas pre-adsorbidas [Horbett & Brash, 1987]. Otros factores importantes que influyen en la bioadhesión son la estabilidad conformacional de la proteína en estado nativo, las cantidades relativas de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$ , la hidrofobicidad general y la carga eléctrica en las condiciones de adsorción. Desde el punto de vista de la superficie, su hidrofiliicidad/hidrofobicidad, polaridad, carga y características topográficas son algunas de las propiedades superficiales que gobiernan la adsorción de las proteínas sobre la misma, lo que se representa esquemáticamente la figura I.7.



**Figura I.7** Propiedades físicas de las partículas poliméricas que influyen en el proceso de adsorción de proteínas.

Una proteína con una conformación débilmente estable mejora la adsorción en un soporte aumentando la entropía; esto ocurre por diferentes vías influenciadas por la relación hidrofobicidad/hidrofilicidad del soporte. En contacto con la superficie hidrofóbica, la proteína se adsorbe a través de sus diferentes regiones hidrofóbicas superficiales. Después de esto, la proteína se desplegará sobre esta superficie exponiendo su núcleo hidrofóbico en orden de reducir el área superficial hidrofóbica neta del sistema hacia el solvente [Castells & van Tassel, 2005]. Además, es importante notar que tanto el sitio de unión de la proteína como del polímero, se encuentran completamente solvatados previo a la unión

y los grupos polares forman uniones puente de hidrógeno con el solvente. Esto genera que durante el proceso de unión entre la biomolécula y el polímero, se pierda parte de la capa de solvente que rodea la superficie de ambos, que es expelida hacia el seno del mismo, involucrando la rotura de numerosos puentes de hidrógeno formados con las moléculas de agua de la primera capa de solvatación [Poncin-Epaillard et al., 2012]. El despliegue de la proteína va acompañado de la liberación de moléculas de agua desde la interfase, lo que conduce a una ganancia de entropía del sistema [Patel et al., 2012] (Figura I.8).



**Figura I.8** Adsorción de una proteína sobre una superficie polimérica, proteína hidratada, adsorción y deshidratación.

Por otro lado, las superficies hidrofílicas interactúan con los grupos funcionales polares y cargados de la superficie de la proteína. Sin embargo, en este caso, las proteínas tienen una tendencia mucho menor a desplegarse irreversiblemente en la superficie [Wertz, & Santore, 2001]. En ambos casos, los cambios del estado de hidratación tienen un gran impacto. Es decir, las moléculas de agua están fuertemente unidas a las proteínas y superficies, a través de interacciones electrostáticas y enlaces puente de hidrógeno, manteniendo a los grupos solvatados. Si las superficies de la proteína y el soporte son polares, su hidratación es favorable y las moléculas de agua retenidas en la interfase evitarán o disminuirán la adsorción (Figura I.8) [Iwasaki et al., 2006; Karlsson et al., 2004]. Con las superficies polares, las proteínas "duras" (poco flexibles o estables) se adsorberán solo si son atraídas electrostáticamente, mientras que las proteínas "blandas" (flexibles o inestables) experimentarán cambios abruptos que resultarán en un aumento de la entropía conformacional lo suficientemente grande como para provocar su adsorción a superficies que de otro modo la repelerían electrostáticamente [Malemsten, 1998].

Generalmente, tanto la superficie como la proteína están cargadas eléctricamente y rodeadas de contraiones que neutralizan la carga superficial. Las interacciones electrostáticas juegan un papel importante en interacciones proteína/polímero. En algunos estudios se ha examinado la adsorción de proteínas con diferentes estructuras sobre superficies poliméricas con carga positiva y negativa, observándose que la presencia de cargas negativas [Scotchford et al., 2002] o positivas [MacDonald et al., 2002] lograron incrementar la cantidad de proteínas adsorbidas. Las dobles capas eléctricas formadas potenciarán la atracción electrostática si la proteína y la superficie tienen cargas opuestas o la repulsión si las cargas son las mismas. La adsorción máxima ocurre cuando la densidad de carga de la proteína coincide exactamente con la de la superficie, lo que da como resultado una carga neta cero en la región de contacto. La adsorción (en menor medida)

también se puede observar en las superficies que contienen la misma carga que la proteína. Esto indica que las fuerzas electrostáticas globales afectan la adsorción pero no necesariamente la dominan [Hartvig et al., 2011]. Las interacciones electrostáticas están fuertemente influenciadas por el pH y la fuerza iónica de la solución y, por lo tanto, a baja fuerza iónica, las proteínas catiónicas se unen a las superficies aniónicas de forma reversible. Para la mayoría de las proteínas, la adsorción en una superficie es máxima en sus puntos isoeléctricos, porque las interacciones proteína-solvente se vuelven menos favorables y las interacciones proteína-proteína más favorables, debido a la carga neta cero entre ellas. A pH lejos del  $pI$  de las proteínas, es muy probable que se retenga la formación de la doble capa debido a las repulsiones electrostáticas, ya que la carga en las superficies de las proteínas se vuelve más importante. Por otro lado, las proteínas son más estables en su  $pI$  [Silva et al., 2010].

Otro factor superficial que influye sobre la adsorción de las proteínas es la topografía de la superficie, respecto a esto, algunos estudios han revelado la influencia de la nanotopografía en la adhesión de proteínas [Lord, et al., 2010]. Las características topográficas incluyen rugosidad, curvatura y características geométricas específicas. La humectabilidad local de la superficie también se modula e induce diferentes grados de empaquetamiento geométrico de las proteínas [Roach, et al., 2007]. El efecto general de la rugosidad de la superficie no está claro, algunos reportes sugieren que la cantidad de proteína adsorbida no se ve afectada o lo hace muy moderadamente por la rugosidad de la superficie a la que se enfrenta pero sin cambios conformacionales [Cai et al., 2006]; mientras que otros informes revelan un gran aumento de las proteínas adsorbidas y cambios abruptos en su conformación tras la adsorción [Han et al., 2003]. También se afirmó que las proteínas con dimensiones en el mismo orden que la rugosidad de la superficie no son alteradas conformacionalmente por la superficie, y las proteínas con dimensiones mucho más pequeñas o mucho más grandes sufren cambios tras la adsorción [Galli et al., 2002]. No se encontró aún una relación lineal entre la rugosidad de la superficie y la adsorción de proteínas [Fournier, 1999]. Por otro lado, Roach y col. (2006) comprobaron que el grado de curvatura también puede afectar la adsorción, observando que al disminuir la curvatura superficial una proteína como la albúmina de suero bovino (BSA) se desnaturaliza mientras que el fibrinógeno bovino (Fg) se desnaturaliza con el aumento de esta. Otro estudio [Lee et al., 2004] mostró la dependencia de la adsorción no solo de la topografía del sustrato sino también de la morfología de la proteína (hebra o globular).

La funcionalidad química de la superficie polimérica también afectará a la adsorción de proteínas [Zhang et al., 2006], dado que la presencia de grupos funcionales que aporten propiedades particulares a las superficies (hidrofilicidad/hidrofobicidad, carga) impactará en los mecanismos de adsorción de proteínas. Las funcionalidades más examinadas en cuanto sus efectos sobre la adsorción son carboxilos (-COOH), hidroxilos (-OH), aminos (-NH<sub>2</sub>) y metilos (-CH<sub>3</sub>) [Tang et al., 2008].

Roach y col. (2005) investigaron los efectos de las superficies hidrofóbicas (-CH<sub>3</sub>) e hidrofílicas (-OH) sobre la adsorción de BSA y Fg. Sus resultados indicaron que la BSA presentó una afinidad más fuerte con la superficie metilada. Sin embargo, Fg se adhirió a ambas superficies.

Así, la naturaleza física de la unión proteína-polímero es un fenómeno complejo, del que aún quedan muchos aspectos por comprender. Como se indicó, el mecanismo de adsorción depende tanto de las propiedades superficiales y conformación de las proteínas, como también de las propiedades fisicoquímicas de la superficie polimérica, en este sentido, las partículas poliméricas son materiales con características distintivas que requieren un análisis en particular dentro de los materiales poliméricos.

#### I.4.1.1 Interacción entre proteínas y partículas poliméricas

Gracias a las técnicas de síntesis disponibles en la actualidad, se pueden preparar partículas poliméricas con diversa composición, morfología y propiedades fisicoquímicas definidas, que permiten estudiar racionalmente el fenómeno de interacción de éstas con diversas proteínas.

En el análisis de la adsorción de proteínas sobre partículas poliméricas en suspensión se debe tener en cuenta la naturaleza dinámica del proceso que imposibilita realizar el estudio bajo las aproximaciones del análisis de la adsorción sobre superficies laminares fijas. En este tipo de sistemas, el equilibrio de adsorción sobre partículas poliméricas es rápido y muy dinámico dado el continuo movimiento de los adsorbentes. Por esto, el seguimiento del proceso queda limitado a la cuantificación del contenido de proteína residual en la fase acuosa luego de separar las partículas poliméricas. Se ha comprobado que esta técnica da suficientes datos confiables y reproducibles, pero no permite obtener información cinética ni conformacional [Kim & Yoon, 2002].

Como se mencionó para las superficies poliméricas en general, hasta el momento se han utilizado dos diferentes estrategias, denominadas covalentes (química) y no covalentes (física), para combinar proteínas con partículas poliméricas presintetizadas tales como partículas en dispersión acuosa, dendrímeros, micelas y vesículas. La estrategia no covalente emplea metodologías *"layer by layer"* (capa por capa) generalmente a través de interacciones electrostáticas, atracciones hidrofóbicas o uniones selectivas por bioafinidad. En la figura I.9 se representan ambos tipos de estrategias. Mientras que es común que en el sistema polímero-proteína las proteínas pierdan su actividad biológica (y sus propiedades específicas) cuando la unión es covalente, la estrategia no covalente basada en interacciones electrostáticas ofrece una alternativa amigable con las proteínas que generalmente no altera la actividad biológica de la proteína nativa permitiendo que se mantengan sus propiedades específicas, como la estructura secundaria y su actividad enzimática entre otras [Boyer et al., 2011].

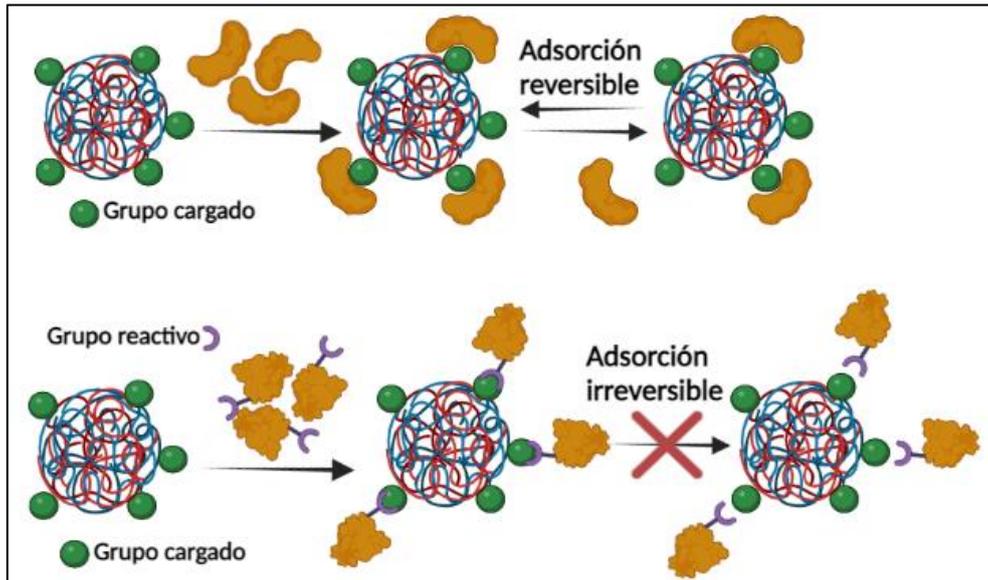


Figura I.9 Representación de la unión por vía no covalente (arriba) y covalente usando un sitio reactivo específico en la proteína (abajo) [Boyer et al., 2011]

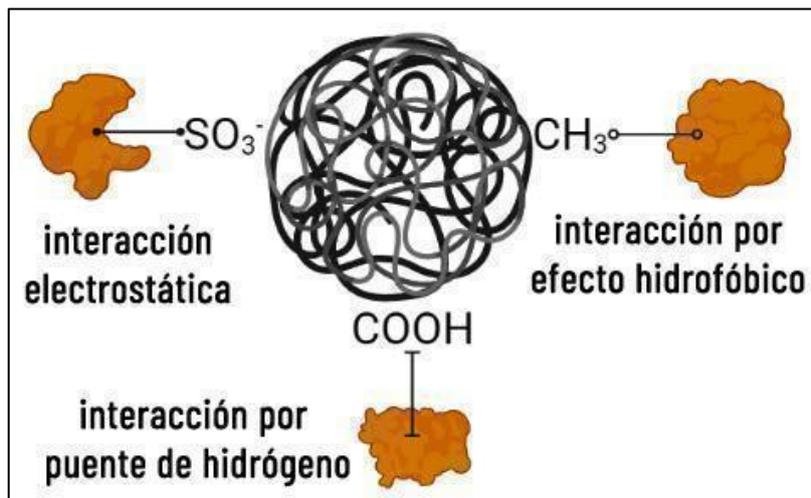


Figura I.10 Interacción entre proteínas y partículas poliméricas

Desde el punto de vista de la composición, las partículas poliméricas pueden poseer cargas negativas o positivas debido a la presencia de grupos funcionales neutros (polares y no polares), aniónicos o catiónicos en superficie, por lo que se pueden establecer enlaces de diferente naturaleza con la proteína (Figura I.10). La adsorción de proteínas séricas sobre superficies poliméricas tiene múltiples implicaciones biomédicas, por este motivo dicho proceso es uno de los más estudiados. Dentro de esta familia de proteínas, la adsorción no covalente de BSA sobre superficies con distinta funcionalización ha sido ampliamente reportada. Funcionalizando en distinta medida la superficie de microesferas de poliestireno con grupos carboxílicos (provenientes del ácido metacrílico), se reportó una disminución de la contribución de interacciones hidrofóbicas BSA-polímero conforme descende la cantidad de grupos carboxilos en superficie. Las superficies altamente carboxiladas presentaron una mayor contribución de interacciones de puente de hidrógeno

en el proceso de adsorción. Un aspecto relevante de este reporte es la dependencia de la naturaleza de enlace con el pH, al acercar el pH del medio al pI de la proteína se logró minimizar la contribución de interacciones electrostáticas al proceso [Haynes et al., 1994a; Haynes et al., 1994b; Yoon et al., 1996]. La interacción de la BSA y otras proteínas como la fibronectina, inmunoglobulina G, albúmina, vitronectina, y fibrinógeno cumple un rol clave en la regulación de los procesos celulares asociados al implante de biomateriales [Vogler, 2012].

Dentro de los trabajos en los cuales se ha explotado la interacción electrostática se encuentra el de Carmona-Ribeiro (2003) en el que se preparó un sistema de partículas de poliestireno sulfonatadas a las que se cubrió con una capa catiónica de bromuro de dioctadecil dimetilamonio. La densidad de carga positiva lograda en la superficie del polímero fue utilizada para depositar proteínas con densidad de carga negativa lográndose un recubrimiento proteico fino y organizado.

Las interacciones entre el grupo ácido carboxílico (densidad de carga negativa) superficial en partículas funcionalizadas con los residuos de aminoácidos catiónicos presentes en las proteínas ha sido ampliamente utilizada con éxito para inmovilizar proteínas. Un ejemplo de este tipo de adsorción lo representa la inmovilización de quimotripsina sobre partículas de poliestireno carboxiladas [Sandanaraj et al., 2005]. En dicha experiencia se logró confirmar que la proteína adsorbida no había sufrido desnaturalización y el fundamento reportado responsabiliza por esto a la flexibilidad de la cadena polimérica que se adaptaría a la conformación de la proteína permitiendo la interacción sin requerir cambios en la misma. Un aumento en la fuerza iónica del medio, o variaciones en el pH generaron en algunos casos la liberación de la proteína adsorbida. Estos resultados confirman la importancia del control y la optimización de las condiciones del entorno para lograr una adsorción estable y que no altere las propiedades específicas de las proteínas.

Respecto a los distintos grupos que pueden ofrecer similares densidades de carga, en algunos trabajos se lograron apreciar diferencias en cuanto a la adsorción e inmovilización de Anexina 5 en la superficie de micelas poliméricas mediante interacción electrostática entre la proteína y las cargas negativas presentes en la superficie gracias a grupos ácido fosfónico. En este caso el bajo pKa del ácido fosfónico en comparación con el del ácido carboxílico indujo interacciones más fuertes entre la proteína y el polímero [Schmidt et al., 2006].

Al considerar un sistema como las partículas poliméricas como superficie de adsorción para las proteínas, algunos de los factores mencionados en la sección anterior cobran mayor relevancia. En este sentido, el tamaño de las partículas poliméricas puede tener un impacto notable en la adsorción de proteínas al afectar la curvatura de la superficie. Algunos estudios han utilizado polímeros de diferentes tamaños para evaluar la calidad de la adsorción de proteínas. Los resultados indican que dependiendo del tamaño del polímero, se da una diferencia cuantitativa en la adsorción de proteínas en sus superficies, observándose una mayor adsorción en polímeros con tamaños más grandes [Gamucci et al., 2014]. En algunos trabajos se reporta incluso la existencia de cambios conformacionales en las proteínas adsorbidas al superar determinado tamaño de partícula

[Satzler et al., 2016]. Estos cambios conformacionales en algunos casos pueden obstaculizar el proceso de adsorción, en particular, si se trata de proteínas conformacionalmente flexibles [Harvey et al., 2013].

Así, el enfoque de interacción electrostática presenta varias ventajas, como ser relativamente fácil y rápido de llevar a cabo. Además, se puede emplear para una gran gama de proteínas que proporcionan una mayor flexibilidad de diseño y un abanico de aplicaciones muy amplio. Las interacciones electrostáticas también pueden resultar específicas para algunas proteínas seleccionadas debido a la afinidad diferencial por las superficies con determinadas funcionalidades o densidades de carga. El estudio minucioso del comportamiento de adsorción de las proteínas sobre partículas poliméricas es crucial. Por tanto, al momento de iniciar un desarrollo que involucre la interacción entre una cierta superficie polimérica (partículas poliméricas con determinadas propiedades fisicoquímicas) y un cierto tipo de proteína (SLP), es crucial focalizar parte de la investigación en este punto. Dado que al adsorberse la proteína puede perder su funcionalidad, para el desarrollo de este trabajo, será de gran importancia diseñar partículas poliméricas que presenten una adecuada adsorción de las SLP sin afectar su capacidad de actuar como “*bio-template*” para la preparación de nanopartículas metálicas que, posteriormente, presenten actividad catalítica.

## I.5 CATALISIS: CONCEPTOS BASICOS Y REDUCCIÓN ACUOSA DE *p*-NITROFENOL

El desarrollo de nuevos catalizadores sustentables es de gran interés en el área de la catálisis y medio ambiente. La obtención de soportes de origen biológico como las SLP es de un interés sobresaliente, en este sentido, y más aún si se busca diseñar sistemas que permitan darle mayor estabilidad mecánica y robustez, se incluyen como socios de la SLP a los polímeros. Contar con soportes con estas características, que además estén correctamente estudiados, que permitan una preparación sistemática y sencilla proporciona la posibilidad de obtener con cierta facilidad nanopartículas de metales nobles perfectamente dirigidas y controladas con distribución de tamaño acotada. La capacidad de las MNPs de metales nobles son bien conocidas por su amplio uso en catálisis. En este sentido, evaluar la performance catalítica de estos nuevos bionanocatalizadores es ineludible ya que su comportamiento no solo generará conocimientos innovadores y otorgará al área de catálisis nuevos sistemas catalíticos, sino que también permitirá conocer el comportamiento de los sistemas SLP-polímero como directores de la síntesis de MNPs. Esto implicaría que las SLP mantengan su capacidad de actuar como “*bio-template*” aun adsorbidas sobre los diferentes polímeros estudiados. Para poder comprender lo expuesto es necesario tomar conocimiento de las nociones básicas en catálisis por lo cual a continuación se exponen algunos de los conceptos primordiales de los sistemas catalíticos, estudiando más adelante, la reacción de reducción de *p*-nitrofenol.

## I.5.1 Conceptos básicos

Un catalizador es un material que produce un aumento en la velocidad de una reacción química sin que él mismo aparezca en la estequiometría total de la reacción. Esto no significa que el catalizador no participe en la reacción. De hecho, un aspecto esencial de la catálisis es que, al formar especies intermediarias que involucran la superficie del catalizador y los reactivos en cuestión, el catalizador proporciona una ruta alternativa energéticamente más favorable para la reacción en cuestión. Debido a que el catalizador no se consume en el proceso, cada molécula o sitio activo de catalizador puede participar en muchos ciclos consecutivos, por lo que solo se necesita una pequeña cantidad de catalizador en relación con el sustrato.

Hay muchos tipos diferentes de catalizadores que van desde el medio ácido ( $H^+$ ), ácidos de Lewis, complejos organometálicos, polímeros orgánicos e inorgánicos, hasta llegar a las enzimas. Para simplificar la conceptualización, se puede dividir la catálisis en tres categorías: catálisis homogénea, catálisis heterogénea y biocatálisis. Cabe destacar que la distinción entre "catálisis heterogénea" y "catálisis homogénea" o "biocatálisis" es subjetiva. Una enzima típica es mucho más grande que su sustrato, y el entorno de reacción que presenta es tan diferente del solvente que la rodea, que califica como un "catalizador heterogéneo". De manera similar, existen catalizadores en dispersión (p. ej., nanopartículas metálicas estabilizadas con surfactante [Thathagar et al., 2002] que se encuentran en el límite entre los sistemas "homogéneos" y "heterogéneos". Las principales ventajas de la catálisis es que permite obtener el producto deseado más rápido, utilizando menos recursos y generando menos residuos. El catalizador abre una ruta selectiva hacia el producto deseado. La definición de catálisis dada anteriormente no excluye la posibilidad de que haya un cambio físico en el catalizador durante su uso. Además, también puede sinterizarse o envenenarse por los reactivos, productos o por impurezas presentes en los reactivos. Por lo tanto, se puede concluir en que el catalizador participa en la reacción, formando intermediarios que proporcionan una ruta alternativa energéticamente más favorable para el proceso que se cataliza, pero que el catalizador en sí mismo no es consumido en la reacción. En este punto también es necesario destacar otros dos aspectos importantes de la catálisis. Primero, que el catalizador no tiene efecto sobre la composición química de las especies involucradas en la reacción. Es decir, el producto formado en la reacción es el mismo producto que se habría formado en ausencia de un catalizador, aunque si no hubiera catalizador presente, la reacción ocurriría muy lentamente bajo las condiciones requeridas para la reacción catalítica. En otras palabras, aunque el catalizador afecta la cinética de la reacción, no tiene efecto sobre la situación termodinámica. Por otro lado, el catalizador puede causar un cambio significativo en la composición de los productos obtenidos en una reacción; en otras palabras, puede provocar un cambio significativo en la selectividad de la reacción.

En la catálisis heterogénea el catalizador está presente en la reacción en una fase diferente a la de los reactivos. Las superficies de los catalizadores no son uniformes como nos gusta pensar. A nivel microscópico, la superficie de un cristal metálico tiene varias imperfecciones. Sorprendentemente, frecuentemente es precisamente en estos puntos irregulares (bordes, esquinas y facetas del cristal) donde ocurre la catálisis. Esto se debe a

que los átomos de la superficie en esos puntos no están completamente coordinados y, por lo tanto, tienen más opciones para interactuar con las moléculas del sustrato. Estos puntos son los denominados sitios activos, en los que los reactivos deben adsorberse, para después de la reacción abandonar el sitio. Idealmente, los sitios activos deberían ser todos idénticos y aislados entre sí. En este sentido, las reacciones catalizadas por partículas metálicas son sensibles a la estructura del catalizador. Por lo que es posible relacionar el impacto del tamaño de las nanopartículas metálicas soportadas en su reactividad catalítica [Che & Bennett, 1989]. Las nuevas técnicas de síntesis de materiales permiten preparar partículas metálicas con una distribución de tamaño muy estrecha. Átomos individuales soportados, grupos metálicos y nanopartículas metálicas por encima de 1 nm, difieren en las estructuras electrónicas debido al tamaño de las partículas. Para nanopartículas metálicas más grandes (>2 nm), se formará un nivel de energía continuo [Buceta et al., 2014]. Por otro lado, cuando el tamaño de las partículas alcanza la región de los cúmulos (menos de 20 átomos), las estructuras geométricas de esos cúmulos son bastante flexibles y pueden verse fuertemente afectadas por el entorno. Un grupo de metales con atomicidad específica puede tener varias configuraciones geométricas posibles, que dependen del soporte, y las condiciones de reacción, lo que afecta al proceso catalítico y, por tanto, su actividad y selectividad.

Los sistemas catalíticos de metales soportados son muy complejos y por esto dilucidar el mecanismo fundamental subyacente es complejo también. Con este propósito, la interacción metal-soporte ha sido estudiada mediante técnicas de ciencia de superficies para comprender las estructuras y propiedades de las especies metálicas soportadas a nivel atómico. Cuando las especies de metal se depositan sobre un soporte sólido, se puede esperar que sus ubicaciones estén relacionadas con la estructura superficial local del soporte. Además, uno de los roles importantes del soporte es estabilizar las especies metálicas. El desarrollo de nuevos soportes capaces de dirigir y orientar la síntesis de nanopartículas metálicas de distribución de tamaño adecuado abre un nuevo camino hacia el conocimiento sobre el comportamiento de estos sistemas como catalizadores. Varias son las características básicas que se espera que cumplan los nuevos materiales nanoestructurados para que tengan la capacidad de funcionar como catalizadores. A continuación se listan algunas características fundamentales de un buen catalizador:

- El catalizador debe exhibir una buena selectividad para la producción de los productos deseados y minimizar la producción de subproductos indeseables.
- El catalizador debe alcanzar velocidades de reacción adecuadas en las condiciones de reacción deseadas del proceso (recordando que conseguir una buena selectividad suele ser más importante que lograr una alta actividad catalítica).
- El catalizador debe mostrar un rendimiento estable en las condiciones de reacción por largos periodos de tiempo, o debe poder ser regenerado mediante un tratamiento adecuado.
- El catalizador debe tener buena accesibilidad de los reactivos y productos a los sitios activos de tal manera que pueden lograrse altas tasas de conversión.

Los tres primeros atributos claves de un buen catalizador están influenciados principalmente por las interacciones entre la superficie metálica del catalizador y los reactivos, productos e intermediarios del proceso catalítico.

A lo largo del tiempo y con el propósito de evaluar el desempeño de distintos sistemas catalíticos se han seleccionado reacciones cuyas propiedades permiten su empleo como test catalíticos. Una de ellas es la reacción de reducción acuosa de *p*-nitrofenol a temperatura y presión ambiental.

### I.5.2 Reducción acuosa de *p*-nitrofenol

Los isómeros 2, 3 y 4-nitrofenol son contaminantes comunes en las aguas residuales procedentes de vertidos industriales. Su elevada toxicidad hace que las concentraciones máximas de estos compuestos estén reguladas, debido a que su biodegradabilidad por técnicas convencionales es lenta.

La contaminación del agua por el fenol y compuestos fenólicos es de gran preocupación ya que se producen toneladas de estos contaminantes a nivel mundial. Más particularmente, los nitroarenos y sus derivados son generados en los procesos de producción de plaguicidas, herbicidas, insecticidas y tintes sintéticos, como así también en las industrias farmacéutica, petroquímica, de disolventes orgánicos y de explosivos [Vincent et al., 2003]. Estos nitroarenos son altamente peligrosos al liberarse en el medio ambiente ya que poseen una toxicidad potencial para los humanos, los animales y las plantas. Entre ellos, el *p*-nitrofenol (*p*-NP) ha sido clasificado como un contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) y categorizado como uno de los principales contaminantes orgánicos de entre los 114 más importantes [Lai et al., 2011], debido a que el mismo es estable en el ambiente y resiste la biodegradación. Teniendo en cuenta su elevada producción industrial y la potencial contaminación ambiental el *p*-NP es considerado el más contaminante de los mononitrofenoles siendo extremadamente tóxico y teniendo la peligrosa capacidad de bioacumularse en la cadena alimentaria [Herrera-Melián et al., 2012]. En adición, la Comunidad Europea a través de la directiva 80/778/EEC establece el valor específico de 0,5 µg/l de fenoles totales como máxima concentración admisible en agua para consumo humano, o 0,1 µg/l para cada fenol individual [Pocurull et al., 1996].

Se han desarrollado varios procesos para recuperar los nitroarenos contaminantes desde soluciones diluidas y evitar su descarga en el medio ambiente. Entre los varios métodos conocidos actualmente se encuentran los físicos, químicos y biológicos para el tratamiento de aguas residuales, actualmente la adsorción es el proceso más utilizado. La mayor parte del trabajo se ha realizado empleando carbón activado y negro de carbón, sin embargo, el elevado costo de estos adsorbentes ha dirigido la investigación hacia adsorbentes no convencionales más económicos y fácilmente obtenibles, como el aserrín carbonizado [Chern, & Chien, 2002].

La principal desventaja de estos procesos de fisorción está relacionada a la dificultad de regenerar y reciclar el adsorbente después de la saturación, y a que la técnica finalmente consiste en una transferencia unidireccional del contaminante desde un medio disperso a una fase concentrada [Vincent et al., 2003].

La descomposición completa de este contaminante representaría un proceso adecuado para la protección del medio ambiente. Varios procesos alternativos se han

estudiado con el objetivo de alcanzar la degradación completa de compuestos derivados del nitrofenol tales como la degradación biológica [Arcangeli & Arvin, 1995], y química [Adams et al., 1997; Goi & Trapido, 2002] o la oxidación fotoquímica [Chen & Ray, 1998; Andreozzi et al., 2000]. Su lenta degradación y parcial descomposición es realmente preocupante, y hace que el sistema científico e industrial estudie nuevas técnicas con mayores eficiencias que los procesos convencionales. Dentro de este grupo de nuevos procesos se encuentra la transformación de este contaminante por catálisis heterogénea. Bajo la óptica de la protección ambiental, es altamente deseable desarrollar una tecnología ecológicamente compatible para tratar dichos compuestos en un medio acuoso.

El mencionado proceso catalítico podría llevarse a cabo en sistemas homogéneos, sin embargo, en el caso de catalizadores costosos como los que involucran metales preciosos es crucial poder recuperar los metales al final de la reacción [Blaser, 2001]. Por esta razón, los catalizadores soportados resultan ser los mejores candidatos para la remoción del *p*-nitrofenol. Diversas nanopartículas metálicas tales como Ag, Au, Cu, Pt y Pd estabilizadas por diferentes sustratos como dendrímeros, polielectrolitos, células biológicas, etc., se han utilizado como catalizadores en reacciones similares [Hayakawa et al., 2003]. Sin embargo, existen algunas dificultades respecto a la estabilidad de las nanopartículas debido a que la adición de NaBH<sub>4</sub> destruye la estabilidad coloidal, causando la agregación y desactivación del rendimiento catalítico [Biella et al., 2003]. Se ha reportado que nanopartículas de Pd, Pt, Rh, Ru, Au y Ni soportadas sobre diferentes soportes (titania, sílice, óxido de hierro, carbono) poseen una alta actividad catalítica en reacciones de hidrogenación varias [Corma & Serna, 2006; Manzer, 2004; Ruppert et al., 2015; van Ryneveld et al., 2011; Liu et al., 2018; Jacinto et al., 2008]. Las nanopartículas de Au, Ag, Pt y Re han llamado mucho la atención como catalizadores por la rápida reducción de nitroarenos y colorantes en medio acuoso [Fu & Viraraghavan, 2001; Gangula et al., 2011].

Queslati y col. (2020) encontraron una ruta de síntesis ecológica de AuNP que exhibieron una excelente actividad catalítica en la reducción de *p*-NP, siendo esta dependiente del tamaño de la nanopartícula. Se han reportado también nanopartículas de Pt y Ag soportadas sobre SLPs con excelente eficiencia catalítica frente a la reacción de reducción de *p*-nitrofenol [Bolla et al., 2020a y Bolla et al., 2020b].

A su vez, se han reportado métodos para la hidrogenación catalítica industrial de *p*-nitrofenol en disolventes como etanol a temperatura y presión relativamente altas, en presencia de catalizadores metálicos como Pt y Ru [Du et al., 2004]. Por otro lado, se utilizaron catalizadores soportados basados en Co, Cu, Pd y Ni. Los últimos dos requieren de la adición de inhibidores para prevenir la hidrogenación del anillo bencénico como consecuencia de la gran actividad que poseen [Downing et al., 1997].

La reducción catalítica de *p*-nitrofenol es una reacción muy utilizada para estudiar la performance catalítica de las nanopartículas metálicas soportadas o coloidales [Hervés et al., 2012]. Esta reacción se puede seguir fácilmente por espectroscopia UV-visible dado que el *p*-NP se encuentra como *p*-nitrofenolato en el medio de reacción, el cual presenta un pico absorción intenso a la longitud de onda de 400 nm. Esta reacción de reducción es una reacción de pseudo-primer orden por lo que es sencillo realizar un seguimiento de conversión y calcular la constante de velocidad correspondiente.

El mecanismo propuesto para la reacción de reducción acuosa del *p*-nitrofenol sigue el modelo clásico de Langmuir-Hinshelwood en el cual dos átomos o moléculas previamente adsorbidas en la superficie del catalizador reaccionan entre sí para luego desorberse el producto generado [Irvine, 2011]. En esta reacción un átomo de hidrógeno proveniente del borhidruro de sodio es quimisorbido sobre la superficie al mismo tiempo que el ion *p*-nitrofenolato (*p*-Npa) mediante un mecanismo reversible (figura I.11). Estas dos especies quimisorbidas reaccionan entre sí para obtener *p*-aminofenol que se desorbe rápidamente. Dado que la difusión de los reactivos y el proceso de adsorción-desorción son rápidos el paso determinante de la velocidad es la reducción superficial del *p*-Npa [Liu & Li, 2009; G. Guella et al., 2007]. Si el *p*-AP se adsorbiera fuertemente sobre la superficie del catalizador tendría una marcada influencia en la cinética de reacción. Este fenómeno sería aún más evidente a medida que aumente la concentración superficial de producto. Ante una adsorción irreversible del *p*-AP la velocidad de reacción y la conversión disminuirían por el bloqueo de sitios activos [Gu et al., 2014].

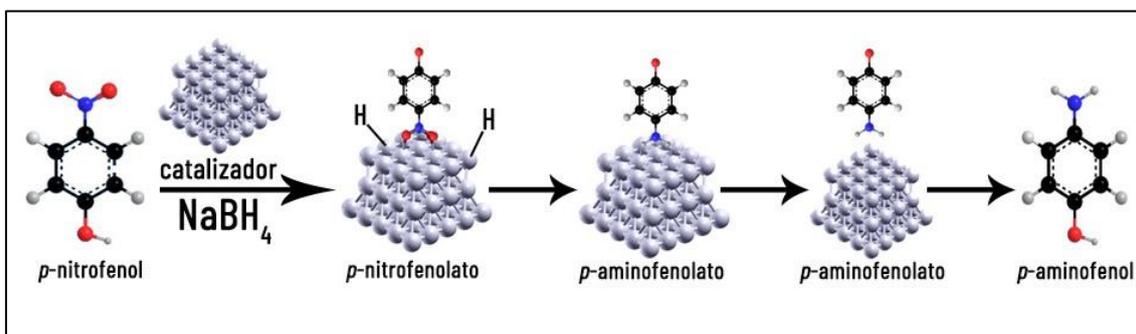
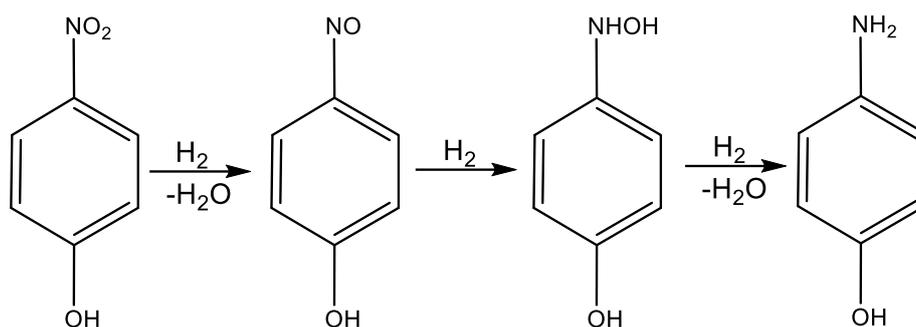


Figura I.11 Representación de la reacción de reducción de *p*-NP a *p*-AP en presencia de catalizador.

En algunos trabajos se ha reportado un período de inducción en la reacción. Este período es atribuido al tiempo de difusión requerido para que los reactivos lleguen desde el seno de la solución sobre la superficie del catalizador [Sarkar et al., 2011; Zeng et al., 2010].

Por otro lado, en algunos trabajos se ha probado la presencia de intermediarios de reacción tanto inestables como estables, tal es el caso del 4-nitrosfenol y el 4 hidroxilaminofenol, respectivamente. El mecanismo de reacción postulado en estos casos implica dos pasos como se puede observar en el esquema I.4. En primer lugar, la obtención del intermediario inestable cuya rápida reducción genera el intermediario estable culminando el primer paso, y un paso posterior de reducción del intermediario 4-hidroxilaminofenol para obtener el producto final de reacción conformando el paso limitante de la velocidad de reacción [Gu et al., 2014].



Esquema I.4 Mecanismo de reacción de reducción de *p*-nitrofenol en dos pasos

En este marco, y como se ha mencionado a lo largo de la introducción, todavía quedan aspectos por profundizar en el estudio de nuevos nanomateriales basados en MNPs, en particular orientados al desarrollo de soportes innovadores que permitan conducir a la obtención de catalizadores basados en nanopartículas de metales nobles más eficientes para, por ejemplo, el tratamiento de contaminantes en cursos de agua.

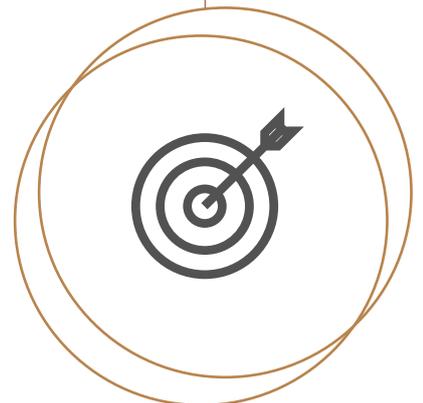
# II

---

## *Capítulo 11*

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a lo expuesto en el capítulo introductorio, la **hipótesis** de este trabajo es que la adecuada combinación de partículas poliméricas con proteínas de capa-S permite el diseño de nuevos sistemas polímero-proteína que pueden actuar como “*bio-template*” y soporte, dirigiendo y estabilizando la síntesis de nanopartículas de metales nobles. Las características del nuevo sistema nanoestructurado obtenido posibilitará su empleo como nanobiocatalizadores, evitando la agregación de las nanopartículas metálicas y permitiendo un mejor desempeño catalítico gracias a la acción sinérgica de cada componente

Para comprobar la misma, se propuso como **objetivo general** preparar y caracterizar arreglos metálicos nanoestructurados con potenciales aplicaciones en el campo de la catálisis, constituidos por nanopartículas metálicas soportadas sobre sistemas partícula polimérica-proteínas de capa-S.

Con el fin de alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Sintetizar nanopartículas poliméricas (acrílicas y poliuretánicas) con propiedades específicas para adsorción de proteínas de capa-S
2. Aislar y caracterizar proteínas de capa-S de dos cepas de *Lactobacillus kefir*.
3. Obtener nanosistemas compuestos partícula-proteína, mediante la adecuada combinación de los materiales.
4. Caracterizar los sistemas preparados para evaluar su morfología y sus propiedades superficiales (naturaleza química, densidad de carga) en función de la composición de los materiales.
5. Preparar y caracterizar catalizadores heterogéneos obtenidos por reducción/depósito de sales de Pt y Ag sobre los sistemas polímero/proteínas de capa-S.
6. Evaluar su desempeño como catalizadores en reacciones de hidrogenación.

# III

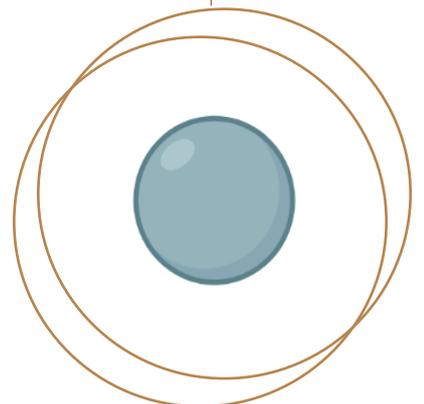
---

*Capítulo III*

---

## SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS POLIMÉRICAS

---



En el presente capítulo se describe el proceso de síntesis de las distintas dispersiones poliméricas obtenidos en esta tesis. Se presenta y discute también la caracterización superficial y morfológica de los mismos haciendo hincapié en las propiedades que serán determinantes en el comportamiento de adsorción de las proteínas de capa-S.

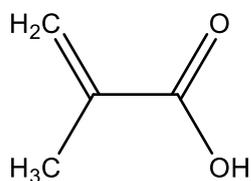
### III. SÍNTESIS DE LAS PARTÍCULAS POLIMÉRICAS

#### III.1 INTRODUCCIÓN

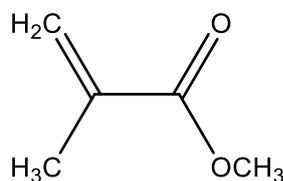
##### III.1.1 Síntesis de las dispersiones acrílicas

Se propuso la obtención, mediante polimerización en emulsión, de tres dispersiones poliméricas acrílicas con distintas propiedades microestructurales. Estos polímeros fueron diseñados con el propósito de obtener partículas diferenciadas, principalmente, por la química y la carga superficial expuesta, lo cual se logró mediante la selección adecuada de los comonómeros. Por otro lado, a través de la adecuada selección de las variables de síntesis, se buscó obtener dispersiones con tamaños de partícula (y distribución) similares. Los aspectos microestructurales mencionados tienen la finalidad de ofrecer a las proteínas de capa-S superficies de diferente naturaleza con el objetivo de analizar su comportamiento de adsorción.

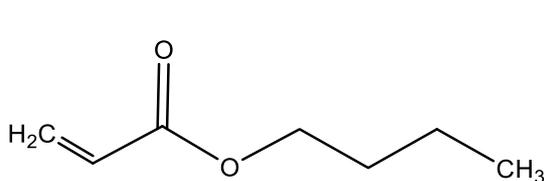
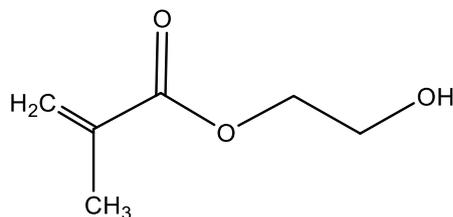
Con el objetivo mencionado previamente se seleccionaron distintos monómeros acrílicos cuyas estructuras se presentan en el esquema III.1. Mientras que mediante el empleo de metacrilato de metilo (MMA) y acrilato de butilo (BuA) se puede producir un polímero con grupos alquílicos pendientes, el reemplazo de una fracción de estos por ácido metacrílico (MA) o metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) permitirá incluir en la cadena grupos pendientes carboxílicos u hidroxilos, respectivamente.



Ácido metacrílico (MA)



Metacrilato de metilo (MMA)

Acrilato de *n*-butilo (BuA)

Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA)

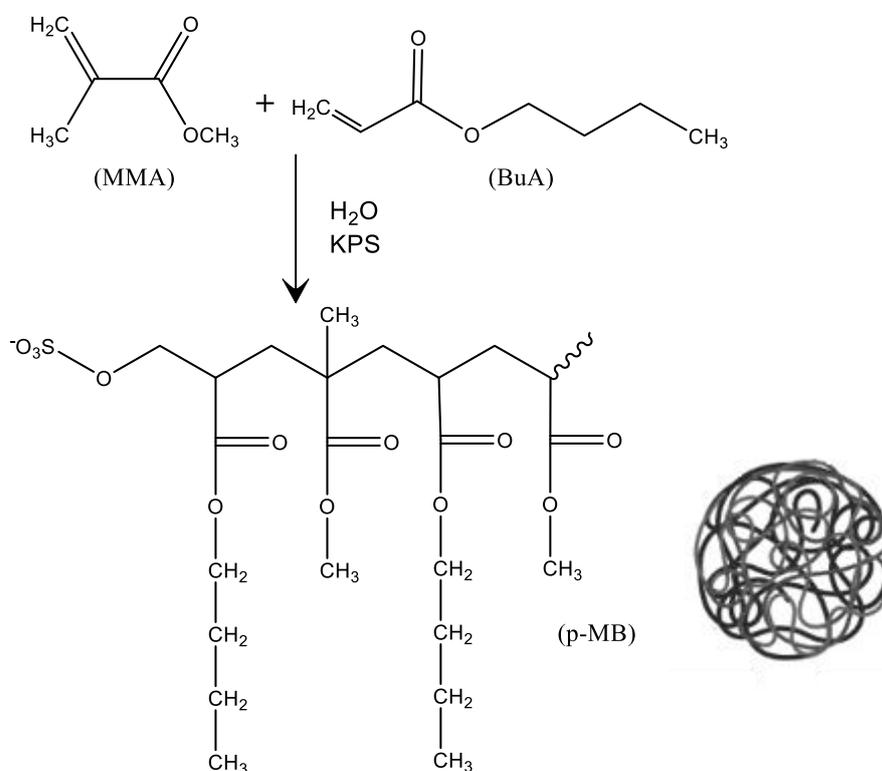
**Esquema III.1** Estructura de los monómeros acrílicos empleados en este trabajo de tesis.

A continuación, se presentarán los sistemas obtenidos mediante polimerización en emulsión junto a un esquema abreviado de su síntesis, la estructura final simplificada del

polímero a obtener y una representación de la química superficial expuesta por la partícula. Cabe destacar que en todos los casos, debido al iniciador a emplear, los sistemas poseerán grupos sulfato en superficie que no serán representados en los esquemas de las partículas.

### Poli(metacrilato de metilo-*co*-acrilato de butilo): p-MB

En el esquema III.2 se presenta de manera esquemática la reacción de obtención de poli(metacrilato de metilo-*co*-acrilato de butilo) (p-MB) junto a una representación de la partícula preparada. Por los monómeros empleados en su síntesis, la principal característica de este polímero es la presencia de cadenas alquílicas de baja polaridad (metilo, butilo). Respecto a la presencia de grupos ionizables, cada partícula de p-MB solo exhibirá en superficie los grupos sulfatos pertenecientes al persulfato de potasio empleado como iniciador.

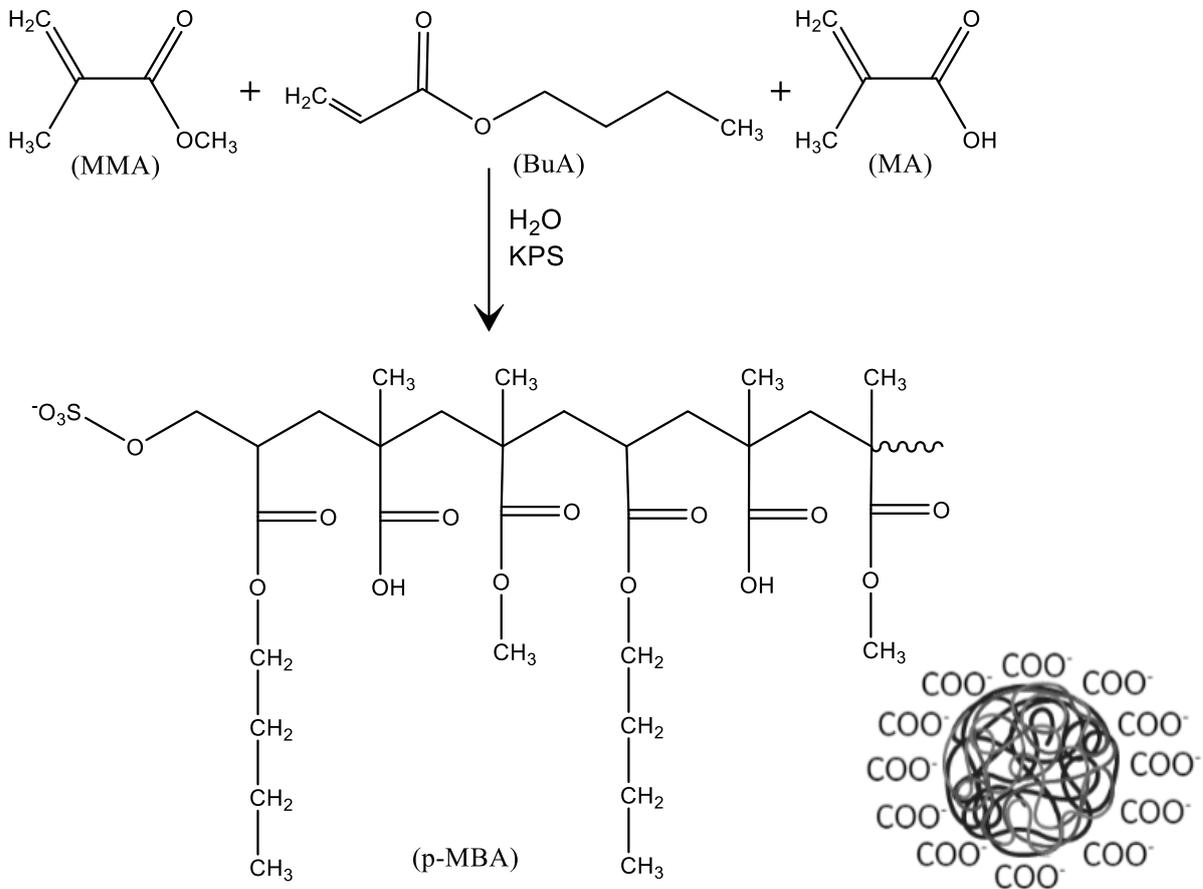


Esquema III.2 Representación esquemática de la síntesis de p-MB por polimerización en emulsión

### Poli(metacrilato de metilo-*co*-acrilato de *n*-butilo-*co*-ácido metacrílico): p-MBA

En este caso, el polímero fue diseñado conteniendo en su formulación los monómeros empleados en la síntesis de la p-MB mencionada anteriormente, reemplazando una fracción de estos por el ácido metacrílico para aportar al sistema la funcionalidad

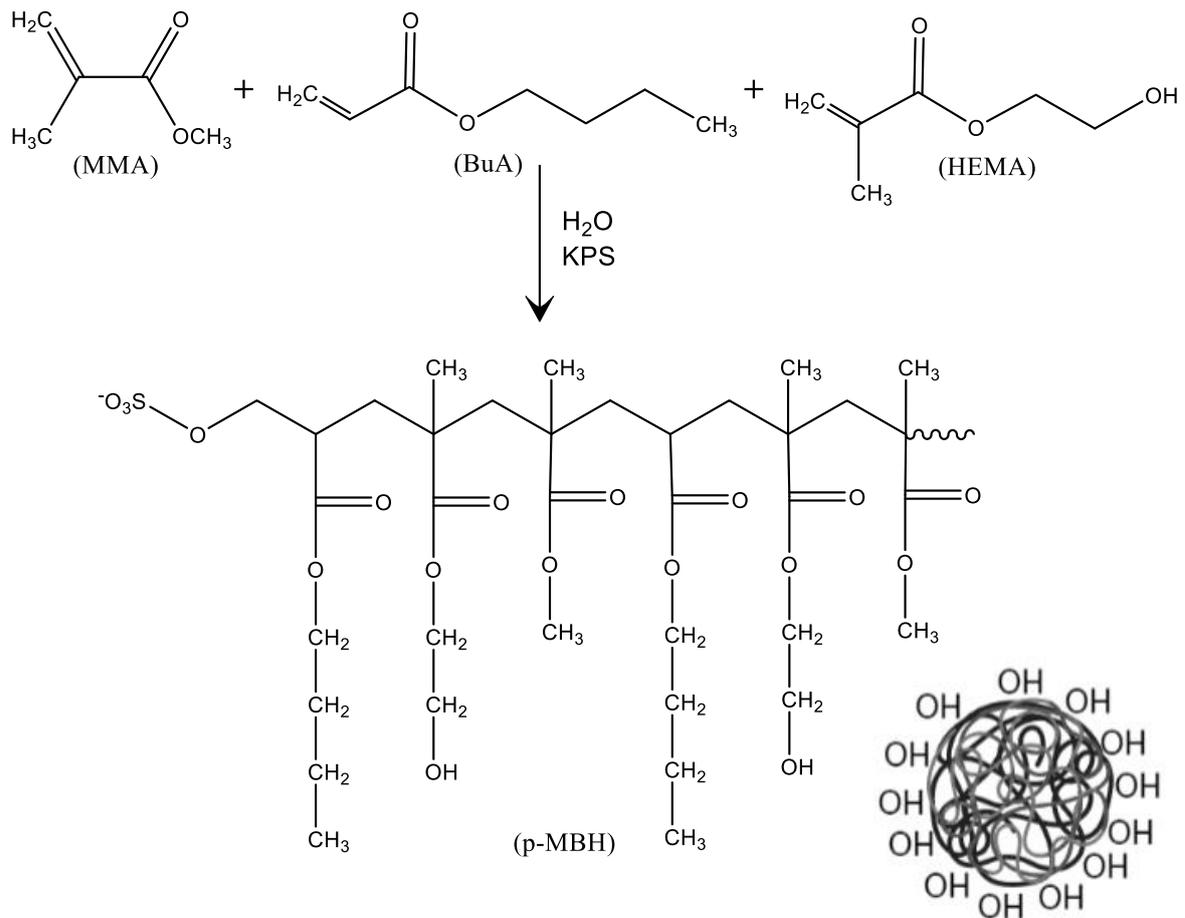
-COOH. Como consecuencia, las partículas exhibirán en superficie dichos grupos, junto a los sulfatos provenientes del iniciador. En el esquema III.3 se presenta la reacción de obtención junto a la representación de la partícula.



Esquema III.3 Representación esquemática de la síntesis de p-MBA por polimerización en emulsión

#### Poli(metacrilato de metilo-*co*-acrilato de butilo-*co*-metacrilato de 2-hidroxietilo): p-MBH

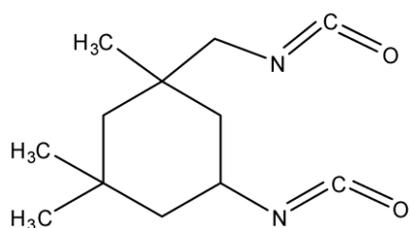
Esta partícula, al igual que la anterior, fue diseñada conteniendo en su formulación los monómeros empleados en la síntesis de p-MB pero incorporando a la formulación el monómero metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). El HEMA, poseedor de grupos -OH, da a esta partícula la cualidad de exponer grupos hidroxilos en superficie (junto a grupos sulfato). El esquema de la partícula y la reacción de obtención del polímero se presenta en el esquema III.4.



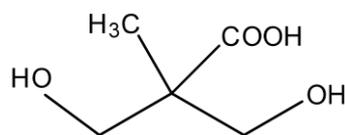
Esquema III.4 . Representación esquemática de la síntesis de p-MBH por polimerización en emulsión

### III.1.2 Síntesis de la dispersión poliuretánica

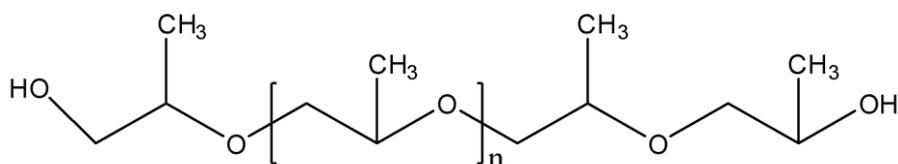
El poliuretano a emplear en este trabajo se obtendrá por el método del prepolímero. Para la síntesis del mismo se empleará poli(propilenglicol) (PPG), diisocianato de isoforona (IPDI) y ácido dimetilol propiónico (DMPA) en el prepolímero. Se utilizará HEMA con el fin de introducir en el mismo dobles enlaces polimerizables, e hidrazina (HZN) como extensor de cadena durante la etapa de dispersión. En el esquema III.5 se presenta la estructura de los monómeros utilizados en la preparación del prepolímero.



Diisocianato de isoforona (IPDI)



Ácido dimetilol propionico (DMPA)



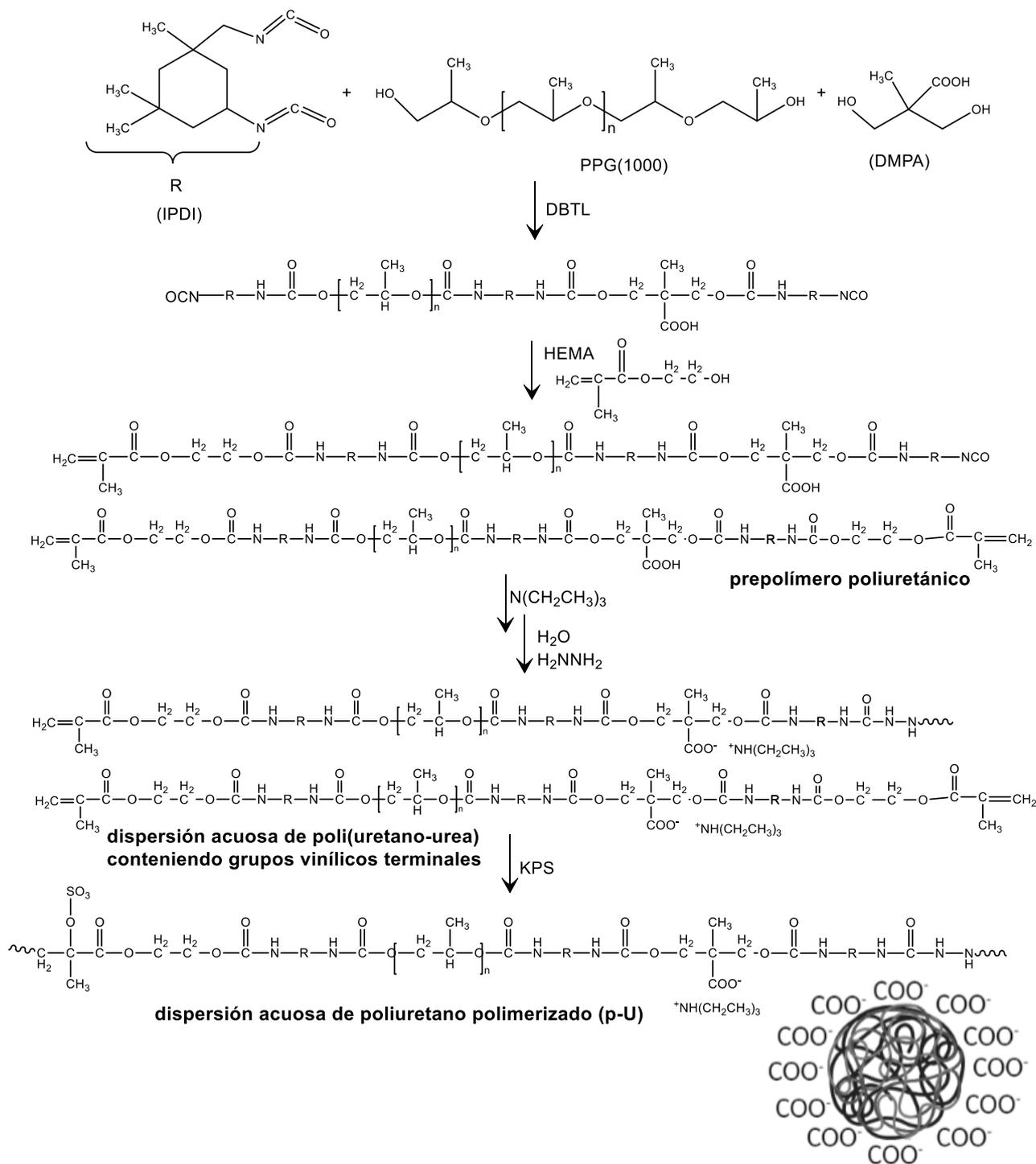
Poli(propilenglicol) (PPG1000)

### Esquema III.5 Estructura de los monómeros empleados en la obtención del poliuretano.

En la síntesis de poliuretanos en base acuosa, uno de los polioles más utilizados es el poli(propilenglicol) de peso molecular 1000 Da (PPG1000). Los poliuretanos a base de poliéteres están caracterizados por una mayor flexibilidad a baja temperatura, alta resistencia a la hidrólisis y mayor biocompatibilidad. El IPDI suele comercializarse como una mezcla 75:25 de los isómeros *cis* y *trans*. Cabe destacar que contiene dos grupos -NCO de diferente naturaleza: uno es primario-alifático, mientras que el otro es secundario-cicloalifático. La estructura cicloalifática no es afectada por la radiación UV, por lo cual los productos derivados de este monómero producen recubrimientos que no se amarillean y con excelente durabilidad. El DMPA fue utilizado para introducir dentro de la cadena grupos funcionales ionizables con el fin de formar el ionómero. El catalizador empleado fue el dibutil dilaurato de estaño (DBTL) el cual junto a otros ácidos de Lewis organometálicos cataliza la reacción entre alcoholes e isocianatos tanto aromáticos como alifáticos. Se utilizó HEMA para introducir dobles enlaces terminales polimerizables, mientras que la HZN fue el agente extensor de cadena empleado cuyos grupos amino reaccionan con los grupos -NCO dando lugar a la generación de enlaces urea. Por esto, el polímero final puede describirse como un poliuretano-urea. Además, gracias a la presencia de los dobles enlaces terminales, se puede someter la dispersión obtenida a una reacción radicalaria posterior, que conduce a la formación de un sistema entrecruzado con mejores propiedades mecánicas. A su vez, como consecuencia de la reacción, ingresarán grupos pertenecientes al iniciador [Delpech, 1996].

En el esquema III.6 se presenta un diagrama resumido de la síntesis, la estructura final y un esquema de la partícula poliuretánica. Estas partículas poliméricas expondrán en superficie grupos carboxilato gracias a la presencia de DMPA en su formulación, como también estarán presentes en superficie los grupos sulfatos provenientes de iniciador utilizado en la última etapa del método de síntesis (KPS). Si bien se espera una superficie

con densidad de carga y presencia de grupos similares al p-MBA, las partículas poliuretánicas y las de p-MBA se diferenciarán en la química ofrecida a las proteínas en cuanto a la naturaleza de sus estructuras poliméricas. Por un lado, p-U posee enlaces uretano-urea, mientras que p-MBA posee enlaces éster de las cadenas pendientes. El estudio del comportamiento de adsorción sobre ambas superficies permitirá analizar la existencia de diferencias debidas a la química de la estructura polimérica.



Esquema III.6 Representación esquemática de la síntesis de poliuretano por el método del prepómero

## III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### III.2.1 Reactivos

A continuación se listan en orden alfabético creciente los reactivos utilizados para la síntesis de las partículas poliméricas. Se indica la procedencia de cada uno de ellos y, en caso de no haberse utilizado el reactivo como fue provisto, se detalla el tratamiento al que se lo sometió.

- Acetona (Cicarelli)
- Ácido Clorhídrico (HCl, Biopack)
- Ácido dimetilolpropiónico (DMPA, Aldrich)
- Ácido Metacrílico (MA, Fluka)
- Acrilato de butilo (BuA, Sigma Aldrich): El monómero se purificó mediante tratamiento con solución de NaOH 10% p/p tres veces, para eliminar el inhibidor y posteriormente se lavó con agua destilada hasta neutralidad en la fase acuosa remanente ante tira de pH. El monómero obtenido se secó con  $\text{CaCl}_2$ .
- Alúmina Básica ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Merk)
- Bromuro de Potasio (KBr, Thermo, grado espectroscópico >99%)
- Dibutilamina (DBA, Anedra)
- Diisocianato de isoforona (IPDI, BAYER)
- Dilaurato de dibutil estaño (DBTDL, Aldrich)
- Dodecil Sulfato de Sodio (SDS, Anedra)
- Hidrazina (HZN, Aldrich)
- Hidróxido de Sodio (NaOH, Merk)
- Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA, Sigma Aldrich): Filtrado en columna de alúmina básica
- Metacrilato de metilo (MMA, Sigma Aldrich): Sometido al mismo tratamiento que BuA
- Nitrógeno gaseoso ( $\text{N}_2$ , AGA)
- Persulfato de potasio (KPS, Anedra): Recristalizado desde agua.
- Poli(propilenglicol) Mw=1000 (PPG1000, Voranol 2110, Dow Chemical S.A.): fue secado a 80 °C y 1-2 mm de Hg antes de ser empleado.
- Trietilamina (TEA, Anedra)

### III.2.2 Obtención de las dispersiones acuosas de partículas acrílicas

La obtención de las dispersiones acrílicas se llevó a cabo en un balón de 250,0 ml de capacidad con 3 bocas, equipadas con agitador mecánico, condensador con trampa de gases, y un sistema diseñado para el burbujeo de Nitrógeno. En la imagen III.1 se presenta el sistema empleado para llevar a cabo las reacciones de síntesis. La temperatura fue controlada mediante el empleo de un baño de glicerina termostatzado con un equipo Büchi-240, empleando un sensor de temperatura digital.

En todos los casos, se procedió en primer lugar a la agitación durante 10 minutos de una solución de SDS en agua. A esta mezcla, se le agregó posteriormente la mezcla de monómeros según la formulación deseada dejándose en agitación bajo flujo de nitrógeno y a una temperatura de 80°C durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo mencionado, se inyectó una solución acuosa del iniciador (un volumen de aproximadamente 10,0 ml previamente degasada bajo flujo de nitrógeno a 2°C y protegido de la luz). La mezcla de reacción se mantuvo a 80°C y con burbujeo constante de nitrógeno por 3 hs en el caso de p-MB y p-MBA, y 5 hs en el caso de p-MBH. Las cantidades empleadas de cada reactivo en la síntesis de las tres dispersiones se detallan en la Tabla III.1. Finalizada la reacción, la mezcla se dejó llegar a temperatura ambiente y las dispersiones obtenidas se dializaron empleando una membrana de celulosa (Sigma Aldrich) de 33mm con *cut off* 14.000 Da contra agua *Milli-Q* para eliminar restos de monómeros residuales, iniciadores, surfactante y otros compuestos solubles en agua. En última instancia se procedió a reservar las dispersiones con un contenido de sólidos aproximado de 5 %p/p en frascos de vidrio color caramelo [González et al., 2007; Peruzzo et al, 2009].

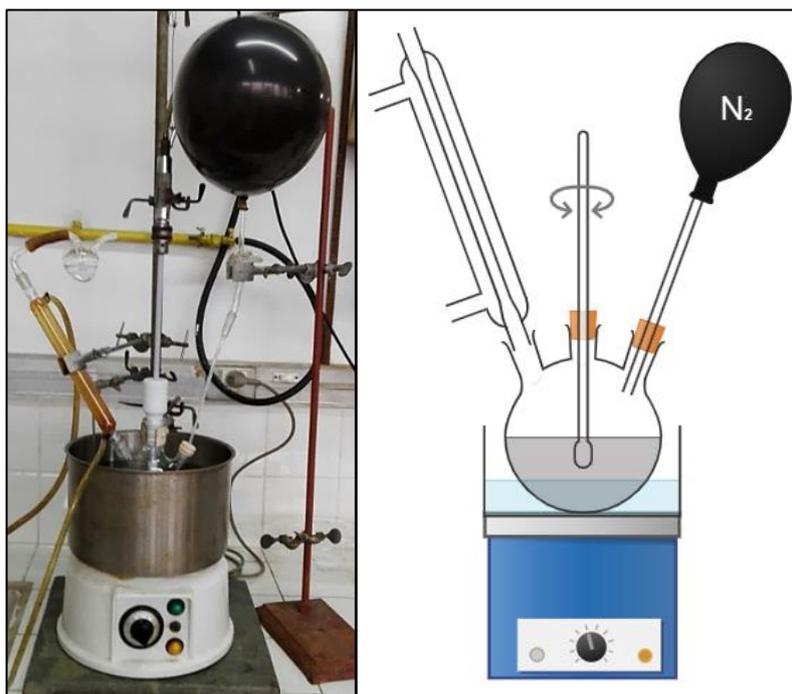


Imagen III.1 Imagen y esquema del reactor empleado en la síntesis de las dispersiones poliméricas.

**Tabla III.1.** Formulación de las dispersiones poliméricas sintetizadas (cantidades expresadas en gramos)

	p-MB	p-MBH	p-MBA
Agua	69,33	69,33	69,33
SDS	0,60	0,60	0,60
KPS	0,05	0,05	0,05
MMA	13,44	13,13	13,13
BuA	16,58	16,27	16,27
MA	-	-	0,62
HEMA	-	0,62	-

### III.2.3 Obtención de dispersión acuosa de partículas de poliuretano

En el reactor que se describió previamente, se colocaron el PPG1000 y el DMPA, la mezcla se calentó a 98 °C manteniendo agitación continua y burbujeo de nitrógeno durante media hora. Transcurrido ese tiempo, se ajustó la temperatura a 90 °C y se adicionó el IPDI con el DBTDL. La mezcla de reacción se mantuvo en esas condiciones durante 140 minutos. Transcurrido ese tiempo la temperatura del reactor se llevó a 45 °C y posteriormente se adicionó gota a gota HEMA (disuelto en acetona). El sistema se dejó reaccionar durante 90 minutos y posteriormente se llevó la temperatura a 60 °C manteniendo las condiciones por 50 minutos. En esta instancia culmina la obtención del prepolímero. A continuación la temperatura de la mezcla de reacción se ajustó a 55 °C, se adicionó lentamente TEA (en acetona) y se dejó reaccionar durante 50 minutos (neutralización de los grupos carboxílicos). Finalizada la reacción se permitió al sistema alcanzar la temperatura ambiente. El prepolímero neutralizado se dispersó sobre agua conteniendo la cantidad adecuada de HZN para realizar la reacción de extensión de cadena, obteniéndose así una dispersión acuosa de poliuretano-urea con dobles enlaces terminales. La dispersión se realizó con agitación mecánica (300 rpm).

Por último, la dispersión poliuretánica conteniendo grupos vinílicos terminales se sometió a una polimerización en dispersión mediante el agregado de KPS para obtener una dispersión de poliuretano polimerizada (p-U). Para ello, se colocó la dispersión obtenida en el paso anterior en un reactor provisto de agitador mecánico, refrigerante con trampa para gases y sistema para burbujeo de N<sub>2</sub>. El sistema se desgasó durante 40 minutos mientras se llevó la temperatura de la mezcla hasta 80 °C. Posteriormente se adicionó una solución de KPS en agua (0,015 % p/p de iniciador respecto del contenido de HEMA), previamente desgasada. El sistema se dejó reaccionar durante tres horas. Concluido el tiempo de reacción la mezcla se llevó a temperatura ambiente, se filtró, dializó y reservó en frasco de

vidrio color caramelo. En la Tabla III.2 se presentan la formulación utilizada para la preparación del poliuretano (p-U) [Peruzzo et al., 2010; Peruzzo et al., 2012].

**Tabla III.2.** Formulación de la dispersión acuosa poliuretánica sintetizada (cantidades expresadas en gramos)

p-U	IPDI	PPG 1000	DMPA	HEMA	DBTDL	TEA	HZN	Agua
	11,99	13,85	1,39	1,19	0,04	1,05	0,54	69,94

## III.2.4 Caracterización de las dispersiones poliméricas

### III.2.4.1 Contenido de sólidos

La porción no volátil, sólida, presente en una dispersión puede determinarse por evaporación del solvente y otros componentes volátiles presentes en la dispersión. El contenido de sólidos se determinó gravimétricamente, colocando aproximadamente 1,00 g de dispersión (m) en una cápsula de papel aluminio (de masa  $m_c$ ), la cual posteriormente se colocó en estufa a 100 °C hasta obtener peso constante ( $m_f$ ). El contenido de sólidos se calculó según:

$$\% \text{ sólidos} = \frac{m_f - m}{m_c - m} 100 \quad \text{Ecuación III.1}$$

### III.2.4.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El radio hidrodinámico de las partículas poliméricas se determinó empleando la técnica de dispersión de luz dinámica. Mediante DLS pueden medirse las variaciones en el tiempo de las fluctuaciones en la intensidad de dispersión presentadas por muestras muy diluidas de partículas. La intensidad de las fluctuaciones temporales está relacionada con el movimiento browniano de las partículas ya que la interferencia de la dispersión de las ondas de luz depende de las posiciones de las partículas entre sí. Las nanopartículas dispersas, dispersarán la luz incidente proporcionalmente a la sexta potencia de sus radios. Debido a que los fundamentos de la técnica se basan en la medida de intensidad de luz dispersada, el radio hidrodinámico debe deducirse empleando este parámetro [Bhattacharjee, 2016] como se observa en la siguiente ecuación para el diámetro hidrodinámico ponderado por intensidad de dispersión ( $d_{ip}$ ):

$$d_{ip} = \frac{\sum(n_i d_i I_i)}{\sum(n_i I_i)} \quad \text{Ecuación III.2}$$

donde  $I_i$  es la intensidad de la luz dispersada por  $n_i$  partículas de diámetro  $d_i$ .

Las medidas de las dispersiones poliméricas, se realizaron a 25 °C sobre una dilución adecuada de la muestra en agua Milli-Q, empleando un equipo Zetasizer Nano (Nano ZSizer-ZEN3600, Malvern, U.K.).

### III.2.4.3 Potencial Z

El potencial Z, también denominado potencial electrocinético, es el potencial eléctrico en el plano de corte (*“slipping plane”*) de la doble capa interfacial (EDL) en relación con un punto en el seno del solvente. En otras palabras, el potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido adherida a la partícula dispersa. El potencial eléctrico de una superficie es la cantidad de trabajo que necesita para traer una unidad de carga positiva desde el infinito hasta la superficie en cuestión, sin ninguna aceleración.

Cuando el espesor de la EDL es mucho menor que el radio de las partículas, el valor de  $f(K_a)$ , la función de Henry que depende de los parámetros de Debye-Hückel y el radio de la partícula, se acepta como igual a 1,5 y la ecuación de Henry:

$$\mu_e = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta f(K_a)}{3\eta} \quad \text{Ecuación III.3}$$

se modifica a la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski relacionando la movilidad electroforética con el potencial Z según:

$$\mu_e = \frac{\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta}{\eta} \quad \text{Ecuación III.4}$$

donde  $\varepsilon_r$  es la permitividad relativa del medio o la constante dieléctrica del medio,  $\varepsilon_0$  representa la permitividad en el vacío,  $\zeta$  es el potencial Z,  $\mu_e$  la movilidad electroforética de las partículas y  $\eta$ , la viscosidad del medio a la temperatura experimental [Bhattacharjee, 2016].

Las medidas de las dispersiones poliméricas se realizaron a 25 °C sobre una dilución adecuada de la muestra en agua *Milli-Q*, empleando un equipo Zetasizer Nano (Nano ZSizer-ZEN3600, Malvern, U.K.).

### III.2.4.4 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los análisis se llevaron a cabo en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (Thermo, NICOLET Avatar 370 DTGS) equipado con un accesorio para Reflectancia Difusa (DRIFT-Smart Collector). El mismo fue operado desde una PC mediante el software EzOMNIC (Versión 7.4.0.127).

Las dispersiones poliméricas 1 %p/p fueron liofilizadas en un equipo HINOTEK, modelo 10 N-O y el sólido obtenido se combinó con Bromuro de Potasio de grado espectroscópico previo a la recolección del espectro. Se adquirieron 64 barridos por análisis con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### III.2.4.5 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

La dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) es una herramienta importante cuando se estudia el tamaño y morfología de diversos sistemas dispersos, ya que a través de la misma se puede obtener información sobre el tamaño, la morfología y la estructura interna de las partículas [Zelikin et al., 2010; Minelli et al., 2014]. En esta técnica, se registra a bajos ángulos (típicamente de  $0.1$  a  $10^\circ$ ) la dispersión elástica de rayos X por una muestra que tiene variaciones en la densidad electrónica a escala nanométrica. La dispersión en ese rango de ángulos contiene información sobre el tamaño y forma de macromoléculas, distancias características de materiales parcialmente ordenados, tamaños de poros y otra información en el rango de los nm.

Si consideramos un sistema con  $N$  centros dispersores de determinada forma y estructura (en nuestro caso una partícula), tal que la posición de estos está relacionada entre sí, la intensidad de la dispersión se describe como

$$I(q) \propto P(q)S(q) \quad \text{Ecuación III.5}$$

donde  $P(q)$  es el factor de forma y  $S(q)$  es el factor de estructura, y  $q$  es el vector de *scattering*. El factor de forma contiene información sobre el tamaño y la forma de las partículas individuales, mientras que el factor de estructura incluye contribuciones de interacciones entre partículas vecinas. El vector de *scattering* se define como la diferencia entre el vector de onda de la radiación dispersada menos el vector de onda de la radiación incidente ( $q = \vec{k}' - \vec{k}$ ), y su módulo se expresa como

$$|q| = \frac{4\pi \text{sen}(\theta)}{\lambda} \quad \text{Ecuación III.6}$$

donde  $\theta$  es el ángulo de dispersión y  $\lambda$  la longitud de onda de los rayos X. Se observará una interferencia constructiva si existe algún tipo de periodicidad en los elementos constitutivos de la muestra [Glatter & Kratky, 1983]. En caso de sistemas diluidos, los centros de dispersión no mantienen una posición relacionada entre sí, por lo que la expresión de la intensidad puede reducirse a  $I(q) \propto P(q)$ . Mediante el análisis del comportamiento de la intensidad de dispersión en función del vector de onda ( $q$ ) se puede obtener información estructural sobre la muestra, como por ejemplo el tamaño, la morfología, la estructura interna y la interacción entre partículas, dependiendo de las características de la muestra y las condiciones de trabajo.

En este trabajo, las medidas de SAXS de las muestras se realizaron en la línea de luz D02A-SAXS2 en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS, Campinas, SP, Brasil), utilizando un haz de rayos X monocromático con una longitud de onda,  $\lambda = 1,544 \text{ \AA}$ , con una distancia muestra-detector de  $3061,3 \text{ mm}$  ( $q$  entre  $0,04$  a  $1,45 \text{ nm}^{-1}$ ), con un tiempo de exposición de  $300$  segundos a  $25^\circ\text{C}$ . Para las medidas, las dispersiones se colocaron dentro de una cámara entre dos láminas de mica sobre la que se hizo pasar el haz de rayos X. Los espectros de dispersión se recogieron en un detector marCCD. Las intensidades experimentales medidas fueron corregidas por la contribución de los solventes empleados y la celda vacía, y las curvas unidimensionales se obtuvieron integrando las imágenes bidimensionales.

Los datos experimentales se analizaron utilizando los algoritmos de ajuste ofrecidos por el software SasView [Doucet et al. 2021], se empleó el factor de forma *HardSphere* para el modelado de los mismos.

### III.2.4.6 Titulaciones Conductimétricas

Las titulaciones conductimétricas de las dispersiones acuosas de polímero se llevaron a cabo por duplicado, a 25 ° C empleando un conductímetro (ADWA AD8000 equipado con celda de conductividad AD76309). A fin de realizar la titulación conductimétrica, a una dispersión acuosa de 3,5 g de la muestra de una dispersión acuosa de la muestra (aproximadamente 15% en peso de contenido sólido), se añadieron 5,00 ml de HCl 0,1109 N , y luego se tituló con NaOH 0,0849 N en agitación. Las lecturas de la conductancia de la dispersión durante la titulación se tomaron 1 minuto después de cada adición de la solución de NaOH deteniendo la agitación [Casu & Gennaro, 1975; Gonzalez et al., 2008].

Las densidades de carga superficial debidas a la presencia de los grupos sulfato, y carboxilato,  $\delta_{SO_4^-}$ ,  $\delta_{COO^-}$  respectivamente (mEq/cm<sup>2</sup>), pueden calcularse empleando las ecuaciones siguientes:

$$\delta_{SO_4^-} = \frac{Vol_{NaOH,SO_4^-} N_{NaOH}}{A_p} \quad \text{Ecuación III.7}$$

$$\delta_{COO^-} = \frac{Vol_{NaOH,COO^-} N_{NaOH}}{A_p} \quad \text{Ecuación III.8}$$

donde  $Vol_{NaOH,COO^-}$  es el volumen del punto del punto de equivalencia,  $N_{NaOH}$  es la concentración normal de la solución titulante (0,0849 mEq/ml);  $A_p$  es la superficie total de las partículas, en cm<sup>2</sup>; el área de la partícula ( $A_p$ ) se puede determinar cómo:

$$A_p = \frac{6 m_s W_s}{\rho_s D} \quad \text{Ecuación III.9}$$

donde  $m_s$  es la masa total de látex titulado, en gramos;  $W_s$  es la fracción sólida (gramos de sólidos por gramos de látex);  $\rho_s$  es la densidad del polímero seco, en g/cm<sup>3</sup>; y  $D$  es el diámetro medio de partícula (cm), determinado mediante DLS.

Finalmente, la densidad total de la carga superficial ( $\sigma$ ), en  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ , se calcula como:

$$\sigma = F(\delta_{SO_4^-} + \delta_{COO^-}) \quad \text{Ecuación III.10}$$

donde  $F$  (en  $\mu\text{C}/\text{mEq}$ ) es la constante de Faraday [Gonzalez et al., 2008].

### III.2.4.7 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras para estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM) fueron preparadas colocando una gota de las dispersiones de partículas diluidas en agua *Milli-Q* directamente sobre grillas de cobre recubiertas de Formvar/carbono (300 *mesh*) y luego secadas al aire. Para mejorar el contraste, las muestras se sometieron a tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 1% durante 40 segundos y luego se removió el excedente de solución.

Los estudios de microscopía de transmisión electrónica se realizaron utilizando un equipo JEM 1200 EX II – JEOL, perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV)-La Plata.

La distribución del tamaño de partícula se determinó utilizando el Software ImageJ. Las partículas se consideraron esféricas y los diámetros promedio en número ( $d_n$ ), en superficie ( $d_s$ ) y en volumen ( $d_v$ ) se calcularon a partir de la ecuación:

$$d_{p-q} = \frac{\sum n_i d_i^p}{\sum n_i d_i^q} \quad \text{Ecuación III.11}$$

donde  $n_i$  es el número de partículas con  $d_i$  diámetro, y p-q fueron 1-0, 3-2 y 4-3 para  $d_n$ ,  $d_s$  y  $d_v$ , respectivamente.

A partir de estos valores se define el índice de polidispersidad (IP) según:

$$IP = \frac{d_v}{d_n} \quad \text{Ecuación III.12}$$

y el coeficiente de variación porcentual (CV) como:

$$CV = \frac{SD}{d_n} 100 \quad \text{Ecuación III.13}$$

donde SD es la desviación estándar.

Finalmente, se calcularon los valores para el área superficial específica de cada partícula (SSA,  $\text{cm}^2/\text{g}$ ) a partir de la ecuación:

$$SSA = \frac{60000}{d_{DLS} \rho_s} \quad \text{Ecuación III.14}$$

donde  $d_{DLS}$  es el diámetro obtenido por la técnica DLS y se encuentra expresado en  $\mu\text{M}$  y  $\rho_s$  es la densidad de la esfera sólida para cada polímero.

### III.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### III.3.1 Caracterización de las partículas poliméricas

##### III.3.1.1 Tamaño de partícula (DLS), potencial Z y contenido de sólidos

En la tabla III.3 se presentan el contenido de sólidos, los tamaños de partículas determinados mediante DLS ( $d_{DLS}$ ) y los valores de potencial Z que presentaron las dispersiones poliméricas sintetizados.

El contenido de sólidos obtenido está en acuerdo con el esperado en base a las formulaciones utilizadas para la síntesis de las dispersiones. Como puede observarse, en las condiciones de síntesis empleadas, se lograron sintetizar partículas poliméricas con tamaños en el rango de 67 a 134 nm. Las partículas pertenecientes a la serie de polímeros acrílicos (p-MB, p-MBH y p-MBA) presentaron tamaños relativamente similares entre sí mientras que, las partículas poliuretánicas resultaron ser de un tamaño superior.

**Tabla III.3.** Tamaño de las partículas, potencial Z y contenido de sólidos de las dispersiones sintetizadas

DENOMINACIÓN	Contenido de sólidos (%)	Diámetro (nm)	Potencial z (mv)
p-MB	27,0	67±1	-31±2
p-MBH	28,2	76±1	-30±2
p-MBA	30,6	73±1	-35±2
p-U	30,0	118,8±0,9	-35±3

El valor de potencial zeta de las dispersiones se encontró en el rango de -30 a -35 mV, los valores más bajos (-35 mV) fueron observados para del p-MBA y p-U debido a la presencia de grupos carboxílicos en estos sistemas. El potencial Z es un indicador de la estabilidad de una suspensión. En general, para las suspensiones estabilizadas únicamente por repulsión electrostática, como en el presente caso, los potenciales Z por encima de 30 mV (valor absoluto) son indicativos de estabilidad física [Müller et al., 2001], lo que se condice con lo observado experimentalmente dado que las dispersiones obtenidas se mantuvieron estables durante el tiempo de estudio comprendido en este trabajo. Los valores presentados en la tabla III.3 están en acuerdo con otros sistemas similares sintetizados previamente [Gonzalez et al, 2007; Peruzzo et al, 2010].

### III.3.1.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la figura III.1 se presentan los espectros FTIR obtenidos para los distintos polímeros sintetizados. Las principales bandas de absorción y sus asignaciones para cada polímero preparado se detallan en la tabla III.4.

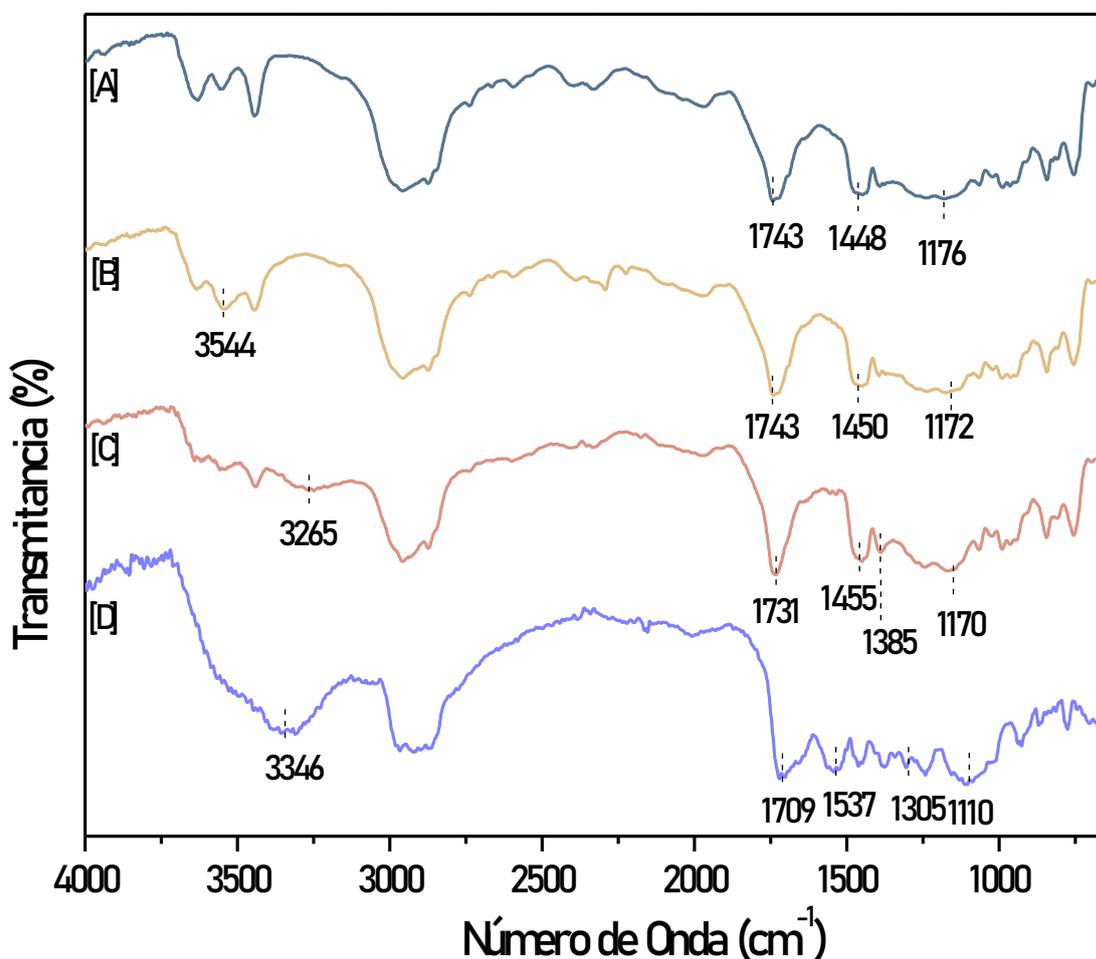


Figura III.1 Espectros FTIR de los polímeros sintetizados: (A) p-MB, (B) p-MBH, (C) p-MBA, (D) p-U

Los espectros de los polímeros denominados p-MB, p-MBA y p-MBH presentan bandas características comunes debido a la presencia de los dos monómeros acrílicos empleados en sus preparaciones (metacrilato de metilo y acrilato de butilo). En los tres casos se observa una banda a aproximadamente 1730/1740  $\text{cm}^{-1}$  asociada a la vibración de estiramiento de los enlaces carbonilo del grupo éster ( $\nu_{\text{C=O}}$ ) y otra a 1170  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de estiramiento de grupo C-O-C del mismo grupo funcional. Los espectros presentan también una banda en la región 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  asociada al estiramiento de los enlaces C-H ( $\nu_{\text{C-H}}$ ) [Peruzzo et al., 2010]. El conjunto de señales que se observan la región 3600-3440  $\text{cm}^{-1}$  puede deberse a un sobretono (banda armónica) con una frecuencia dos veces mayor que la frecuencia de estiramiento del grupo carbonilo [Kushwaha et al., 2017]. En adición a las señales mencionadas, el espectro del p-MBA presenta la contribución de una banda ancha centrada en 3265  $\text{cm}^{-1}$  (solapada a otras

señales en la región 3400-2900  $\text{cm}^{-1}$ ) debida a la presencia de los grupos carboxílicos del ácido metacrílico ( $\nu\text{O-H}$ ) [Walkowiak et al., 2020; Treat et al., 2006], mientras que en el espectro del p-MBH se observa el incremento de una señal en 3544  $\text{cm}^{-1}$  que se asigna a los grupos OH introducidos por el HEMA [Xu et al., 2004].

El espectro del PU mostró una banda típica a 3300  $\text{cm}^{-1}$ - 3400 $\text{cm}^{-1}$  que surge de las vibraciones de estiramiento del enlaces N-H unido por puente de hidrógeno y libre, y una banda ancha centrada en 1709  $\text{cm}^{-1}$  asignada al estiramiento del grupo C=O ( $\nu\text{C=O}$  libre y  $\nu\text{C=O}$  enlazado por puente de hidrógeno; banda Amida I). Adicionalmente se observa un pico de absorción en 1537  $\text{cm}^{-1}$  (banda de combinación  $\nu\text{C-N}$  y  $\delta\text{N-H}$ ; banda Amida II), una señal centrada en 1305  $\text{cm}^{-1}$  debida a la combinación de la flexión N-H y el estiramiento C-N, una banda a 1110  $\text{cm}^{-1}$  asociada a la vibración de estiramiento del grupo C-O-C del polipropilenglicol, y otras señales en las regiones 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  y 1500-1200  $\text{cm}^{-1}$  provenientes de modos vibracionales de estiramiento y flexión de C-H, respectivamente. [Kaminski & Urban, 1997; Irusta & Fernández-Berridi, 1999; Pardini & Amalvy, 2008; Gangoiti & Peruzzo, 2020]. Las asignaciones descritas se encuentran resumidas en la tabla III.4.

**Tabla III.4.** Asignación de las principales bandas de absorción en la región infrarroja de los polímeros sintetizados.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )	GRUPO	MODO VIBRACIONAL	POLÍMERO
3544	OH	$\nu\text{O-H}$	p-MBH
3300-3500	NH	$\nu\text{N-H}$ enlazado a H + $\nu\text{N-H}$ no enlazado	p-U
3265	COOH	$\nu\text{O-H}$	p-MBA
2800-2900	CH	$\nu\text{C-H}$ asimétrico y simétrico (alifáticos)	todos
1731 <sup>a</sup> -1743 <sup>b</sup>	CO	$\nu\text{C=O}$	p- MBA <sup>a</sup> , p-MB <sup>b</sup> , p-MBH <sup>b</sup>
1709	CO	$\nu\text{C=O}$ libre + enlazado	p-U
1537	NH	$\nu\text{C-N}$ + $\delta\text{N-H}$	p-U
1305	NH / CN	$\nu\text{N-C}$ + $\delta\text{N-H}$	p-U
1170 <sup>a</sup> -1172 <sup>b</sup> -1176 <sup>c</sup>	COC	(O-)C-O-C (éster)	p- MBA <sup>a</sup> , p-MBH <sup>b</sup> , p-MB <sup>c</sup>
1110	COC	$\nu\text{C-O-C}$ (eter)	p-U

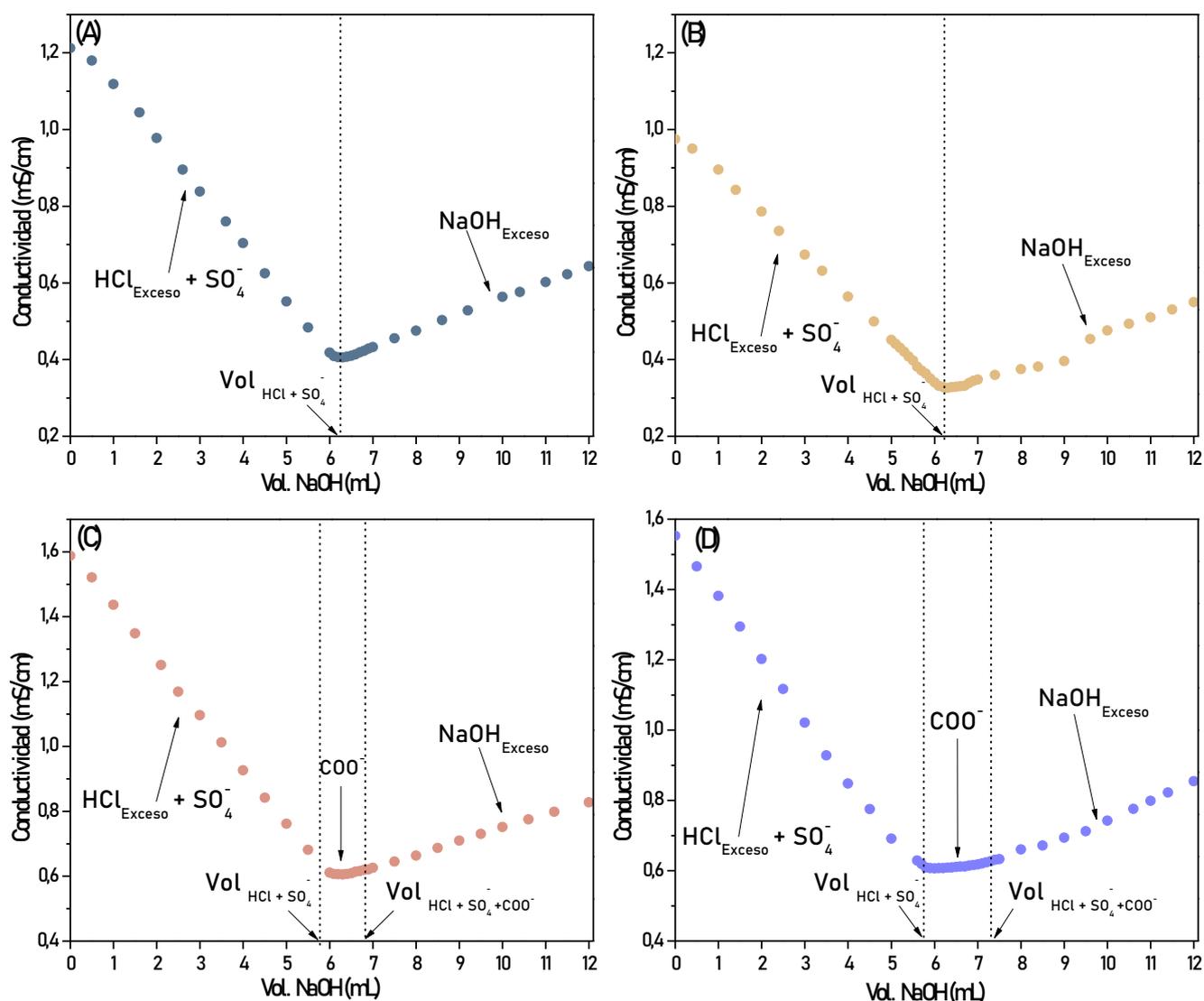
La aparición de las bandas asignadas a los grupos funcionales característicos de cada polímero sintetizado evidencia una síntesis exitosa producto de la cual se han obtenido polímeros con diversa funcionalidad química.

### III.3.1.3 Titulaciones Conductimétricas

La figura III.2 muestra las curvas de titulación conductimétricas obtenidas para las diferentes dispersiones preparadas con el fin de determinar la densidad de grupos cargados en la superficie de las partículas poliméricas.

En las curvas de titulación de p-MBA y p-U (figura III.2 C y D, respectivamente) se pudieron observar tres regiones con diferentes pendientes que permitieron identificar dos puntos de equivalencia. El primer segmento corresponde a la neutralización del HCl (ácido fuerte) colocado inicialmente en exceso y los protones asociados al ión sulfato; el segundo segmento corresponde a la neutralización de los protones asociados al grupo carboxilo (más débil); y el tercer segmento corresponde al aumento en la de conductividad debido al NaOH agregado en exceso. En estos casos, el volumen de titulante empleado para neutralizar los grupos COOH será la diferencia entre los dos puntos de equivalencia, mientras que el volumen de NaOH destinado a neutralizar los grupos sulfato será la diferencia entre el volumen del primer punto de equivalencia, y el volumen de titulante (conocido) empleado para neutralizar el exceso de HCl colocado [Gonzalez et al., 2008].

Por otro lado, las curvas de titulación obtenidas para p-MB y p-MBH presentaron dos regiones, identificándose de esta forma solo un punto de equivalencia. Para estas dispersiones, sólo fue posible determinar mediante esta técnica la cantidad de grupos sulfatos superficiales ya que en el caso del p-MB son los únicos grupos presentes, mientras que para el p-MBH los grupos oxhidrilos no logran cuantificarse por reacción ácido-base en las condiciones empleadas.



**Figura III.2** Curvas de titulación conductimétrica: (A) p- MB, (B) p-MBH, (C) p-MBA, (D) p-U. Se presenta la media de los valores obtenidos por duplicado sin sus barras de error para mayor claridad visual.

A partir de los resultados obtenidos y empleando las ecuaciones III.7-10, se determinaron la densidad superficial de cada grupo funcional ( $\delta$ ) y la densidad de carga superficial total ( $\sigma$ ), que se presentan en la tabla III.5 junto con el área expuesta por el total de partículas tituladas ( $A_p$ ) calculada empleando la ecuación III.9 introduciendo en la misma el diámetro obtenido mediante DLS (Tabla III.3).

**Tabla III.5.** Características de las dispersiones poliméricas determinadas por titulaciones conductimétricas.

	p-MB	p-MBH	p- MBA	p-U
$A_p$ (cm <sup>2</sup> )	$3,82 \times 10^5$	$3,17 \times 10^5$	$3,34 \times 10^5$	$1,75 \times 10^5$
$\delta_{SO_4^-}$ (mEq/cm <sup>2</sup> )	$1,63 \times 10^{-7} \pm 4 \times 10^{-9}$	$1,64 \times 10^{-7} \pm 6 \times 10^{-9}$	$5,5 \times 10^{-8} \pm 5 \times 10^{-9}$	$5,5 \times 10^{-8} \pm 5 \times 10^{-9}$
%p/p SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,15±0,03	1,03±0,03	0,36±0,03	0,18±0,04
$\delta_{COO^-}$ (mEq/cm <sup>2</sup> )	-	-	$4,8 \times 10^{-7} \pm 4 \times 10^{-8}$	$8,2 \times 10^{-7} \pm 8 \times 10^{-8}$
%p/p COO <sup>-</sup>	-	-	1,4±0,1	1,3±0,2
$\sigma$ (μC/cm <sup>2</sup> )	15,7±0,4	15,9±0,8	52±3	85±3

A partir de los resultados obtenidos en base a las titulaciones conductimétricas se observó que todas las partículas poliméricas presentaron grupos sulfato en su superficie provenientes del iniciador empleado en su síntesis, mientras que las partículas pertenecientes a p-MBA y p-U también evidenciaron una densidad superficial de grupos carboxílicos aportados por el MA y el DMPA utilizados en su formulación, respectivamente. Estos dos sistemas resultaron ser similares en cuanto a  $\delta_{SO_4^-}$  y  $\delta_{COO^-}$  aunque, debido a la diferencia en sus tamaños de partícula, presentaron una diferencia en la densidad de carga superficial  $\sigma$ . Por otro lado, si bien los sistemas p-MB y p-MBH resultaron ser similares entre sí en términos de  $\delta_{SO_4^-}$  y  $\sigma$ , este último como consecuencia del tamaño de partícula similar entre ellos, presentan como es de esperar menores valores de densidad de carga superficial total que las dispersiones p-MBA y p-U en acuerdo con su menor densidad superficial de grupos cargados. Estos resultados guardan relación con los valores de potencial Z obtenidos para las muestras presentados anteriormente.

### III.3.1.4 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

La caracterización morfológica de las partículas poliméricas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes TEM de las partículas sintetizadas se muestran en la Figura III.3 junto a sus respectivos histogramas. Los resultados obtenidos en base a los mismos para los diámetros de partículas y su polidispersidad se presentan en la Tabla III.6

Todas las partículas pertenecientes a la serie acrílica presentaron una morfología esférica con tamaños de alrededor de 70 nm e igual polidispersidad, mientras para el p-U se obtuvo un tamaño de 110 nm. Como puede observarse en dicha tabla, el área superficial expuesta por unidad de masa es similar en las tres partículas acrílicas, siendo inferior el valor para el poliuretano debido al mayor tamaño de partícula presentado por estas últimas. Si bien los resultados informados en la Tabla III.6 siguen la tendencia mostrada por los

obtenidos DLS (Tabla III.3), son menores debido a que en esta última técnica se determina el diámetro hidrodinámico de las partículas.

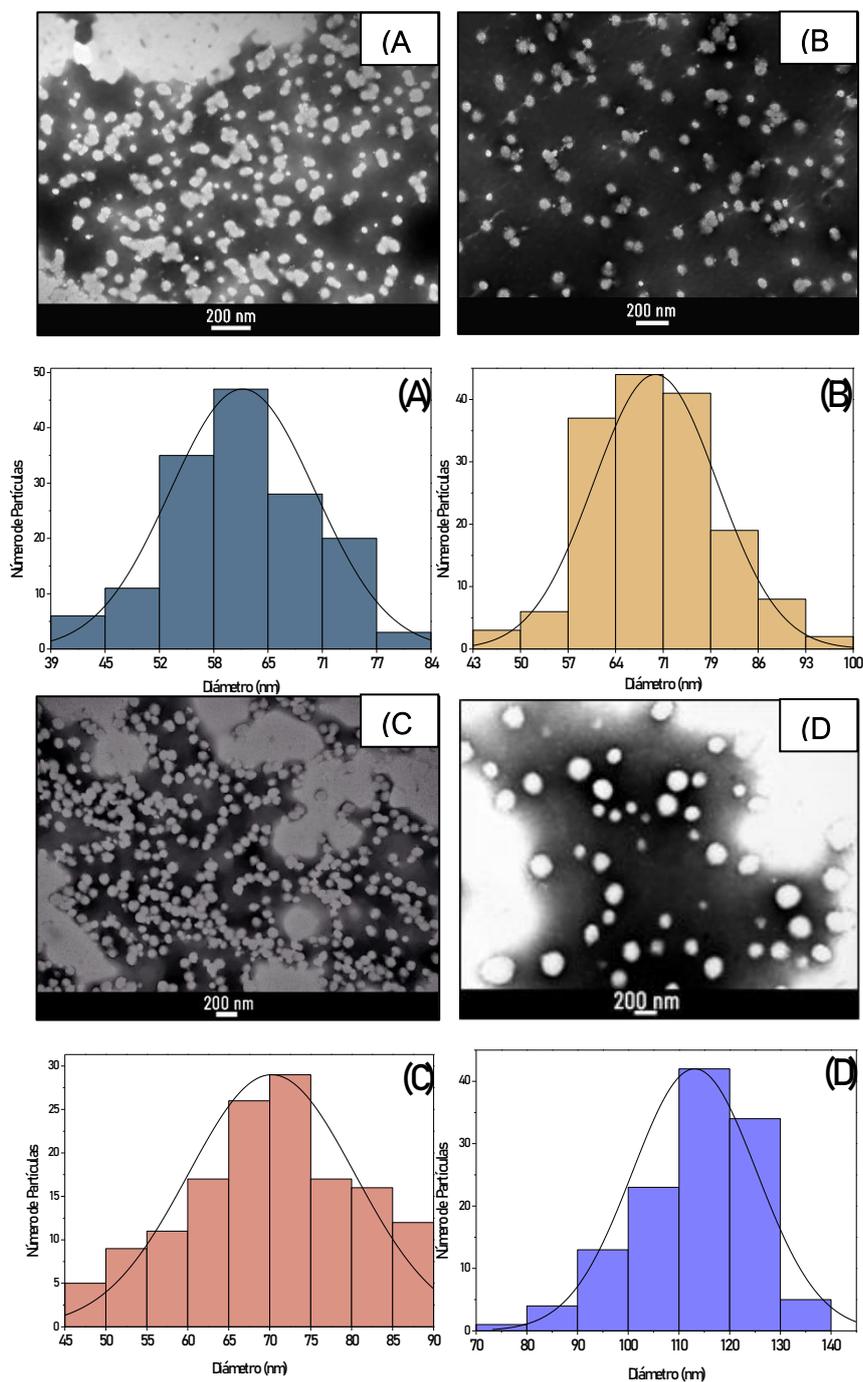


Figura III.3 Imágenes TEM e histogramas: (A) p- MB, (B) p-MBH, (C) p-MBA, (D) p-U

**Tabla III.6.** Tamaño de partícula

	p-MB	p-MBH	p- MBA	p-U
$d_n$ (nm)	61,38	70,22	70,07	113,28
$d_s$ (nm)	63,74	72,86	73,06	115,73
$d_v$ (nm)	64,83	74,15	74,38	117,36
IP	1,06	1,06	1,06	1,01
%CV	14,03	13,24	14,47	10,78
SSA (m <sup>2</sup> /g)	80,76	70,64	70,77	40,83

### III.3.1.5 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Dos de las dispersiones sintetizadas, p-MBA y p-U, fueron seleccionadas para ser estudiadas por SAXS con el fin de profundizar en el estudio de morfológico de las mismas. Las curvas SAXS adquiridas para estas dispersiones se muestran en la Figura III.4(I), el perfil de las curvas  $I(q)$  vs  $q$  para ambas muestras se corresponde con el comportamiento típico de partículas esféricas polidispersas en dispersión acuosa [Ballauff, 2011]. Por otro lado, en la Figura III.4(II) se presenta el gráfico  $\ln q$  vs  $q^2$  (gráfico de Guinier) para ambas muestras, el p-MBA mostró un comportamiento lineal en la región a bajo  $q$ , mientras que p-U presentó una tendencia a la agregación evidenciada por una desviación positiva observada en dicha región que dificulta la estimación de  $R_g$  con este enfoque.

Teniendo en cuenta que la intensidad dispersada puede expresarse como una ecuación de potencia simple  $I(q) \propto q^{-\alpha}$ , a partir de los gráficos log-log de las curvas de  $I(q)$  vs  $q$  (imagen insertada en Figura III.4(I)) se pudo obtener el valor de  $\alpha$  como la pendiente de la recta resultante del ajuste de los puntos en la región a bajo  $q$  (0,04-0,07 nm). Para p-MBA se determinó un valor de  $\alpha$  de 2,0416 ( $R^2=0,99994$ ), confirmando el comportamiento según la ley de Guinier y acorde a la presencia de superficies compactas. En el caso del p-U se observó un valor de  $\alpha$  de 3,1482 que confirmó la desviación del comportamiento de Guinier y se ubica en el rango de valores para este parámetro que se asocia con la dispersión por parte de superficies suaves [Yang et al., 2016]. Esto explicaría el comportamiento suavizado observado para la curva SAXS del p-U respecto al p-MBA. Para esta última muestra, en esa zona fue posible evaluar el radio de giro empleando la aproximación de la ecuación

$$I(q) \cong I_0 \exp\left[\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right] \quad \text{Ecuación III.15}$$

donde  $R_g$  es el radio de giro de Guinier, y puede aplicarse en el rango  $qR_g \leq 1,3$ . A partir de la pendiente del ajuste lineal de los puntos de la región de bajo  $q$  del gráfico de  $\ln I(q)$  vs  $q^2$  se obtuvo un  $R_g$  de 31 nm [Guinier & Fournet, 1955].

La zona media de las curvas  $I(q)$  vs  $q$  fue ajustada empleando diferentes modelos, el mejor ajuste se obtuvo empleando uno basado en el factor de estructura denominado *HardSphere*, el cual considera la dispersión de una población de esferas con densidad electrónica (SLD) uniforme y con una distribución gaussiana del tamaño de partícula. El resultado obtenido del ajuste se muestra en la Figura III.4(I) como una línea continua sobre los perfiles de SAXS, en base al cual se obtuvo un valor para el radio de las partículas de 36,36 nm y 64,64 para p-MBA y p-U, respectivamente, el  $R_g$  junto a otros parámetros obtenidos (la polidispersidad (IPD) y la densidad electrónica (SLD)) se presentan en la Tabla III.7.

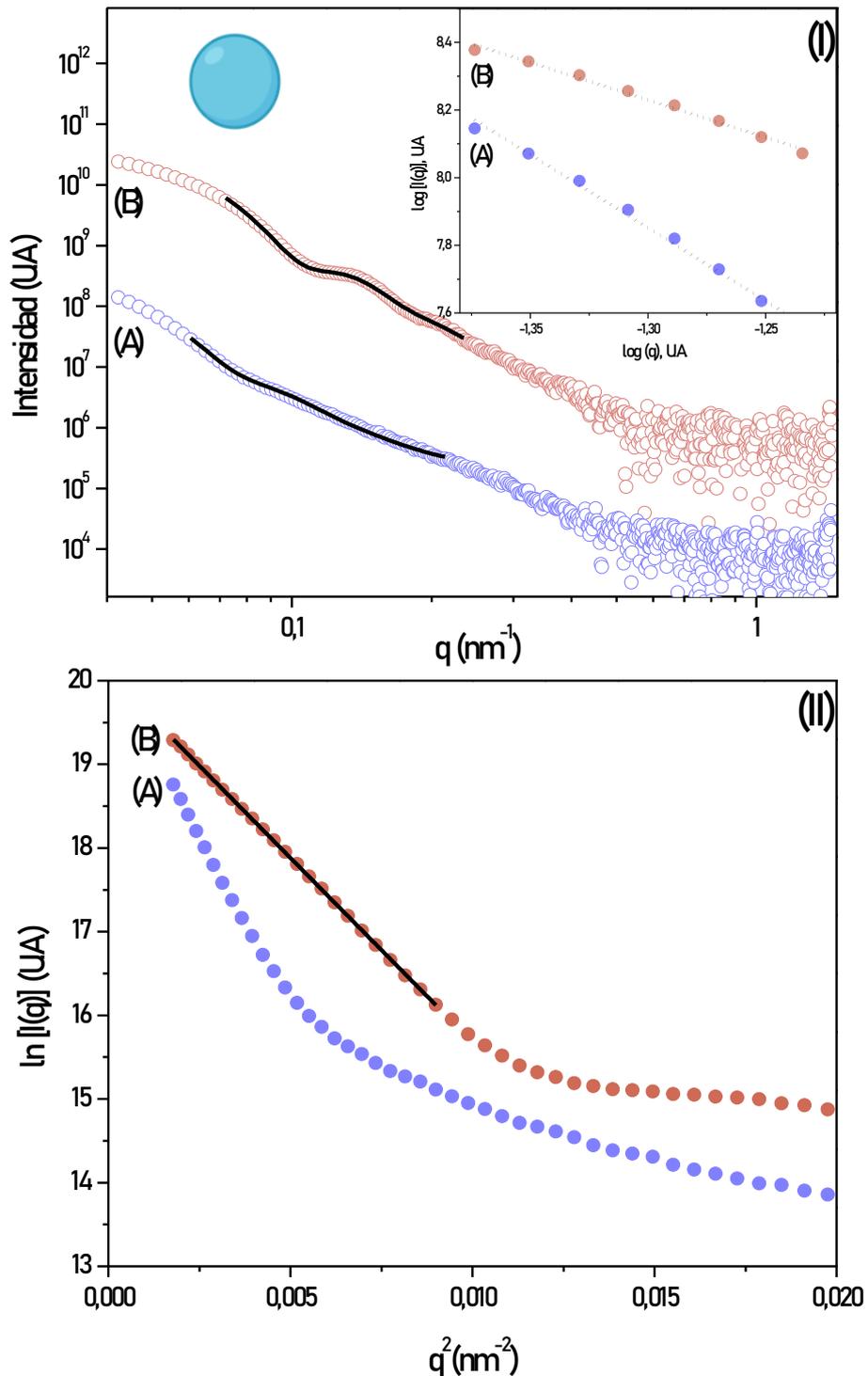


Figura III.4 (I) Curvas SAXS y ajustes y gráfico log-log (II) Aplicación de la ley de Guinier para: (A) p-U, (B) p-MBA

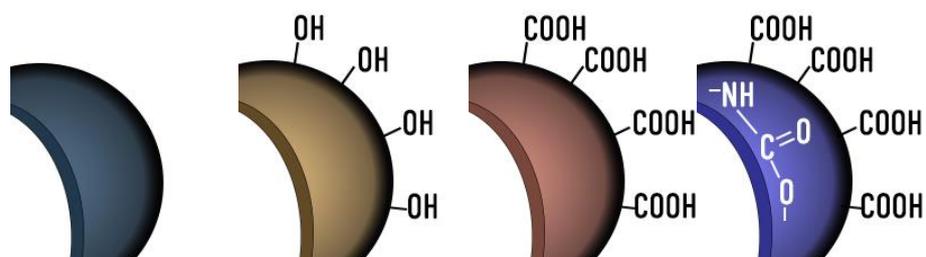
**Tabla III.7.** Parámetros obtenidos para los ajustes de las curvas SAXS empleando el modelo *HardSpheres*

	p-MBA	p-U
R (nm)	36,36	64,64
IPD	0,15	0,44
SLD (Å <sup>-2</sup> )	4,5 x10 <sup>-6</sup>	3,8 x10 <sup>-6</sup>

Cabe destacar que, el diámetro de partícula calculado como 2R para p-MBA y p-U (72 nm y 129,3 nm, respectivamente), resulta similar en ambos casos a lo observado por microscopía de transmisión electrónica.

En la tabla III.8 se presenta un resumen de las características de las partículas sintetizadas.

**Tabla III.8** Resumen de las características de las partículas poliméricas sintetizadas en este trabajo.



	p-MB	p-MBH	p-MBA	p-U
d <sub>n</sub> (nm) (TEM)	61,38	70,22	70,07	113,28
D <sub>DLS</sub> (nm)	67±1	76±1	73±1	118,8±0,9
SSA (m <sup>2</sup> /g)	80,76	70,64	70,77	40,83
δ <sub>SO<sub>4</sub><sup>-</sup></sub> (mEq/cm <sup>2</sup> )	1,63x10 <sup>-7</sup> ±4x10 <sup>-9</sup>	1,64x10 <sup>-7</sup> ±6x10 <sup>-9</sup>	5,5x10 <sup>-8</sup> ±5x10 <sup>-9</sup>	5,5x10 <sup>-8</sup> ±5x10 <sup>-9</sup>
δ <sub>COO<sup>-</sup></sub> (mEq/cm <sup>2</sup> )	-	-	4,82x10 <sup>-7</sup> ±4x10 <sup>-8</sup>	8,2 x10 <sup>-7</sup> ±8x10 <sup>-8</sup>
σ (μC/cm <sup>2</sup> )	15,7±0,4	15,9±0,8	52±3	85±3
POTENCIAL Z (mV)	-31±2	-30±2	-35±2	-35±3

### III.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Se obtuvieron dispersiones de partículas poliméricas en agua que se mantuvieron estables durante el período de tiempo comprendido en desarrollo de este trabajo.

Mediante el empleo de diferentes técnicas, se logró caracterizar a todas las partículas sintetizadas observándose partículas esféricas de naturaleza acrílica con tamaños en el rango de 60 a 70 nm, y una de naturaleza poliuretánica de aproximadamente 120 nm, diferenciadas además por el tipo de grupo funcional y densidad de carga superficial.

De esta manera, se consiguió preparar una serie de partículas poliméricas para ser empleadas en la preparación de sistemas polímero-proteína.

# IV

## Capítulo IV

# EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CAPA-S



En el presente capítulo se desarrolla el protocolo empleado para la extracción de las proteínas de capa-S provenientes de dos cepas bacterianas del género *Lactobacillus*. Se presenta y discute también la caracterización de las mismas empleando diversas técnicas fisicoquímicas.

## IV. EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CAPA-S

### IV.1 INTRODUCCIÓN

#### IV.1.1 Proteínas de capa-S empleadas en este trabajo

Como se mencionó en la sección I.2 se ha reportado la presencia de proteínas de capa-S en distintas cepas de *Lactobacillus* como por ejemplo *L. helveticus*, *L. gallinarum*, *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. buchneri*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. gasseri* y *L. johnsonii* entre otras [Boot et al., 1996; Masuda & Kawata, 1985; Kawata et al., 1974; Masuda, 1992; Hagen et al., 2005; Kant et al., 2011; Ventura et al., 2002; Yasui et al., 1995]. El peso molecular reportado para las proteínas de capa-S de *Lactobacillus* varía entre 25 y 71 kDa, y los valores de pI predichos son altos en comparación con las proteínas de capa-S de otras especies (9,4–10,4) [Åvall-Jääskeläinen & Palva 2005]. La simetría de red reportada para las SLP aisladas de *Lactobacillus* ha sido de tipo oblicua para *L. acidophilus* y *L. helveticus* [Smit et al., 2001; Lortal et al., 1992]; tetragonal en el caso de *L. fermentum* [Kawata et al., 1974] y hexagonal para *L. buchneri* [Masuda et al., 1981] respectivamente. Por otro lado, en algunas especies bacterianas se ha podido caracterizar la glicosilación de la estructura polipeptídica [Malamud et al. 2020].

Las proteínas de capa-S presentes en *Lactobacillus kefir* (bacterias ácido-lácticas predominantes en los gránulos de kefir) fueron descritas por primera vez por Garrote y col.(2004). Estas proteínas resultaron estar glicosiladas y contar con pesos moleculares de entre 66 y 170 KDa.

En este trabajo de tesis se emplearon las proteínas de capa-S extraídas de dos cepas bacterianas de *Lactobacillus kefir*, recientemente reclasificada como *Lentilactobacillus kefir*, denominadas CIDCA8348 (S8) y CIDCA83111 (S1). Ambas cepas pertenecen a la colección de bacterias del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-La Plata).

Las dos cepas empleadas de *L. kefir* poseen diferente capacidad de agregación; en el caso de la cepa CIDCA8348 se ha confirmado su propiedad agregante, mientras que la cepa CIDCA83111 no ha demostrado tal comportamiento. Cabe destacar que este detalle respecta a la conducta de la célula bacteriana y no hay estudios que permitan transferir esta propiedad a las proteínas de capa-S aisladas de dichas cepas.

Respecto a los aspectos bioquímicos de las proteínas, en la tabla IV.1 se presenta un resumen de los principales parámetros de interés derivados del análisis de la secuencia de aminoácidos (AA) de ambas SLP reportadas por Malamud y col. (2017). Ambas proteínas comparten características típicas de otras proteínas de capa-S extraídas de lactobacilos como la ausencia de cisteína y la gran relación de residuos con densidad de carga positiva/negativa. Debido a esto, estas proteínas no cuentan con enlaces intercatenarios de puente disulfuro y los valores de punto isoeléctrico predichos son elevados en comparación con los de las SLP de otros lactobacilos.

**Tabla IV.1** Principales parámetros de interés de las proteínas de capa-S empleadas

PROTEINAS DE CAPA-S	83111	8348
Peso molecular calculado (kDa)	59,939	57,039
Longitud (N° total de AA)	568	542
PI	9,52	9,60
% Asp-Glu	7,1	5,7
% Arg-Lys	10,6	9,6
% AA hidrófobos	34,9	38,4
% AA con grupos hidroxilo	29,2	27,9
Glicosilación	+	+

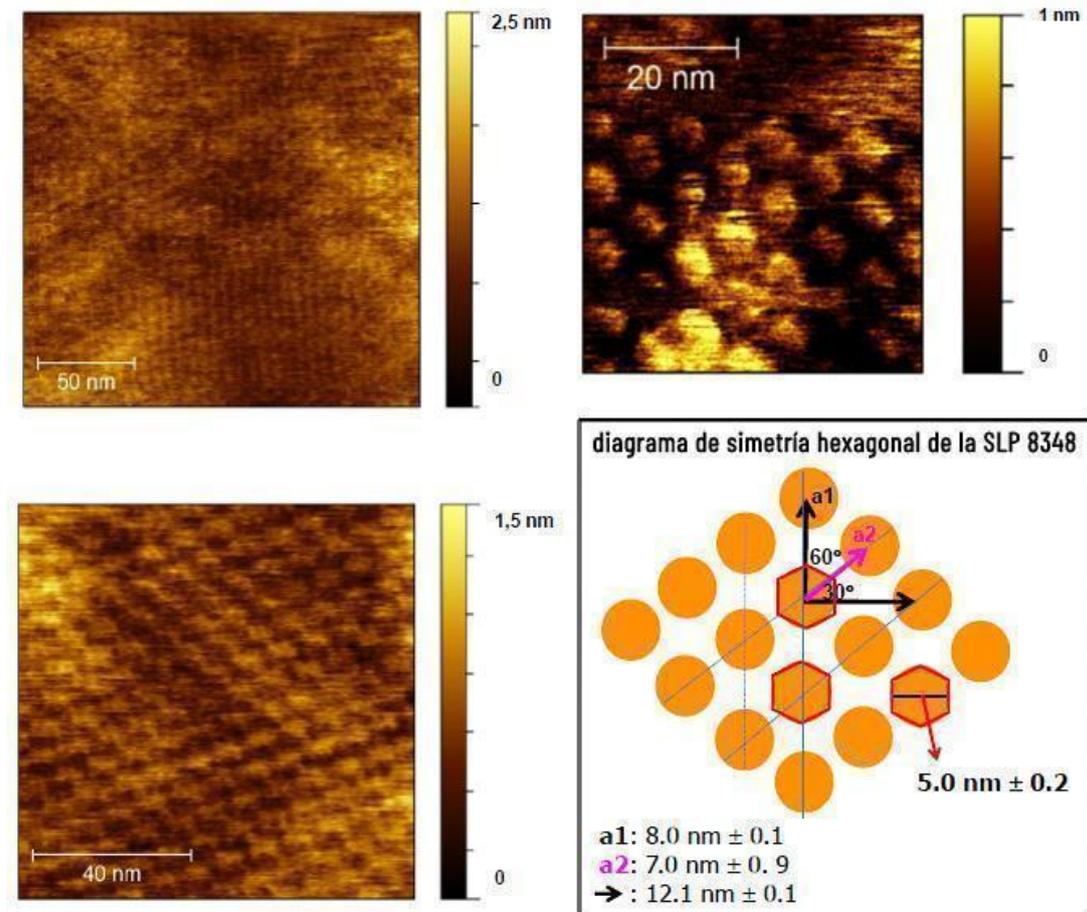
*Asp* ácido aspártico, *Glu* ácido glutámico, *Arg* arginina, *Lys* lisina

En su trabajo de tesis doctoral, Malamud (2019) logró identificar y describir la naturaleza de los glicanos presentes en ambas proteínas. Según sus resultados la SLP S1 presenta dos péptidos sustituidos con cadenas de 8 unidades de glucosa en promedio, decoradas con ácido galacturónico, y ancladas a la cadena polipeptídica mediante una unión O-glicosídica [Cavallero et al., 2017]. Además, se encontraron N-glicanos, en dos péptidos sustituidos con estructuras cortas conteniendo Glucosa (Glc), Manosa (Man), Hexosa (Hex) y N-acetilglucosamina (NAc):

- GlcNAc<sub>4</sub>Man<sub>3</sub>dHex
- GlcNAc<sub>2</sub>dHex

Por su parte la SLP S8 presentó únicamente O-glicanos encontrándose en su estructura solo un péptido sustituido por cadenas de 5 unidades de glucosa en promedio [Malamud et al., 2020].

Respecto a la estructura y simetría del arreglo de las proteínas de capa-S, la SLP S8 ha sido caracterizada con una simetría hexagonal p6 por Gerbino en su trabajo de tesis doctoral (2013). En dicha investigación, mediante el depósito de la proteína sobre mica durante 16 horas y posterior observación mediante AFM se obtuvieron las micrografías mostradas en imagen IV.1 junto al modelado a partir del cual se determinaron distintos parámetros.



**Imagen IV.1** Micrografías AFM tomadas con distintos aumentos y diagrama de simetría hexagonal [Gerbino, 2013].

A partir de estos análisis, Gerbino (2013) determinó los parámetros cristalinos de distancia denominados  $a_1$  y  $a_2$  con un valor de aproximadamente 7-8 nm, un ángulo de  $60^\circ$  y un tamaño de unidad de proteína de 5 nm.

Sin embargo, la información previa a este trabajo sobre la simetría del arreglo estructural de SLP S1 es sumamente escasa.

## IV.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.2.1 Reactivos y Buffers

- Albúmina de Suero Bovino, grado de hidrólisis 5 (BSA, Sigma Aldrich >98%)
- Bromuro de Potasio (KBr, Thermo, grado espectroscópico >99%)
- Caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco BD)
- Etilendiamintetraacetato de sodio (EDTA, Cicarelli)
- Hidrocloruro de guanidinio (GuHCl, OmniPur)

- Membrana de celulosa (Sigma Aldrich, *cut off* 14000 KDa)
- Solución del reactivo de Bradford G-250 alcohólica, 1% P/V
- Tris(hidroximetil)aminometano (Tris, J.T. Baker)

**Tabla IV.2** Formulación de los distintos buffers empleados

DENOMINACIÓN	COMPOSICIÓN	VOL. FINAL (mL)	pH
<b>BUFFER TRIS</b> ( $5 \times 10^{-2}$ M)	7,878 g de Tris-Cl	1000	7,2
<b>BUFFER TRIS/EDTA</b> ( $5 \times 10^{-2}$ M/ $1 \times 10^{-3}$ M) <i>Buffer B</i>	7,878 g de Tris-Cl 0,2922 g de EDTA NaOH 1M (hasta ajuste del pH)	1000	7,8
<b>BUFFER TRIS/CLORURO DE GUANIDINIO</b> ( $5 \times 10^{-2}$ M/ 5M) <i>Buffer A</i>	7,878 g Tris-Cl 477,65 g Cloruro de Guanidinio	1000	7,2
<b>BUFFER PBS</b>	8,02 g de NaCl 1,17 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,2 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1000	7,02

*A menos que se indique, todos los buffers y soluciones se prepararon en agua Milli-Q obtenida empleando un equipo Heal Force SMART SERIES*

## IV.2.2 Extracción y purificación de las proteínas de capa-S

Para el aislamiento de las SLPs, las cepas de *L. kefir* CIDCA83111 y CIDCA8348 se cultivaron en caldo MRS en condiciones aeróbicas, durante 48 horas, a 32°C. El medio de cultivo utilizado fue esterilizado por calor húmedo, en autoclave, a 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.

### Protocolo de extracción de proteínas de capa-S

1. A partir de aproximadamente 500 mL de cultivo, las células en fase estacionaria se centrifugaron por 20 minutos a 2200 g
2. Se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados mediante resuspensión /centrifugación a 2200 g con buffer PBS.
3. Se resuspendió el pellet del último lavado en un volumen 10 veces mayor de buffer Tris  $5 \times 10^{-2}$  M pH = 7,2; clorhidrato de guanidinio 5 M.

4. Se incubó en agitación a temperatura ambiente durante 20 minutos.
5. Se centrifugó a 40.000 g durante 30 minutos a 10°C.
6. Se tomó el sobrenadante y se lo centrifugó a 40.000 g durante 30 minutos a 10°C dos veces más.
7. El sobrenadante clarificado se dializó frente a buffer Tris  $5 \times 10^{-2}$  M; etilendiaminotetraacetato de sodio (EDTA)  $10^{-3}$  M (pH = 7,8) empleando una membrana de celulosa con un cut-off de 14000 KDa, con agitación suave durante 24 hs. a temperatura ambiente.

## IV.2.3 Caracterización de las proteínas de capa-S

### IV.2.3.1 Cuantificación de proteínas en el extracto

Se han desarrollado varios métodos para la determinación cuantitativa de proteínas, de todos ellos, los utilizados con mayor frecuencia en la actualidad se basan en la reacción del azul brillante de Coomassie G-250 (CBB) y el Cu(II) (método de Biuret) con las proteínas.

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos se empleó el método de Bradford que se basa en el cambio del máximo de absorbancia (620nm) del colorante coloidal *Coomassie Blue G250* consecuencia de su unión a las proteínas. Las muestras se prepararon tomando 10  $\mu$ l de suspensión de proteína aislada y adicionando 200  $\mu$ l del reactivo de Bradford. De manera similar se preparó cada punto de la curva de calibración empleando como patrón externo una solución de albúmina bovina de 10 mg/mL, la cual se construyó con concentraciones que van desde 25  $\mu$ g/ml a 1 mg/ml. Las medidas de absorbancia se realizaron en un lector de placas Multiskan Go microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) a 620 nm [Bradford, 1976].

### IV.2.3.2 Peso molecular aparente

Para determinar el peso molecular aparente de las proteínas extraídas se utilizó la técnica desarrollada por Laemmli (1970). Se prepararon geles con una concentración de acrilamida 12 %p/v en el gel separador y 4 %p/v en el gel apilador. Se sembraron 10  $\mu$ g de SLP S1 y S8 por calle. Las corridas electroforéticas se realizaron a voltaje constante, 120 V, hasta que el frente de corrida alcanzó el extremo inferior del gel, en un sistema vertical. El revelado de los geles se llevó a cabo empleando el colorante coloidal *Coomassie Blue G250*. Se empleó el marcador de peso molecular *MA1401* (PB-L, Argentina).

### IV.2.3.3 Caracterización por FTIR-TEM-DLS-Potencial Z

Dado que para la caracterización de las proteínas se emplearán las técnicas descritas en el Capítulo III, en esta sección se mencionarán aquellos detalles del procedimiento que sean diferentes en cuanto a equipamiento y preparación de la muestra. Las proteínas fueron caracterizadas en dispersión o como polvos obtenidos por liofilización de las mismas.

Los espectros FTIR fueron adquiridos como se describió previamente. Los espectros resultantes de las proteínas se suavizaron empleando una función Savitzky-Golay con cinco puntos de escala ( $9,643 \text{ cm}^{-1}$ ).

Las imágenes TEM fueron adquiridas como se describió previamente. Los estudios de microscopía de transmisión electrónica se realizaron utilizando un equipo JEM 1200 EX II – JEOL, perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias-La Plata y un equipo TALOS F200C perteneciente a YPF-Tecnología, La Plata.

Los tamaños de partícula determinados mediante DLS y el potencial Z de las proteínas fueron determinados empleando un equipo Litesizer<sup>TM</sup> 500, FM10 (Anton Paar, Austria) a  $25^{\circ}\text{C}$ . Las dispersiones fueron diluidas 100 veces empleando buffer B y sonicadas en baño ultrasónico por 15 minutos previo al análisis.

## IV.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### IV.3.1 Extracción y cuantificación de las proteínas de capa-S

El método de extracción utilizado permitió obtener aproximadamente 10,00 mL de suspensión de proteínas de capa-S partiendo de 1,00 L de cultivo bacteriano.

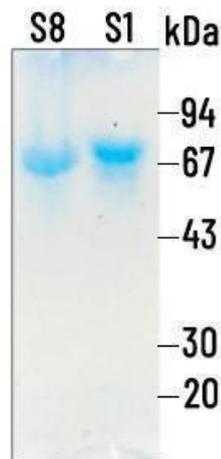
La concentración de proteínas en el extracto presentó variaciones entre las distintas extracciones realizadas. En todos los casos, se obtuvieron concentraciones promedio de 1,2 mg/mL que fueron diluidas empleando Buffer B hasta lograr una concentración final de 1,00 mg/mL. Los extractos de proteínas destinados a la construcción de las isothermas de adsorción se sometieron a procesos de concentración empleando los dispositivos para filtrado por centrifugación *Centricon Plus-70* equipados con una membrana *Ultracel-PL* con un *cut-off* de 10 kDa, las suspensiones se concentraron aproximadamente 4 veces.

### IV.3.2 Caracterización de las proteínas de capa-S

#### IV.3.2.1 Peso molecular aparente

Las proteínas de la capa S de *L. kefir* aisladas con GuHCl presentaron una banda dominante e intensa en la electroforesis desnaturalizante en coincidencia con lo estudiado por Mobili en su tesis doctoral (2008), quien comparando métodos de extracción utilizando diferentes extractantes (LiCl, SDS y GuHCl), observó bandas intensas entorno a los 66 kDa cuando las SLP fueron extraídas con GuHCl a diferencias de las SLP extraídas con LiCl. El perfil de proteínas totales obtenido luego del contacto con GuHCl de los dos lactobacilos

(*L. kefir* S8 y S1) se muestran en la imagen IV.2. El perfil de proteínas totales mostró una banda mayoritaria correspondiente a un polipéptido de con un peso molecular aparente de 67 KDa para la SLP S1, mientras que la correspondiente a la proteína de capa-S S8, se corresponde con un peso molecular aparente de 69 KDa, en coincidencia con lo oportunamente reportado [Mobili et al., 2009]. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los que se informaron pesos moleculares entre 66 y 170 KDa para las proteínas de la capa S aisladas de diferentes cepas de *Lactobacillus kefir* [Garrote et al., 2004].



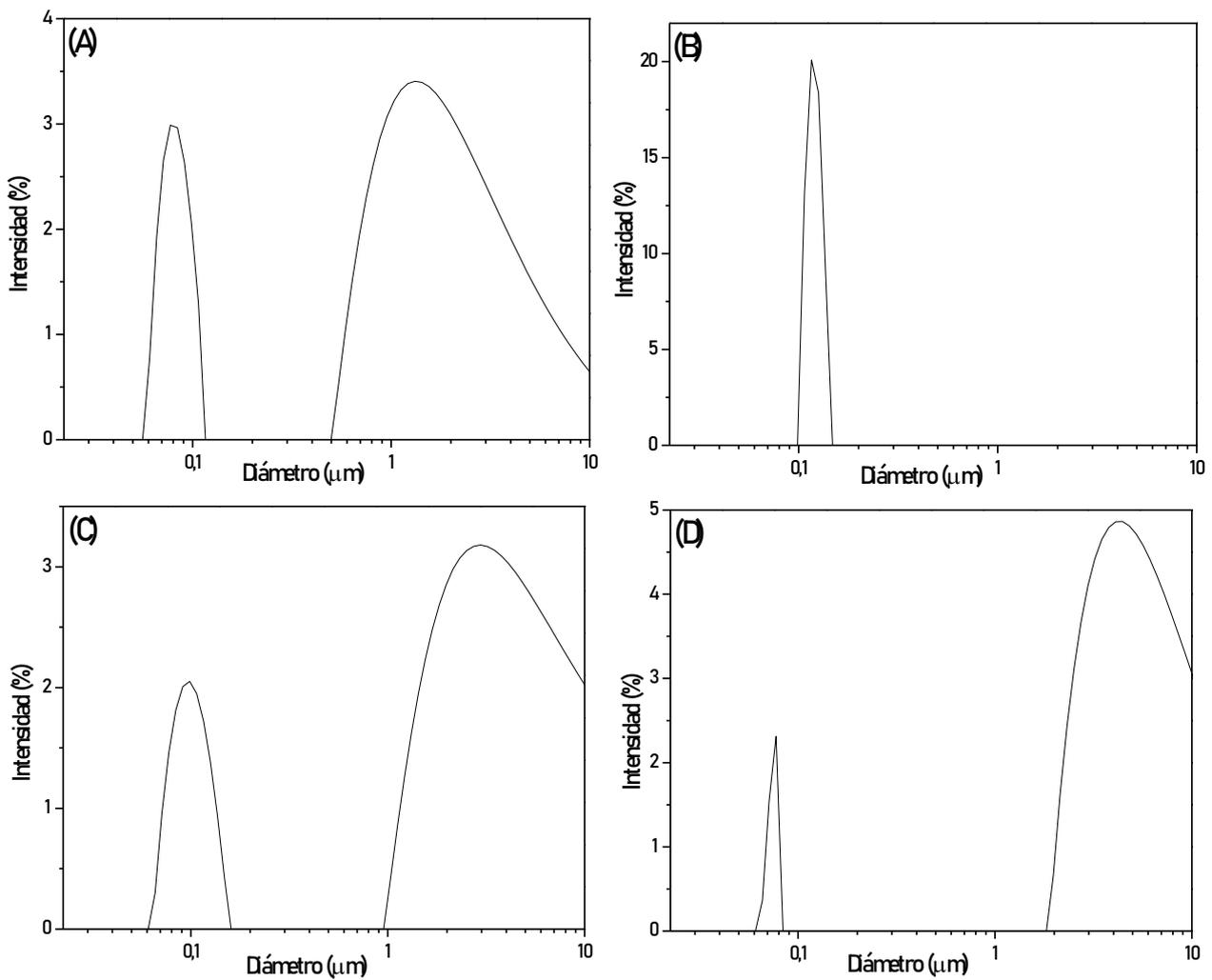
**Imagen IV.2** Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para los extractos obtenidos producto del tratamiento con GuHCl de las cepas de *L. kefir* S1 y S8. Se indica la masa molecular relativa de los marcadores de peso molecular (KDa).

#### IV.3.2.2 Dispersión de Luz Dinámica (DLS) y potencial Z

La DLS se ha utilizado para evaluar el tamaño y la oligomerización de varias partículas como proteínas, polímeros, micelas, carbohidratos y nanopartículas [Liu et al., 2016]. En el presente estudio, se utilizó DLS para determinar la monodispersidad o polidispersidad de las proteínas de capa S, determinar sus tamaño y el potencial Z. La figura IV.1 muestra la distribución del diámetro promedio (por porcentaje) en función de la intensidad de las moléculas presentes. Para la SLP S1 se observan dos poblaciones con diámetros de aproximadamente 100 y 1000 nm. Luego de ser sometidas a sonicación, las muestras de SLP S1 presentaron un único pico en 100 nm, mientras que la SLP S8 sonicada no mostró mayores modificaciones. El análisis de la SLP S8 sin sonicar presentó un pico en 100 nm y otro pico ancho en torno a los 3000 nm, mientras la SLP S8 sonicada mostró un pico en 70 nm y otro en los 3000nm. Según algunos estudios de DLS de SLP bacteriana, el diámetro esperado para la proteína de la capa S monomérica es cercano a los 10 nm-20 nm [Teixeira et al., 2010; Lakatos et al., 2015]. En este sentido, las mediciones por DLS de una muestra pueden indicar si las partículas se agregan, mostrando una mayor población de partículas con un radio creciente. Las distribuciones de tamaño polidispersas suelen ser asociaciones de diferentes poblaciones de moléculas o partículas, con mayor tendencia a

la agregación. Por ejemplo, Teixeira y col. (2010) demostraron la formación de agregados de proteína cuando la misma se almacenó durante más de tres semanas [Teixeira et al., 2010].

El análisis DLS de las SLP de ambas cepas presentó poblaciones polidispersas, con un aumento en los valores del radio hidrodinámico, lo que sugiere la presencia de agregados más grandes (figura IV.1). En este sentido, las SLP estudiadas mostraron una gran polidispersidad lo cual evidencia la presencia de agregados proteicos.



**Figura IV.1** Distribución del diámetro promedio de las SLP S1 (A), SLP S1 sonicada (B), SLP S8 (C), y SLP S8 sonicada (D)

Las dimensiones observadas para S1 y S8 concuerdan con las reportadas previamente para la SLP aislada de *Sporosarcina ureae* ATCC 13881(SsIA) [Varga, 2010]. Para la SsIA se reportó la presencia de agregados de 100 nm que fueron asociados a

estructuras proteicas tanto oligoméricas como de mayor grado de ordenamiento. En dicho trabajo se analizó el tamaño de los agregados proteicos en dos concentraciones de SslA distintas, 0,38 y 1 mg/mL. Los resultados indicaron que en ambas concentraciones se encuentran agregados de 100 nm que conforme avanza el tiempo incrementan su tamaño hasta alcanzar los 600 nm debido al autoensamblaje en solución que experimentan las SLP.

Por otro lado, se encontró que el potencial Z de las SLP S1 y S8 fue de  $2,8 \pm 0,1$  mV y  $2,4 \pm 0,1$  mV respectivamente. Es importante tener presente que, el punto isoeléctrico de una proteína es el pH en el que la misma posee una carga neta o potencial Z igual a cero. Una característica típica de las SLP de los *Lactobacillus* es poseer un  $pI > 9,4$ . Por lo tanto, las SLP en buffer Tris con pH 7 aproximadamente, deberían presentar un potencial Z positivo.

### IV.3.2.3 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

En la figura IV.2.1 se presentan los espectros FTIR obtenidos para las dos proteínas de capa-S extraídas.

Los espectros obtenidos para ambas proteínas de capa-S mostraron señales típicas reportadas en la literatura, como la banda ancha centrada en  $3300 \text{ cm}^{-1}$  producto de las vibraciones de estiramiento N-H ( $\nu\text{N-H}$ ), una banda a  $1650\text{-}1660 \text{ cm}^{-1}$  asignada principalmente a la vibración de estiramiento del enlace C=O conocida como Amida I ( $\nu\text{C=O}$ ), una banda ubicada a  $1535 \text{ cm}^{-1}$  asociada a la combinación del estiramiento C-N (40%) y la flexión en el plano del grupo N-H (60%), conocida como Amida II, y la banda Amida III que se encuentra en  $1200\text{-}1300 \text{ cm}^{-1}$  y se debe al acoplamiento en fase del estiramiento C-N ( $\nu\text{C-N}$ ) con la flexión N-H ( $\delta\text{N-H}$ ) [Barth, 2007; Glassford et al., 2013]. Se observa también otra banda de absorción, a  $1030\text{-}1060 \text{ cm}^{-1}$  asignada a la superposición de los estiramientos C-O ( $\nu\text{C-O}$ ), C-C ( $\nu\text{C-C}$ ) y la flexión del enlace C-OH ( $\delta\text{C-OH}$ ) debida a la presencia de carbohidratos en estas glicoproteínas [Lewis et al., 2013; Ami et al., 2013]. Las asignaciones de las principales bandas de absorción se detallan en la tabla IV.3.

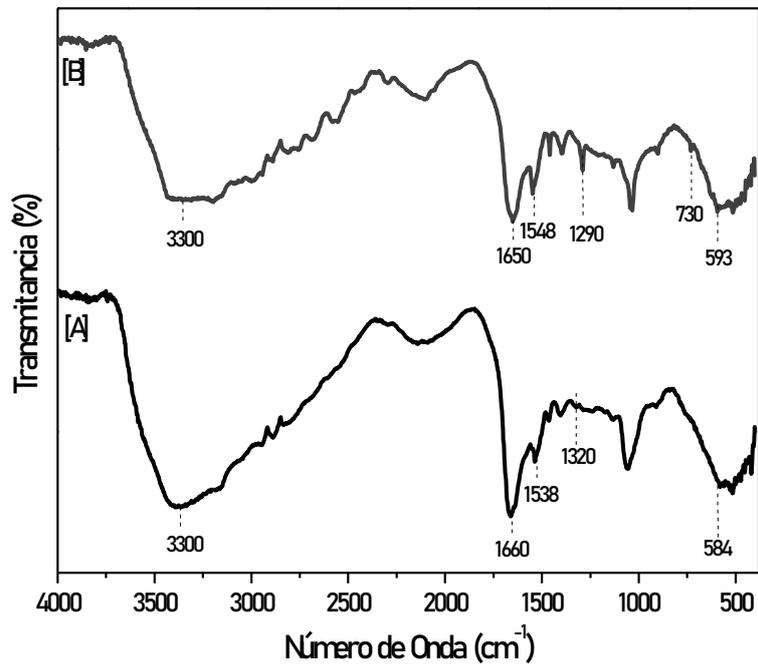


Figura IV.2.1 FTIR proteínas de capa-S (A) S1 (B) S8

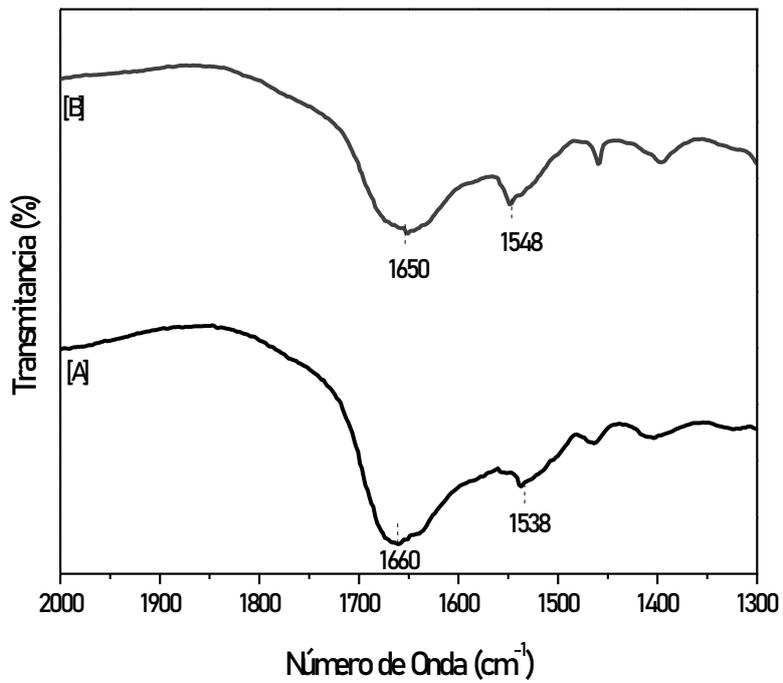


Figura IV.2.2 FTIR en la región de la banda Amida I de proteínas de capa-S (A) S1 (B) S8

**Tabla IV.3** Asignación de las principales bandas de absorción en la región infrarroja de las proteínas de capa-S [Arrondo et al., 1993].

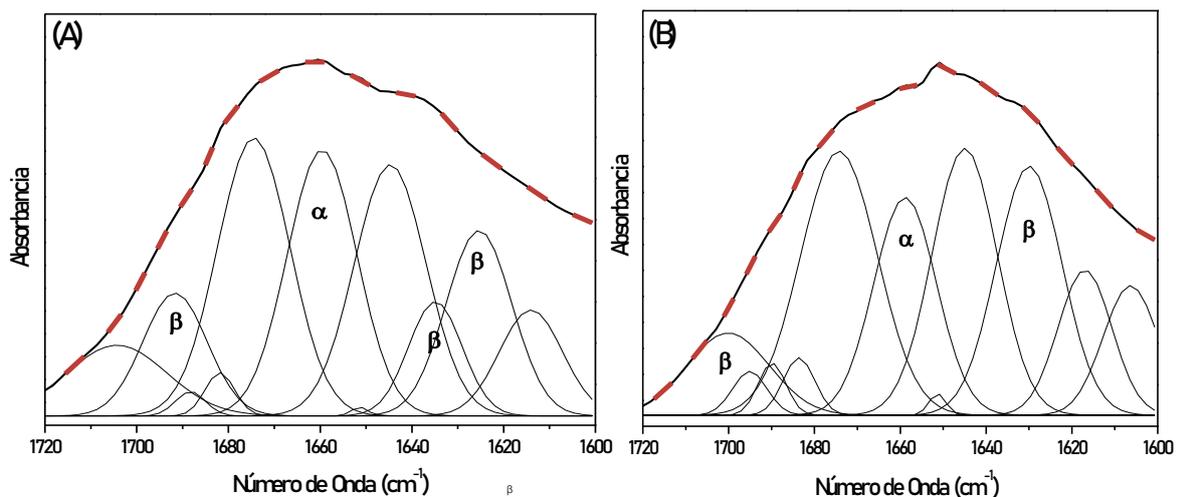
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	GRUPO FUNCIONAL	MODO VIBRACIONAL	DENOMINACIÓN DE LA BANDA
3300	NH	vN-H	Amida A
1650-1660	CO, CN	vC=O (80%), vC-N, δC-C-N	Amida I
1550	NH	δN-H (60%), vC-N (40%) en el plano	Amida II
1290-1320	CH	vC-N (40%), δN-H (30%), vC-C (20%)	Amida III
730		δN-H, vC-N	Amida V
584-593	N=C=O	δC=O, vC-N	Amida VI

La Figura IV.2.2 muestra los espectros de las proteínas en la región Amida I. La banda ancha de amida I centrada cerca de 1650 cm<sup>-1</sup> para S8 es característica de una estructura desordenada [Barth, 2007], mientras que el máximo a 1660 cm<sup>-1</sup> sugiere una estructura más compleja como una  $\alpha$ -hélice superpuesta con un tramo *random coil* para la proteína S1 [Glassford et al., 2013]. Además, existe una correlación entre la ubicación del máximo de la banda Amida I de las proteínas y la informada por Mobili y col. (2009), quienes reportaron que las proteínas de capa-S con un máximo de banda centrado en 1660 cm<sup>-1</sup> (S1) se extrajeron de cepas no agregantes de *L. kefir*, mientras que la proteína con un máximo de 1650 cm<sup>-1</sup> se aisló de una cepa con capacidad de agregación.

La banda Amida I proviene fundamentalmente (en un 80%) de un solo tipo de modo vibracional, cuya posición y forma depende de la estructura de la secundaria de la proteína y se ve poco afectada por la naturaleza de los residuos de los aminoácidos que componen la cadena proteica. Por esto, es la señal más utilizada para obtener información sobre la estructura secundaria de las proteínas. Mediante el análisis de la derivada segunda de los espectros de cada proteína, se estimó el número, la posición y la contribución relativa de los elementos individuales que componen la banda Amida I (1600-1720 cm<sup>-1</sup>). La información se tuvo en cuenta para ajustar dicha banda con un perfil gaussiano, utilizando OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, ESTADOS UNIDOS). Para esto, se utilizaron las asignaciones de las frecuencias a las estructuras secundarias proteicas que contribuyen a la banda Amida I descritas previamente en la literatura y que se encuentran presentadas en la tabla IV.4. El ajuste de la banda Amida I empleando funciones Gaussianas presentado en la figura IV.3 permitió estimar el porcentaje de las estructuras  $\alpha$  y  $\beta$  presentes en cada una de las proteínas aisladas.

**Tabla IV.4** Asignación de las principales bandas de absorción en la región Amida I [Torii & Tasumi, 1996]

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Estructura secundaria asignada
1620-1630	Lamina β (intermolecular)
1630-1640	Lamina β (intramolecular)
1640-1650	Sin Orden
1650-1660	α hélice
1660-1695	giros β
1675	Lamina β (intramolecular)
1690-1700	Lamina β (intermolecular)



**Figura IV.3** Espectros FTIR y ajuste de curvas en la región Amida I para las SLP S1 (A) y S8 (B). Se muestran los componentes gaussianos individuales junto a sus asignaciones (trazo continuo) y el mejor ajuste (trazo discontinuo).

La composición de la banda amida I en el caso de la proteína S1 fue de un 16,1% α-hélice, 46,0% lámina-β y 39,0% de otros componentes (giros β y regiones sin orden). Por su parte, la proteína S8 presentó un 13,0% α-hélice, 25,2% lámina-β y 61,8% de otros componentes. Los resultados obtenidos y la relación α/β observado para las proteínas coinciden con lo observado por Mobili y col. para proteínas de capa-S de características similares [Mobili et al., 2009].

Empleando la secuencia de aminoácidos de cada proteína, reportadas previamente por Malamud y col. (2017), se realizó la predicción de la estructura secundaria utilizando el

método de Rost y Sander (<http://www.predictprotein.org>) [Rost & Sander, 1993]. La estimación arrojó para la proteína S1 un 14,4% y un 36,6% de estructuras  $\alpha$ -hélice y lámina- $\beta$  respectivamente. Por otro lado, la predicción para la proteína S8 fue de un 8,2% y 37,6% de estructuras  $\alpha$ -hélice y lámina- $\beta$  respectivamente. Ambas estrategias (método de Rost y Sander; FTIR) coincidieron en las tendencias que arrojaron en cuanto a la presencia de mayor porcentaje de estructura lámina- $\beta$  respecto a  $\alpha$ -hélice para las dos proteínas, siendo las cantidades relativas de estas estructuras (obtenida por cada método) similares sólo para S1. Estas discrepancias podrían estar relacionadas con el hecho de que, entre otros aspectos, la predicción empleando el método de Rost y Sander omite la glicosilación de las proteínas [Malamud et al, 2017].

Mobili y col. (2009) han asociado el porcentaje de lámina- $\beta$  con la capacidad agregante de la cepa bacteriana de la que se extrajo la proteína. En este sentido, las proteínas de capa-S aisladas desde cepas con capacidad agregante presentaron aproximadamente un 25% de esta estructura, mientras que las obtenidas de cepas no agregantes presentaron valores superiores al 40%. Los resultados obtenidos en esta tesis mediante el análisis realizado por FTIR son acordes a la generalización presentada, dada la naturaleza agregante de la cepa de la cual se extrajo la proteína S8 y la naturaleza no agregante de la cepa de la que se extrajo la proteína S1.

#### IV.3.2.4 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

Con el fin de conocer el arreglo estructural que presentan las proteínas de capa-S aisladas, se obtuvieron imágenes de microscopía TEM. En la Imagen IV.3 se muestran las micrografías obtenidas para las proteínas purificadas. En ambos casos se observan arreglos regulares 2D de la proteína compuestos por subunidades que poseen una dimensión de entre 3 y 30 nm.

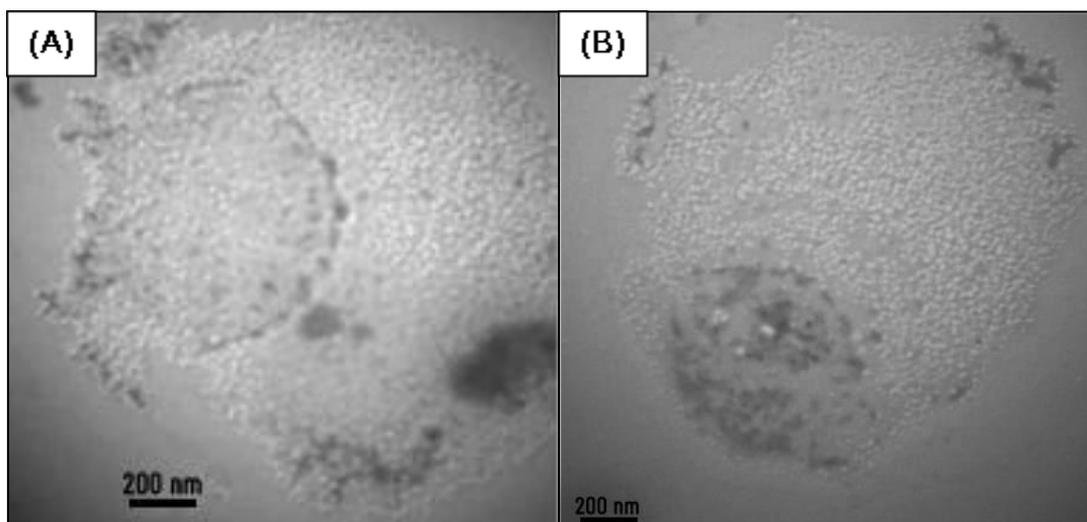


Imagen IV.3 Micrografías TEM de las proteínas de capa-S S8 (A) y S1 (B)

La imagen IV.4 (A) muestra la geometría adoptada por el arreglo regular bidimensional para el caso de la proteína S8. En la misma se observan subunidades dispuestas en una organización hexagonal (p6), el tamaño de la celda unidad es de alrededor de 3 nm con poros de aproximadamente 1,5 nm. Como se aprecia en la imagen aumentada la simetría p6 se caracteriza por contar con 6 proteínas por unidad morfológica.

En el caso de la proteína S1 se observaron arreglos regulares que exhibieron una simetría oblicua (p1) como puede verse en la imagen IV.4 (B).

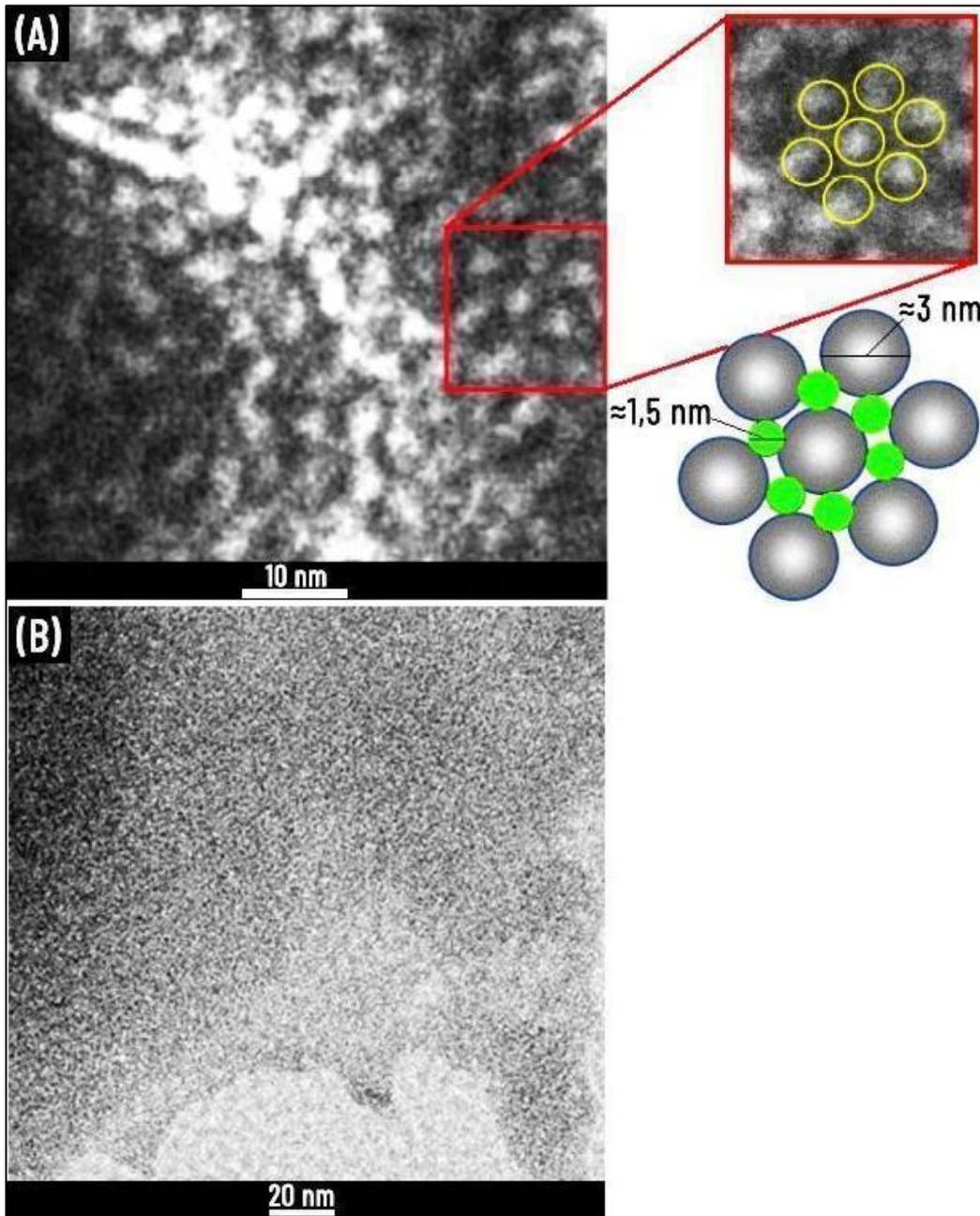


Imagen IV.4 Micrografía TEM de la SLP S8 (A), imagen aumentada y representación gráfica del arreglo p6, y de SLP S1 (B)

El tamaño de celda unidad determinado por TEM en este trabajo (3 nm) es algo inferior al tamaño determinado por Gerbino (2013) de 5 nm para la S8. Sin embargo, cabe destacar que por tratarse de determinaciones realizadas empleando dos técnicas distintas, AFM y TEM, los valores se encuentran en concordancia.

En trabajos previos se ha reportado la caracterización de la geometría espacial empleando microscopía de transmisión electrónica de SLP pertenecientes a otras bacterias del género *Lactobacillus*. En el caso del *L. buchneri* se observó una SLP con geometría hexagonal (p6) formada por subunidades de 2 nm de diámetro y distancias centro-centro de 6 nm [Masuda & Kawata, 1981]. Para las SLP aisladas de *L. acidophilus*, *L. helveticus* y *L. brevis* se reportó una geometría espacial oblicua (p1) con parámetros de red similares entre sí. En el caso de la SLP aislada de *L. helveticus* se reportaron parámetros de red de 4,5 nm 9,6 nm y 77° para a, b y el ángulo respectivamente [Lortal et al., 1992]. Por su parte, el arreglo regular de SLP de *L. acidophilus* se caracterizó por tener un valor de a=11,8 nm; b= 5,3 nm y un ángulo de 102° [Smit et al., 2001]. Finalmente, la SLP de *L. brevis* fue en primera instancia caracterizada con una simetría tetragonal [Masuda & Kawata, 1979; Masuda & Kawata, 1980], pero finalmente se reportó una simetría oblicua con parámetros de red a=9,39 nm, b=6,10 nm y un ángulo de 79,8° [Avall-Jaaskelainen et al., 2008]. En líneas generales, teniendo en cuenta lo reportado por Gerbino en su tesis doctoral (2013), las observaciones, parámetros y caracterización analizados en este trabajo se encuentran en el rango de lo esperado en base a los reportes previos para el estudio de SLP de otras especies de *Lactobacillus*.

## IV.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Empleando el protocolo propuesto se logró extraer las proteínas de capa-S de dos cepas bacterianas de *L. kefir*. El agente caotrópico empleado (cloruro de guanidinio) logró extraer ambas proteínas de capa-S permitiendo el aislamiento de las mismas desde la superficie bacteriana.

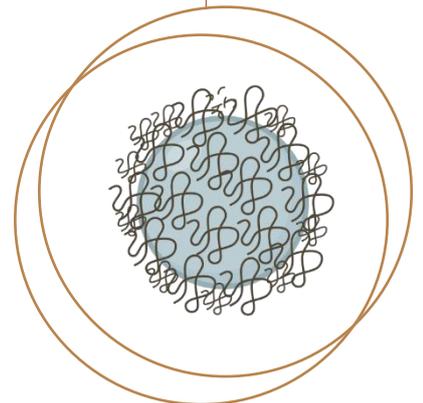
La caracterización de las SLP S1 y S8 indica que poseen un peso molecular de 67 y 69 kDa respectivamente. Los arreglos estructurales 2D presentados por las proteínas evidenciaron una simetría p6 para la SLP S8 y p1 para la S1.

El tamaño de los arreglos proteicos en suspensión resultó de aproximadamente 100 nm, y los espectros FTIR de ambas presentaron las bandas características asociadas a glicoproteínas de este tipo.

# V

## Capítulo V

# OBTENCIÓN DE LOS SISTEMAS POLÍMERO/PROTEÍNA



En el presente capítulo se presenta el estudio del comportamiento de adsorción (isotermas) de las proteínas de capa-S sobre las distintas partículas poliméricas sintetizadas con la finalidad de estudiar la influencia de las características de las partículas y las proteínas en este proceso. Además, se describe la preparación y caracterización de los sistemas polímero/proteína que se utilizarán como soporte para la síntesis de nanopartículas metálicas

## V. OBTENCIÓN DE LOS SISTEMAS POLÍMERO/PROTEÍNA

### V.1 INTRODUCCIÓN

#### V.1.1 Adsorción de proteínas de capa-S a superficies poliméricas

Las proteínas de capa-S aisladas tienen la capacidad de autoensamblarse sobre diversas superficies, entre las que se destacan las superficies poliméricas. En este sentido, y con el propósito de explotar las particulares propiedades de las SLP, se ha reportado en diversos trabajos el estudio del comportamiento de adsorción de las SLP sobre superficies poliméricas de diversa naturaleza química y morfológica.

La densidad de carga superficial tiene un rol crucial en la adsorción de proteínas de capa-S, tal es así que Toca-Herrera y col. (2005) lograron obtener arreglos regulares de SLP SbpA únicamente sobre superficies de polielectrolitos con densidad de carga negativa (poli(4-estirensulfonato de sodio)), mientras que no observaron adsorción sobre superficies con densidad de carga positiva (poli(clorhidrato de alilamina)). Utilizando como referencia la proteína adsorbida sobre láminas de SiO<sub>2</sub>, observaron que los polielectrolitos incrementaban las propiedades mecánicas de las mismas. Con los polielectrolitos mencionados obtuvieron capsulas sobre las que lograron recubrimientos con la SLP empleada. Dicho recubrimiento resultó en sistemas cuyo potencial Z (al igual que el de las capsulas poliméricas) fue negativo, por lo que en el trabajo se sugirió que las proteínas interactuaron con el sistema exponiendo en superficie sus residuos con densidad de carga negativa pertenecientes al extremo C-terminal.

Delcea y col. (2008) lograron depositar una capa regular y cristalina de SLP aisladas de *Bacillus sphaericus* CCM 2177 (Sbp A) sobre una multicapa con densidad de carga negativa sin observarse cambios en la estructura de la misma, cabe destacar que la proteína adsorbida presentó un aumento de su temperatura de desnaturalización y una mejora de sus propiedades mecánicas.

Moreno Cencerrado y col. (2016) emplearon sistemas poliméricos tipo cepillo para la adsorción de SLP aislada de *Lysinibacillus sphaericus* CCM2177. En primer lugar, analizaron dos sistemas tipo cepillo compuestos por PSPM (poli(metacrilato de sulfopropilo)) y PNIPAM (poli(N-isopropiacrilamida) (con y sin densidad de carga negativa, respectivamente). En ambos casos, las superficies no resultaron adecuadas para la adsorción de SLP. Sin embargo, al funcionalizar las cadenas con restos de PMETAC (poli-cloruro de metacrililoiloxi etil trimetilamonio) de carga positiva, lograron inducir la adsorción de proteína.

Con el objetivo de analizar el impacto de la hidrofiliidad de la superficie sobre la adsorción de proteínas de capa-S aisladas de *Lysinibacillus sphaericus* CCM 2177, Iturri y col. (2017) realizaron ensayos de interacción entre las proteínas y soportes de SiO<sub>2</sub> tratados hasta obtener una superficie hidrofílica (con UV/ozono) y una hidrofóbica (con fluorosilano). Observaron que en el soporte hidrofóbico la adsorción se llevó a cabo rápidamente y en un

proceso de dos pasos, mientras que en la plataforma hidrofílica la adsorción fue mucho más lenta y en una etapa.

López y col. (2011) analizaron la influencia de la química superficial en la adsorción de la SLP Sbp A, mediante el empleo de distintas superficies de monocapas autoensambladas conteniendo diferentes funcionalidades como metilo, hidroxilo, carboxilo y sustituyentes como manosa ( $C_6H_{12}O_6$ ). En dicho trabajo se reportó que la capa de proteína adsorbida sobre la superficie hidrofóbica (metilada) fue más homogénea y presentó dominios cristalinos, mientras que la depositada sobre la superficie hidroxilada resultó amorfa. En la superficie carboxilada se observó que, cuando se exponen grupos carboxilatos, la adsorción es dos veces más rápida y se da en mayor cantidad que a pH ácido, a diferencia de lo reportado por Iturri y col. (2017).

En este sentido, los estudios demuestran la importancia que tienen las características de las superficies poliméricas sobre el comportamiento de adsorción de las proteínas, cumpliendo el estudio de este fenómeno un rol clave en el diseño racional de sistemas funcionales en los que se exploten, e incluso optimicen, las propiedades de las mismas. No se han reportado trabajos que aborden el estudio de la adsorción de SLP de *Lactobacillus kefir* sobre partículas poliméricas, por lo que es necesario explorar este aspecto con el fin de avanzar en su aplicación tecnológica. Bajo esta premisa, en este trabajo se propone el análisis de la conducta de adsorción de dos SLP sobre partículas poliméricas en dispersión acuosa diseñadas para tal fin, recurriendo para esto al modelado de las isotermas de adsorción.

## V.1.2 Isotermas de Adsorción

Las relaciones de equilibrio entre adsorbentes y adsorbatos se pueden describir mediante isotermas de adsorción que dan idea de la capacidad adsorbente de un material para un adsorbato determinado. Las isotermas pueden ser obtenidas examinando experimentos en *batch* a una temperatura determinada.

El equilibrio de adsorción se alcanza cuando la cantidad de adsorbato que se adsorbe sobre el adsorbente iguala a la cantidad que se desorbe del mismo. En este punto la concentración de adsorbato en equilibrio permanece constante [Allen et al., 2002].

Diversos modelos de isotermas de adsorción se han desarrollado para describir el comportamiento observado, los que se describirán brevemente a continuación.

### V.1.2.1 Modelo de Langmuir

Este modelo empírico asume una adsorción en monocapa (la capa adsorbida tiene el espesor de una molécula de adsorbato), considerando que la adsorción solo puede ocurrir en un número finito (fijo) de sitios localizados y definidos que son idénticos y equivalentes, sin interacción lateral ni impedimento estérico entre las moléculas adsorbidas incluso en sitios adyacentes. En otras palabras, la isoterma de Langmuir describe una adsorción homogénea en la que cada molécula posee una entalpía y energía de activación

de adsorción constantes (el adsorbato posee la misma afinidad por todos los sitios disponibles), sin transmigración del adsorbato en el plano de la superficie. Gráficamente, se caracteriza por un aumento en la adsorción con el incremento de la concentración del adsorbato medio hasta alcanzar una meseta (una saturación de equilibrio), situación en la que ya no puede tener lugar la adsorción [Langmuir, 1918].

En este modelo,  $q_e$  representa la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área ( $\text{mg}/\text{m}^2$ ), definida según:

$$q_e = q_m \frac{K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad \text{Ecuación V.1}$$

donde  $q_m$  es la máxima cantidad de proteína adsorbida en la condición de equilibrio,  $C_e$  la concentración de proteína y  $K_L$  ( $\text{m}^2/\text{mg}$ ) la constante de adsorción. Por otro lado, la cantidad máxima de proteína adsorbida,  $q_m$  se relaciona con el peso molecular ( $M$ ) de la proteína según:

$$q_m = \frac{M}{AN_A} \quad \text{Ecuación V.2}$$

donde  $N_A$  es el número de Avogadro y  $A$  ( $\text{m}^2$ ) representa el área superficial de cada sitio de adsorción, es decir el área que ocupa una molécula de adsorbato sobre la superficie del adsorbente.

Para establecer la validez de las asunciones sobre sitios independientes y afinidad equivalente, la ecuación de Langmuir se puede linealizar de varias formas obteniéndose los gráficos conocidos como: semiréciproco, doble-réciproco y de Scatchard. Las distintas linealizaciones permiten determinar los valores de los parámetros del ajuste, obteniéndose resultados distintos según la linealización empleada.

Los parámetros de interés  $A$ ,  $q_m$  y  $K_L$  pueden determinarse mediante el ajuste del gráfico  $C_e/q_e$  vs  $C_e$  conocido como Langmuir-1 (semiréciproco) según:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{C_e}{q_m} + \frac{1}{K_L q_m} \quad \text{Ecuación V.3}$$

La pendiente de la recta resultante es la inversa de la concentración máxima adsorbida y, por lo tanto, da una medida del área ocupada por proteína adsorbida. La constante de adsorción  $K_a$  se obtiene dividiendo la pendiente de la curva sobre la ordenada al origen de la misma [Young, 1988].

El grado de ajuste de los datos experimentales al comportamiento Langmuireano puede evaluarse también mediante el análisis gráfico conocido como doble-réciproco o Langmuir-2 ( $1/q_e$  vs  $1/C_e$ ):

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m} \quad \text{Ecuación V.4}$$

Finalmente, el gráfico de Scatchard responde a la siguiente ecuación:

$$\frac{q_e}{C_e} = \frac{q_m}{K_L} - \frac{q_e}{K_L} \quad \text{Ecuación V.5}$$

La forma del gráfico  $q_e/C_e$  vs  $q_e$  es particularmente sensible a la independencia, dependencia no idéntica o interacción cooperativa en el enlace del adsorbato a la superficie. Si el gráfico es convexo indica una cooperatividad negativa, si es lineal la interacción es independiente entre el adsorbato y los sitios de adsorción y finalmente, si es asintótico o cóncavo indica cooperatividad positiva [Sharma y Agarwal, 2001].

### V.1.2.2 Modelo de Freundlich

La isoterma de Freundlich es la relación más antigua conocida para describir la adsorción no ideal y reversible, ya que no está restringida a la formación de una monocapa. Este modelo empírico se puede aplicar a una adsorción multicapa, con una distribución no uniforme del calor de adsorción y afinidades de los sitios sobre la superficie del adsorbente. Desde esta perspectiva, la cantidad adsorbida será la suma de la adsorción en todos los sitios (cada uno con una energía de enlace puntual), donde el sitio con mayor fuerza de unión será el primero en ocuparse, y luego la energía de adsorción disminuirá exponencialmente hasta finalizar el proceso. En la actualidad, la isoterma de Freundlich se aplica ampliamente en sistemas heterogéneos especialmente para compuestos orgánicos o especies altamente interactivas. La expresión de Freundlich es una ecuación exponencial y, por lo tanto, asume que conforme aumenta la concentración del adsorbato lo hace también la concentración de este adsorbida en la superficie del adsorbente. Teóricamente, usando esta expresión, la cantidad adsorbida podría ser infinita [Freundlich, 1906].

Nuevamente, en este modelo  $q_e$  representa la cantidad de proteína adsorbida por unidad de área, cuya expresión es la siguiente

$$q_e = K_F C_e^n \quad \text{Ecuación V.6}$$

donde  $C_e$  es la concentración de proteína y  $K_F [(mg/mL)(mL/mg)^{1/n}]$  la constante de adsorción.

Este modelo se caracteriza por la presencia del factor de heterogeneidad ( $n$ ), motivo por el cual puede emplearse para modelar sistemas heterogéneos en cuanto a la energía de los sitios (a diferencia del modelo de Langmuir). Cuanto más se acerque este factor a cero, más heterogénea será la superficie. El efecto de la heterogeneidad de la superficie suele ser más marcado cuando la interacción adsorbente-adsorbato es más fuerte [Haghseresht et al., 1998]. Para sitios de adsorción puramente independientes y que no interactúan, el valor de  $n$  es igual a 1. Dentro de las fuentes de heterogeneidad se encuentra la interacción entre sitios, en este sentido, cuando  $n$  toma valores superiores a 1, sugiere una adsorción cooperativa positiva, mientras que cuando  $n$  toma valores entre 0 y 1 la cooperatividad es negativa. El valor de  $n$  puede, por lo tanto, emplearse como un coeficiente empírico que representa el tipo y el alcance de la cooperatividad presente en la unión adsorbato-adsorbente [Sharma & Agarwal, 2001]. Un parámetro de cooperatividad

negativo ( $n < 1$ ), describe un cambio en la afinidad del adsorbato (constante de equilibrio) debido a un mecanismo de ajuste inducido, mediante el cual el primer sustrato unido induce un cambio estructural en el sitio de anclaje vecino para un segundo sustrato haciendo que este último tenga una menor afinidad por el sitio [Sugimoto et al., 2012].

El análisis de la adecuación de los datos experimentales al comportamiento tipo Freundlich suele realizarse mediante el ajuste lineal según:

$$\log(q_e) = \log(K_F) + n \log(C_e) \quad \text{Ecuación V.7}$$

### V.1.2.3 Modelo de Langmuir-Freundlich

Si bien el modelo de Langmuir, inicialmente diseñado para la adsorción de gases, fue ampliamente utilizado para analizar la adsorción de proteínas tanto cualitativa como cuantitativamente, en muchos casos ha resultado ser inadecuado para este fin debido a la gran diferencia de tamaño entre las moléculas de proteínas y las pequeñas moléculas gaseosas para las que se desarrolló originalmente. La desviación a la conducta Langmuireana surge principalmente debido a:

- I. La unión de en múltiples sitios para las proteínas, que a menudo resultan en una adsorción irreversible,
- II. La naturaleza heterogénea de la mayoría de las superficies sólidas
- III. La existencia de interacciones laterales y otras interacciones cooperativas entre las proteínas adsorbidas

Para resolver estas inadecuaciones al comportamiento se desarrollaron en los últimos años otros modelos como el Temkin, Langmuir-Freundlich, Bilangmuir y la extensión Langmuir (multicapa) [Sharma y Agarwal, 2000].

La isoterma de Langmuir-Freundlich se fundamenta en una ecuación empírica ampliamente utilizada debido a su capacidad de describir exitosamente el comportamiento de múltiples sistemas. El modelo posee cuatro parámetros independientes, lo cual otorga al ajuste mayor libertad en comparación con el modelo de Langmuir. Por otro lado, el modelo contempla la existencia de una concentración máxima, o saturación del adsorbente, lo cual lo diferencia del modelo de Freundlich [Malek & Farooq, 1996].

El modelo permite aplicar el ajuste a sistemas cuya superficie adsorbente presente un determinado grado de heterogeneidad y una multiplicidad de interacciones entre los componentes, siendo su expresión matemática la siguiente:

$$q_e = q_m \frac{K_{LF} C_e^n}{1 + K_{LF} C_e^n} \quad \text{Ecuación V.8}$$

donde  $K_{LF}$  es la constante aparente de disociación del sistema,  $q_m$  es la máxima cantidad de adsorbato que tolera el adsorbente, y  $n$  es el coeficiente Langmuir-Freundlich cuyas implicancias fenomenológicas son las mismas que las que tiene en el modelo de Freundlich, descrito en la sección V.1.2.2.

### V.1.2.4 Modelo de Temkin

Este modelo se ha utilizado para describir la adsorción reversible de proteínas a pesar de haber sido desarrollado inicialmente para modelar la adsorción de gases a superficies heterogéneas. El modelo asume una adsorción caracterizada por una distribución uniforme de energía de enlace entre los sitios, existiendo una energía de enlace máxima ( $\Delta G_{\max}$ ). La ecuación que describe este comportamiento es la siguiente:

$$q_e = q_m \ln (1 + K_T * C_e) \quad \text{Ecuación V.9}$$

donde  $K_T$  es la constante de equilibrio de enlace correspondiente a la máxima energía de enlace  $\{K_T = \exp(-\Delta G_{\max}/RT)\}$ ,  $C_e$  es la concentración de proteína en la solución, y  $q_m$  es la capacidad superficial para la adsorción de proteínas por unidad de enlace.

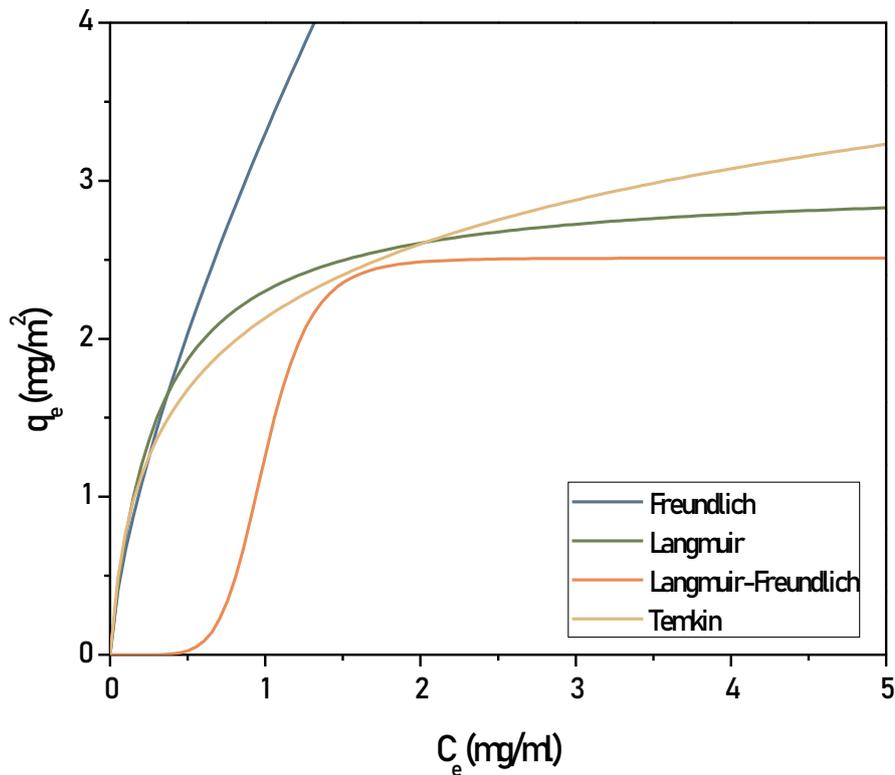
La isoterma de Temkin ofrece algunas ventajas sobre los otros modelos presentados para explicar la naturaleza heterogénea de la adsorción de proteínas en varios adsorbentes (incluso implicando interacciones por intercambio iónico y de afinidad). La principal ventaja es que para coberturas bajas a moderadas, la adsorción se describe mediante dos parámetros físicamente significativos, que se puede determinar por experimentos de adsorción en equilibrio [Sharma y Agarwal, 2000].

### V.1.2.5 Comparación entre los modelos

Los parámetros fisicoquímicos obtenidos producto del ajuste de las isotermas junto con los supuestos propios de cada modelo, proporcionan una idea del mecanismo de adsorción, las propiedades de la superficie, y el grado de afinidad de los adsorbatos por los adsorbentes.

En la isoterma de Langmuir, la constante de adsorción  $K_L$  indica la relación entre la tasa de adsorción y desorción del sistema, mientras que en la isoterma de Freundlich, la constante de adsorción  $K_F$  está estrechamente relacionada con la afinidad de las moléculas de adsorbato por el adsorbente [Yoon et al., 1996].

Como se puede observar en la figura V.1, y tal como se describió previamente, el modelo de Freundlich no contempla la existencia de una concentración máxima o de saturación por lo que en los gráficos de las isotermas que se ajusten a este modelo no se observará un *plateau*. Por otro lado, tanto el modelo de Langmuir como el de Langmuir-Freundlich se caracterizan por exhibir un *plateau*, sin embargo, se diferencian en la conducta a bajas concentraciones, zona en la cual el último modelo mencionado presenta un crecimiento menos marcado con posibilidad de comportamiento sigmoideo en función del valor de la constante.



**Figura V.1** Comparación teórica de los modelos de Freundlich, Langmuir, Langmuir-Freundlich y Temkin. Para una mejor apreciación de las diferencias las constantes se han modificado hasta lograr una apariencia adecuada de las curvas.

### V.1.2.6 Selección del mejor ajuste

La comparación en el ajuste de los datos experimentales entre los dos modelos se basó en el error relativo promedio (ARE, acrónimo del inglés *Average Relative Error*) según:

$$\text{ARE} = \left( \frac{1}{N} \right) \sum \left| \frac{C_{e\text{eq}}^{\text{calc}} - C_{e\text{eq}}^{\text{exp}}}{C_{e\text{eq}}^{\text{exp}}} \right| \quad \text{Ecuación V.10}$$

Este error relativo indica la tendencia a sobre o subestimar los datos experimentales intentando minimizar el error fraccional en todo el rango de concentraciones empleado [Kapoor & Yang, 1989].

Otros parámetros estadísticos utilizados típicamente para analizar la bondad de ajuste son:

- Suma Residual de Cuadrados (RSS):

$$RSS(X, \hat{\theta}) = \sum_{i=1}^n w_i [Y_i - f(X'_i, \hat{\theta})]^2 \quad \text{Ecuación V.11}$$

- $X^2$  reducido ( $X^2$ ):

$$X^2 = \frac{RSS}{df_{error}} \quad \text{Ecuación V.12}$$

donde  $df_{error}$  son los grados de libertad del error.

- $R^2(ad)$ :

$$\bar{R}^2 = 1 - \frac{RSS/df_{error}}{TSS/df_{total}} \quad \text{Ecuación V.13}$$

Donde TSS es la suma de cuadrados totales, y  $df_{total}$  los grados de libertad totales del modelo.  $R^2$  ajustado representa la fracción de la variación total que es representada por el modelo.

## V.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### V.2.1 Reactivos y Buffers

Los reactivos a utilizar en esta sección ya fueron descritos en los capítulos previos.

### V.2.2 Construcción de las isotermas de adsorción

Para la obtención de las isotermas de adsorción se prepararon siete relaciones de concentración polímero/proteína, para cada serie resultante de combinar las dos proteínas de capa-S aisladas y las cuatro dispersiones de polímeros obtenidas.

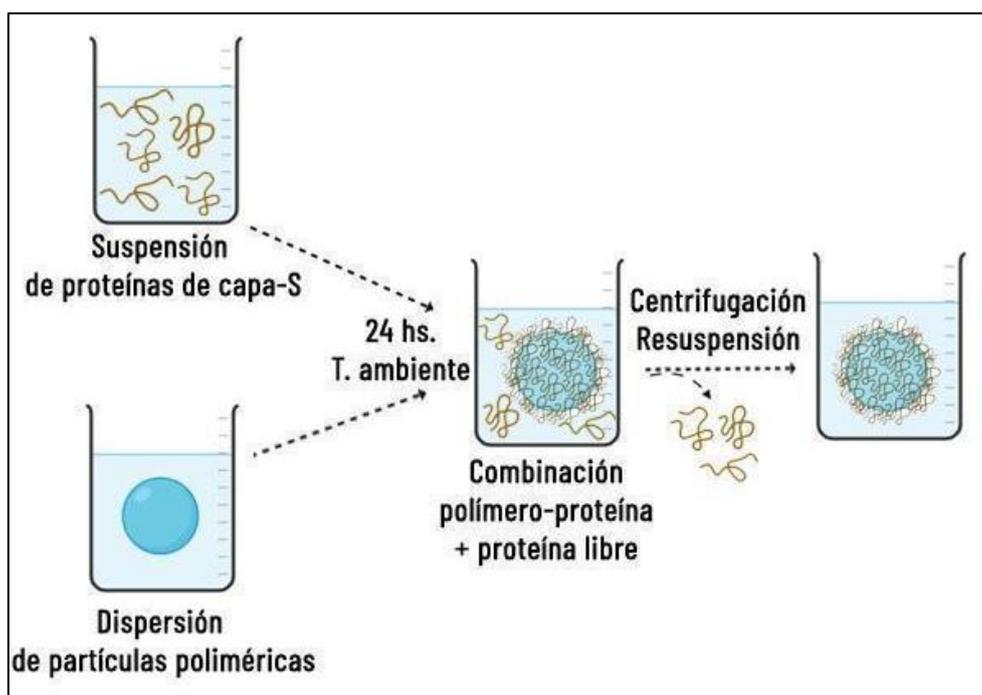
El protocolo experimental utilizado para obtener las isotermas se basó en el establecido previamente por Witteman y col. (2006).

Las adsorciones físicas se llevaron a cabo combinando una determinada cantidad de la solución de las proteínas S1 o S8 en buffer B (2,5 mg/ml proteína en buffer); con 0,45 mL de dispersión acuosa 1 %p/p del polímero, en toda la isoterma la concentración final del polímero en la combinación (0,45 %p/p) se mantuvo constante. En todos los casos se completó a un volumen final de 1,00 ml empleando buffer Tris-EDTA, logrando mantener así la fuerza iónica del medio constante en un valor de 0,03 M en todas las combinaciones analizadas. Los detalles de las cantidades combinadas se presentan en la Tabla V.1. Cada punto de una isoterma se preparó por triplicado.

Luego de combinar las soluciones mencionadas, la mezcla se mantuvo a 25°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13500 rpm y 25 ° C, posteriormente se extrajo el sobrenadante conteniendo la proteína libre y se lo reservó para la cuantificación de la misma. El *pellet* conformado por

los sistemas polímero/proteína fue resuspendido en un 1,00 mL de buffer B y se reservó para su caracterización. En el esquema V.1 se representa el proceso empleado

Las condiciones utilizadas en los pasos de centrifugación-redispersión fueron seleccionadas en base a ensayos previos diseñados para optimizar el proceso de separación (ver Anexo I). Debido a que el pH al que se llevaron a cabo los estudios de adsorción es inferior al punto isoeléctrico de las proteínas ambas se encuentran con una carga eléctrica global positiva en las condiciones experimentales. La cantidad de proteína libre se determinó utilizando la técnica colorimétrica de Bradford según el procedimiento descrito en el Capítulo IV. La cantidad de proteína adsorbida se determinó por diferencia.



Esquema V.1 Ilustración esquemática de los experimentos de adsorción de proteínas de capa-S sobre superficies poliméricas

**Tabla V.1** Construcción de las Isotermas empleando proteínas de Capa-S

MUESTRA	POL <sup>a</sup> (mL)	SLP <sup>b</sup> (mL)	Buffer-B (mL)	[SLP] (mg/mL)	R= SLP/POL (mg/mg)
0,28*	0,45	0,11	0,44	0,28	0,06
0,45	0,45	0,18	0,37	0,44	0,10
0,54	0,45	0,22	0,33	0,54	0,12
0,64	0,45	0,26	0,29	0,64	0,14
0,74	0,45	0,30	0,25	0,74	0,16
0,84	0,45	0,34	0,21	0,84	0,19
1,04	0,45	0,42	0,13	1,04	0,23

*a- Contenido de sólidos 1 %p/p*

*b- Misma concentración para ambas proteínas: 2,5 mg/ml.*

*R=SLP/POL: Relación másica proteína de capa-S a polímero en la muestra.*

*\*La cantidad de proteína presente en los sobrenadantes no logró ser detectada con el método empleado*

### V.2.3 Caracterización de los soportes polímero/proteína

Dado que para la caracterización de las muestras seleccionadas como soporte se emplearán las técnicas descritas en el Capítulo III, en esta sección se mencionarán aquellos detalles del procedimiento que sean diferentes en cuanto a equipamiento y preparación de la muestra. Las muestras empleadas fueron las dispersiones resultantes de la redispersión de los pellets en buffer B o los sólidos obtenidos por liofilización de estas.

Los espectros FTIR y las imágenes de TEM fueron adquiridos como se describió previamente.

Los tamaños de partículas determinados mediante DLS y el potencial Z de las dispersiones de los sistemas polímero-proteína fueron determinados empleando un equipo Litesizer™ 500, FM10 (Anton Paar, Austria) a 25°C. Las dispersiones fueron diluidas 100 veces previo al análisis.

Las dispersiones de las muestras correspondientes a las relaciones (R) 0,06 y 0,10 mg/mg fueron analizadas por SAXS como se describió previamente. Las curvas SAXS se ajustaron utilizando el modelo *PolyCoreShellRatio* perteneciente al paquete del software SasView. Este modelo permite calcular el factor de forma de una partícula esférica polidispersa con una estructura *core-shell*, donde la relación  $R(\text{core})/R(\text{core} + \text{shell})$  se mantiene constante siendo R el radio [Bartlett, 1992].

## V.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.3.1 Isotermas de adsorción

Dado que se observó que las partículas sintetizadas, en concentraciones mayores a 0,5 %p/p, no resultaron ser estables al contactarse con el buffer B, la concentración final de polímero en las combinaciones polímero-proteína fue de 0,45% p/p.

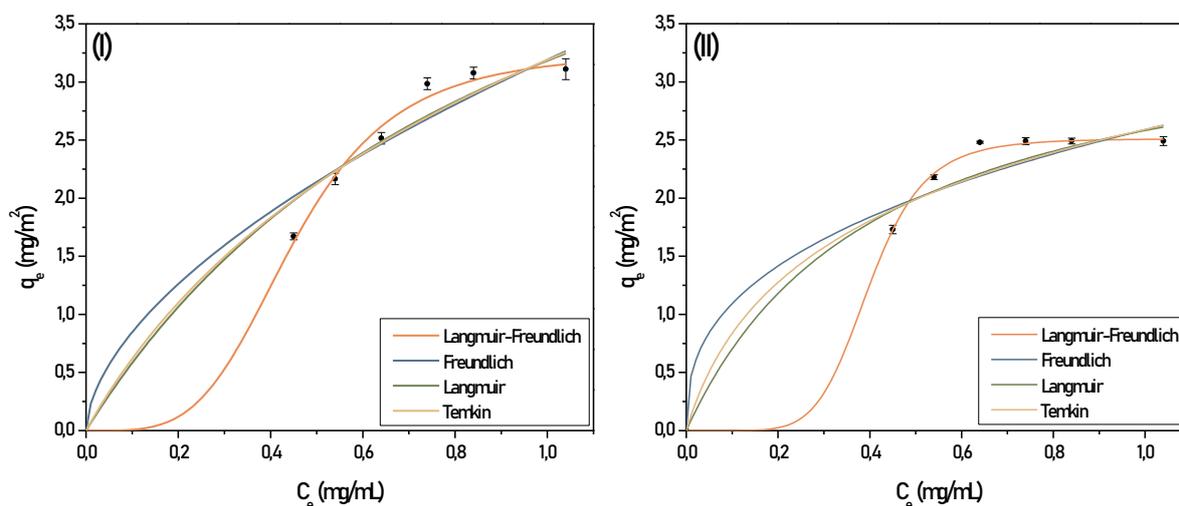


Figura V.2 Isotermas de adsorción de las proteínas de Capa-S S8 (I) y S1 (II) sobre la superficie polimérica p-MBA

En la figura V.2 se presenta el comportamiento de adsorción de las dos SLP sobre p-MBA, siendo este comportamiento representativo para todos los sistemas, como puede observarse el ajuste que logró describir en mejor medida el comportamiento observado fue el modelo de Langmuir-Freundlich. Por esto, en la Figura V.3 se presentan las isotermas de adsorción junto al ajuste obtenido del modelo mencionado para todas las series proteína/polímero.

En base a las isotermas obtenidas, pudo observarse que, a excepción de la superficie hidroxilada, todas las superficies poliméricas adsorbieron una mayor cantidad final de la proteína S8 (Figura V.3 I) respecto a la S1 (Figura V.3 II), siendo esta diferencia muy marcada para las superficies con mayor densidad de carga conteniendo grupos carboxílicos. En adición, mientras que la proteína S1 mostró dos comportamientos (adsorción similar para p-MBA, p-U y p-MBH, y diferente de p-MB en términos de concentración máxima alcanzada), la proteína S8 actuó de manera más selectiva diferenciando claramente su comportamiento de adsorción entre las superficies con restos alquílicos (p-MB), con grupos hidroxilos (p-MBH) y grupos carboxílicos (p-MBA y p-U)), e inclusive entre estos últimos. Analizando la naturaleza de la superficie expuesta se observa una mayor cantidad adsorbida, y por tanto una mayor afinidad, de las proteínas por las superficies con mayor densidad de carga negativa. De este análisis comparativo se desprende la influencia no solo de la superficie polimérica, sino de la naturaleza de la proteína en la conducta de adsorción. Reforzando esta última apreciación, se observa que

el aumento de la afinidad por las superficies con mayor densidad de carga (p-MBA y p-U) es ampliamente más marcado para S8 que para S1.

En el anexo III, se presentan los resultados del análisis comparativo entre los modelos en cuanto a la bondad de ajuste no lineal. En todos los casos los parámetros del grado de ajuste analizados permitieron concluir en que la mejor adecuación al comportamiento experimental la ofrece el modelo Langmuir-Freundlich en el rango de concentraciones estudiados. Los parámetros obtenidos a partir del ajuste no lineal efectuado para el modelo se muestran en la tabla V.2 (los parámetros obtenidos para los demás modelos se presentan en el Anexo III).

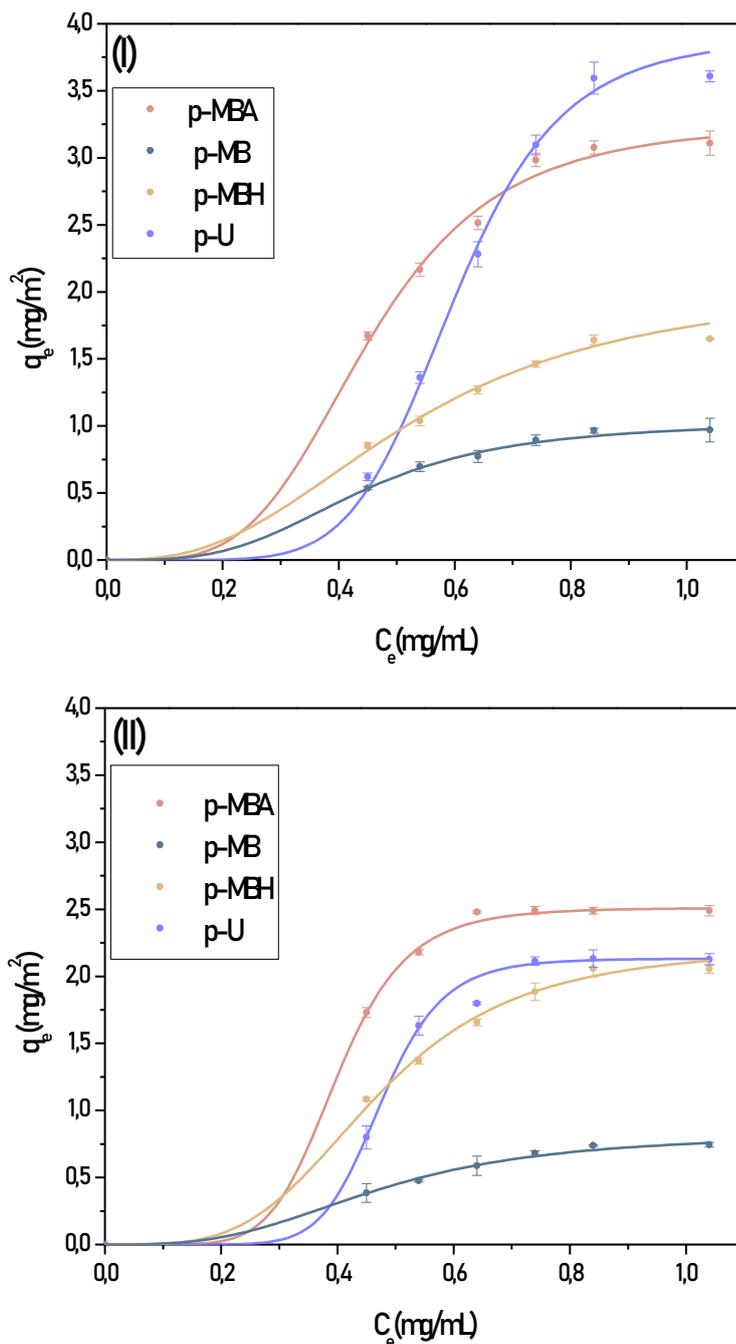


Figura V.3 Isothermas de adsorción obtenidas junto al ajuste Langmuir-Freundlich para las proteínas S8 (I) y S1 (II) sobre las superficies poliméricas analizadas

**Tabla V.2** Parámetros obtenidos a partir del ajuste con el modelo de Langmuir-Freundlich.

POL/PROT	K (ml/m <sup>2</sup> )	q <sub>m</sub> (mg/m <sup>2</sup> )	n	A(m <sup>2</sup> /molec)
MB/S1	10,1357	0,8232	3,08	9,23x10 <sup>-17</sup>
MB/S8	15,9595	1,0288	3,38	2,07x10 <sup>-16</sup>
MBH/S1	18,2498	2,2150	3,83	6,22x10 <sup>-17</sup>
MBH/S8	5,5649	2,0504	2,67	2,49x10 <sup>-17</sup>
MBA/S1	450,9440	2,5111	6,67	4,43x10 <sup>-17</sup>
MBA/S8	24,2461	3,2644	4,01	3,51x10 <sup>-17</sup>
PU/S1	438,7443	2,1326	9,03	5,22x10 <sup>-17</sup>
PU/S8	27,0754	3,8965	6,45	2,94x10 <sup>-17</sup>

El ajuste empleando el modelo de Freundlich, presentó parámetros de bondad de ajuste pobres y predicciones incoherentes como se puede observar en las tablas III.1 y III.2 del Anexo III, lo cual resulta esperable debido a la presencia de un *plateau* experimental no explicado por dicho modelo exponencial. Por otro lado, la isoterma de Temkin propuesta para el análisis de una adsorción reversible no logró explicar de manera suficiente la conducta experimental. Lo observado gráficamente junto a los incoherentes parámetros de adsorción predichos por este modelo permiten establecer que la asunción de los supuestos de Langmuir no es correcta para los sistemas estudiados. La falta de ajuste al modelo de Langmuir permite concluir en que los supuestos del modelo (todos los sitios vinculantes tienen la misma energía, la adsorción de una molécula de proteína ocurre en cada sitio de unión por única vez, y los sitios de unión son de naturaleza independiente) cruciales para su aplicación no los sistemas bajo estudio. Por otro lado, todos los ajustes de Langmuir-Freundlich presentaron valores de n mayores a 1, indicadores de cooperación positiva en los sistemas. Analizando lo que sucede en cada superficie polimérica se observa que cuanto mayor es la afinidad por la superficie ( $K_{L-F}$ ) mayor es el coeficiente de Freundlich (n), es decir, mayor es el alejamiento del valor unitario indicativo de independencia en los sitios de adsorción.

En la figura V.4 se presenta el cambio en  $q_m$  y  $K_{L-F}$  en función de la combinación polímero/proteína. Se observa para ambas proteínas un aumento en la máxima cantidad adsorbida al incrementar la cantidad de grupos oxhidrilos superficiales (comparación p-MB y p-MBH). Por otro lado, las partículas con mayor densidad de carga superficial debido a la presencia de grupos carboxilato (p-MBA y p-U) presentaron la mayor cantidad de proteína adsorbida.

En la figura V.4 (II) se presenta el cambio en la constante de afinidad en función del sistema, el comportamiento es similar al descrito para la máxima cantidad adsorbida. Se observa para ambas SLP un aumento en la afinidad conforme la superficie polimérica expone mayor cantidad de grupos oxhidrilos y mayor densidad de carga. En el caso de la combinación PU/S8 la mayor afinidad y cantidad adsorbida respecto a MBA/S8 podría asociarse a la diferente química superficial que ofrecen las partículas, si bien ambas poseen una densidad de carga similar asociada a grupos sulfato y carboxilato, el PU por su parte también ofrece a las proteínas una superficie químicamente similar al enlace amida de las mismas debido a la presencia del enlace uretano.

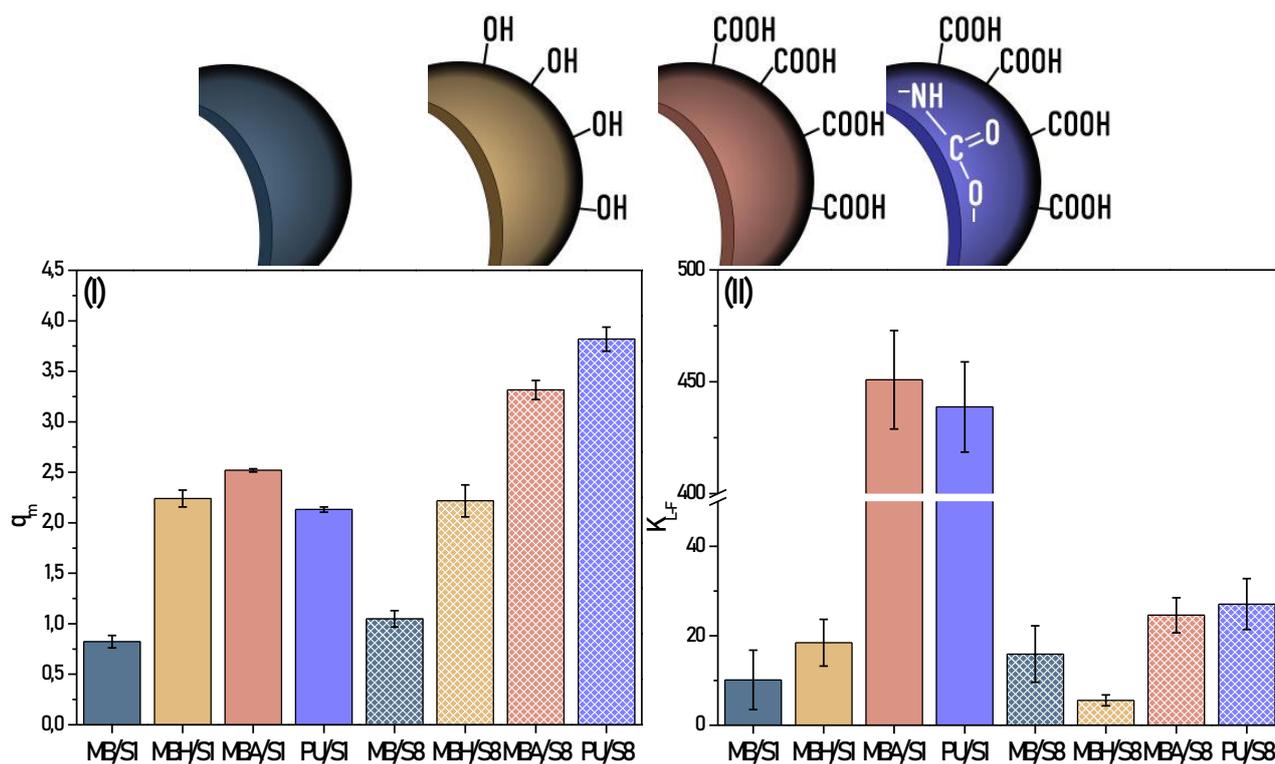


Figura V.4 Cantidad máxima de proteína adsorbida,  $q_m$  (I) y constante de afinidad,  $K_{L-F}$  (II) en función de la combinación polímero/proteína

El modelado de la conducta de adsorción de las SLP sobre las superficies poliméricas nos permite afirmar que dicho proceso se llevó a cabo de manera heterogénea y con dependencia en los sitios de adsorción. La mejor descripción del proceso de adsorción se logró empleando el modelo de Langmuir-Freundlich conocido por adecuarse a sistemas con superficies adsorbentes heterogéneas y múltiples interacciones entre los componentes. A partir de este modelado se logró determinar los parámetros que describen el proceso de adsorción ( $q_m$  y  $K_{L-F}$ ).

### V.3.2 Selección de los soportes

Debido a la mayor adsorción de proteínas de capa-S obtenidas sobre las partículas poliméricas con grupos carboxilatos (MBA y PU), sumado a que los sistemas obtenidos empleando MB y MBH no presentaron estabilidad en el tiempo (tendencia a la coagulación) y resuspensión total (homogeneidad de la dispersión), se seleccionaron las combinaciones MBA/S8, MBA/S1, PU/S8 y PU/S1 como potenciales soportes para la obtención de las nanopartículas metálicas con el fin de profundizar en su caracterización.

Del total de relaciones de concentración polímero/proteína estudiadas en las isotermas, se eligió para la conformación de los soportes la relación correspondiente a la concentración de proteínas de 0,64 mg/mL. La elección responde a la mayor dificultad para resuspender los *pellets* conforme aumenta la concentración inicial de proteína. Empleando concentraciones de 0,74; 0,84 y 1,04 mg/mL la resuspensión de los *pellets* dio como resultado una gran cantidad de material sedimentado y sin capacidad de resuspensión (agitación vigorosa). En la imagen V.1 se puede observar lo expuesto conforme aumenta la concentración de proteína.

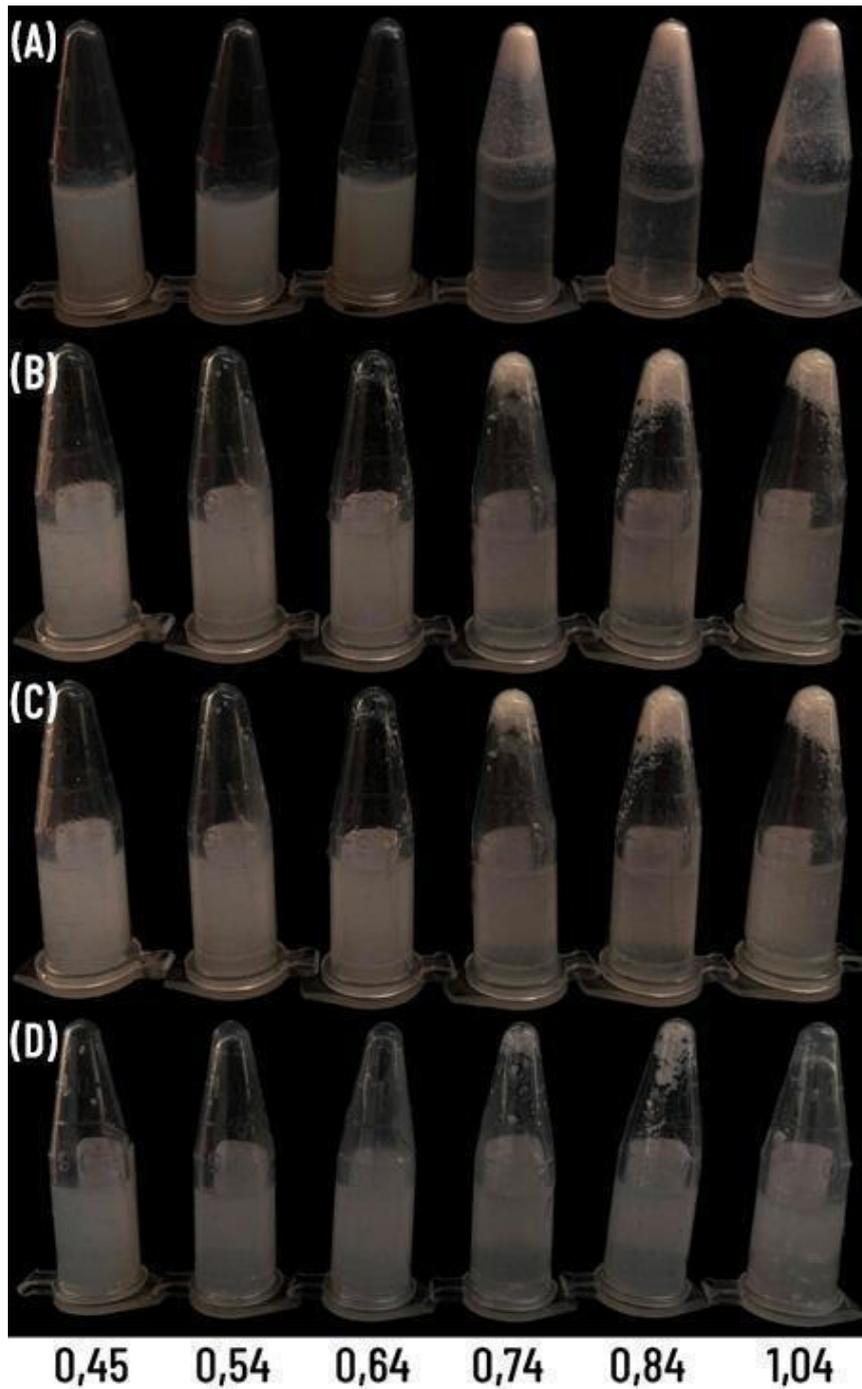


Imagen V.1 Resuspensión de los pellets (conteniendo los sistemas polímero/proteína) a distintas concentraciones de proteína. (A) MBA/S8 (B) PU/S8 (C) MBA/S1 (D) PU/S1

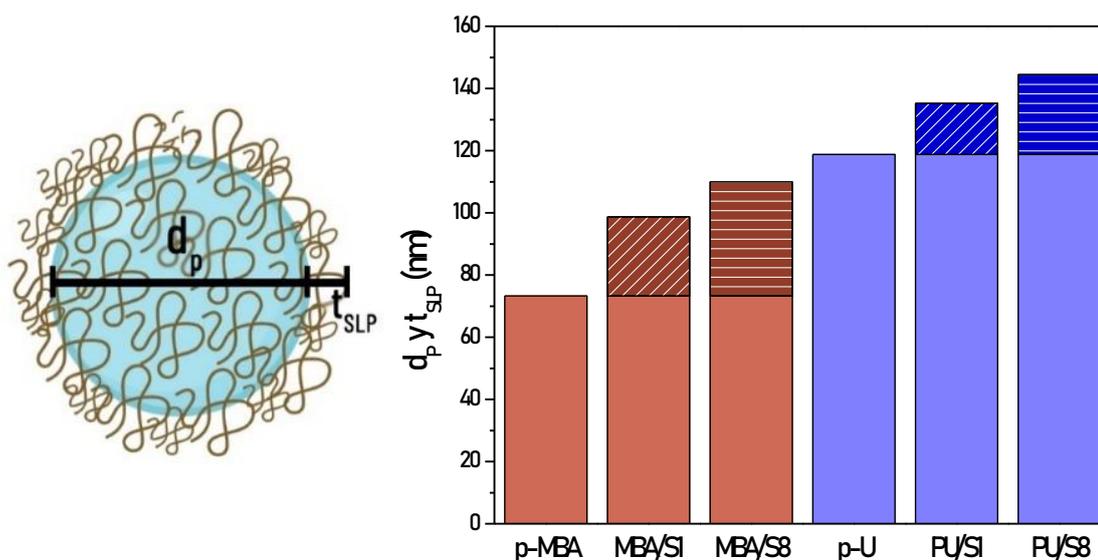
### V.3.3 Caracterización de los soportes polímero/proteína

#### V.3.3.1 Dispersión de luz dinámica (DLS) y potencial Z

En la tabla V.3 y la Figura V.5 se presenta el potencial Z, el diámetro de las partículas polímero/proteína y el tamaño de la corona proteica  $t_{SLP}$  calculado como la diferencia entre el diámetro de partícula del sistema polímero-proteína y el de las partículas poliméricas.

**Tabla V.3** Parámetros obtenidos por DLS y potencial Z para las muestras polímero/proteína.

MUESTRA	p-MBA	MBA/S1	MBA/S8	p-U	PU/S1	PU/S8
$d_p$ (nm)	73,3	124,1	146,7	118,8	151,1	170,1
$t_{SLP}$ (nm)	-	25,4	36,7	-	16,4	25,7
Z (mV)	-35,0	-21,0	-19,0	-35,0	-8,9	-20,9



**Figura V.5** Esquema del sistema polímero/proteína y comparación del diámetro y el espesor de la corona proteica

El cambio en el potencial Z, como era de esperarse, evidencia una disminución de la densidad de carga negativa superficial de las partículas poliméricas ante la adsorción de las proteínas de capa-S [Kato et al., 1995]. El hecho de que luego de la adsorción los sistemas aún posean un potencial Z negativo de la magnitud observada permite considerar que las combinaciones polímero/proteína poseen estabilidad coloidal, en acuerdo con la permanencia en suspensión observada en el tiempo para las muestras [Winzen et al., 2015]. En este sentido, Toca-Herrera y col. (2005) también reportaron sistemas poliméricos que luego de ser recubiertos con proteínas de capa-S continuaban presentando un

potencial Z negativo, algo que en dicho trabajo se vinculó con la exposición de residuos con densidad de carga negativa por parte de las SLP adsorbidas.

En cuanto al diámetro de las partículas, en todos los casos se observó un aumento del tamaño luego de la adsorción de la proteína. Para ambos polímeros (p-MBA y p-U) la proteína S8 presentó un mayor tamaño de corona proteica (figura V.5), en concordancia con la mayor cantidad adsorbida observada en las respectivas isotermas. Los resultados obtenidos permitieron estimar un espesor de la corona proteica de entre 15 y 35 nm.

### V.3.3.2 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los primeros eventos que ocurren ante el contacto de una proteína con una superficie son la adsorción y subsecuentemente un posible cambio en la conformación. Ambos resultan esenciales y condicionan las posteriores propiedades fisicoquímicas del sistema. En muchos estudios sobre este fenómeno, con el objetivo de obtener información relevante acerca de la estructura de distintas proteínas adsorbidas, se ha implementado el uso de FTIR [Gruian et al., 2012].

La figura V.6 (I) muestra los espectros FTIR de los sistemas MBA/S1 y MBA/S8 comparados con los espectros de los componentes individuales, mientras que la figura V.7 (I) presenta los espectros análogos obtenidos para los sistemas PU/S1 y PU/S8. Todos los sistemas combinados presentaron espectros formados por la contribución de las bandas características previamente identificadas de ambos componentes, en los que además se detectaron señales a  $1631\text{ cm}^{-1}$  y  $1554\text{ cm}^{-1}$  (señaladas en el espectro del polímero), relacionadas con la contribución de los componentes del buffer B. Al analizar en detalle la región  $1900\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$  como se presenta en la figura V.6 (II) y V.7 (II) se observa en los espectros de los sistemas combinados que la banda Amida I ( $1600\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ ) de las proteínas no muestra cambios apreciables en la posición, dentro de lo que permite apreciar la complejidad del sistema. Como se explicó anteriormente, la posición de la banda Amida I se ve afectada por la conformación de la proteína y los enlaces puente de hidrógeno que esta posee, sin embargo, también se ve afectada por la interacción de las proteínas con otros materiales [Bekale et al., 2015].

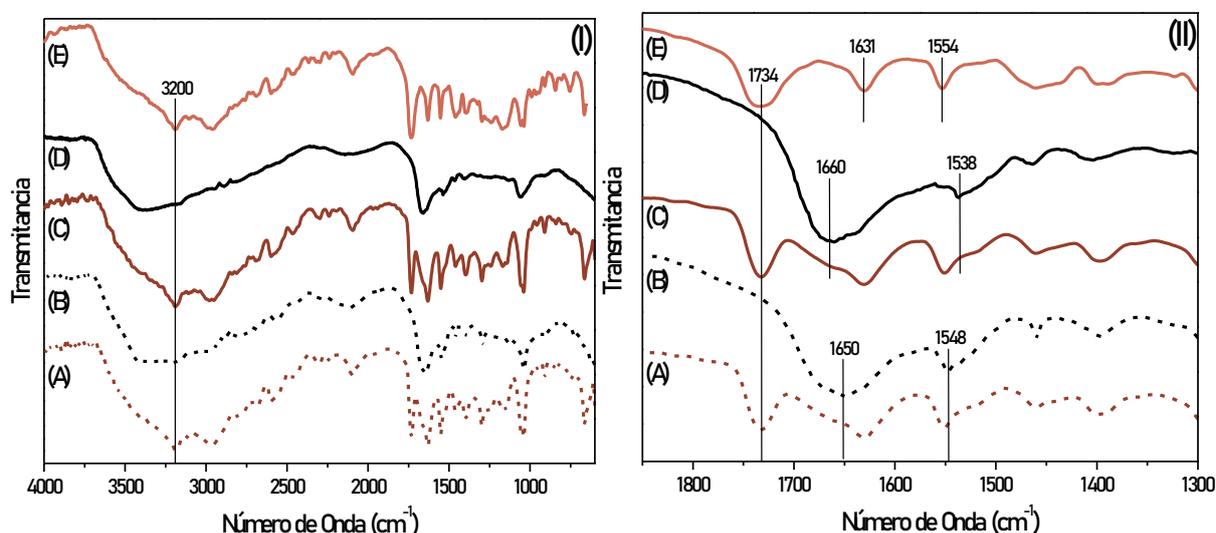


Figura V.6 Espectros FTIR (I) y ampliación de la región Amida I (II), (A) MBA/S8 (B) S8 (C) MBA/S1 (D) S1 (E) p-MBA

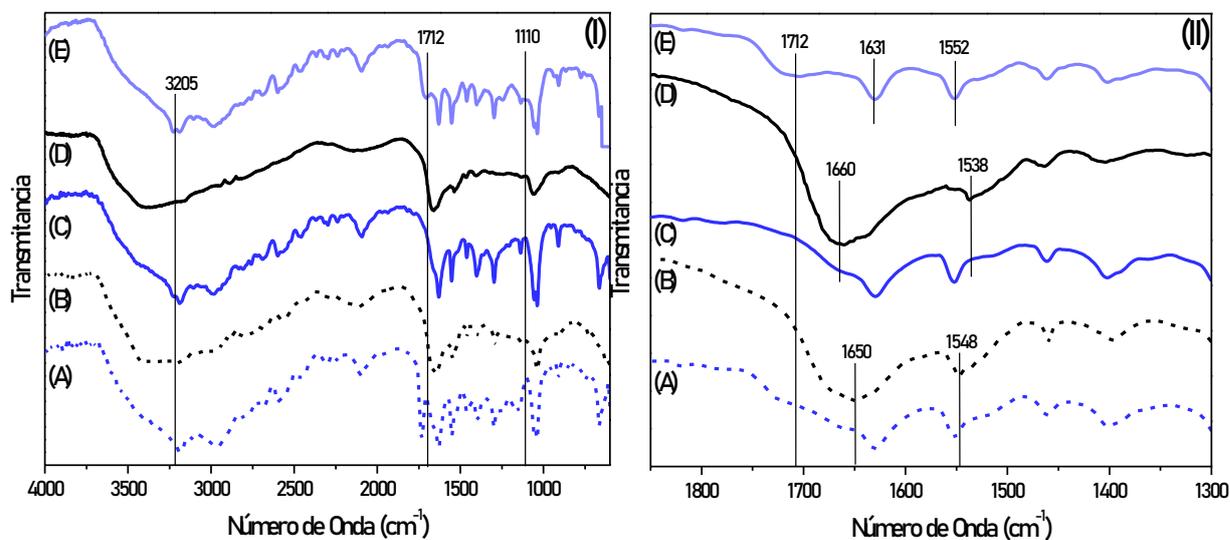


Figura V.7 Espectros FTIR (I) y ampliación de la región Amida I (II), (A) PU/S8 (B) S8 (C) PU/S1 (D) S1 (E) p-U

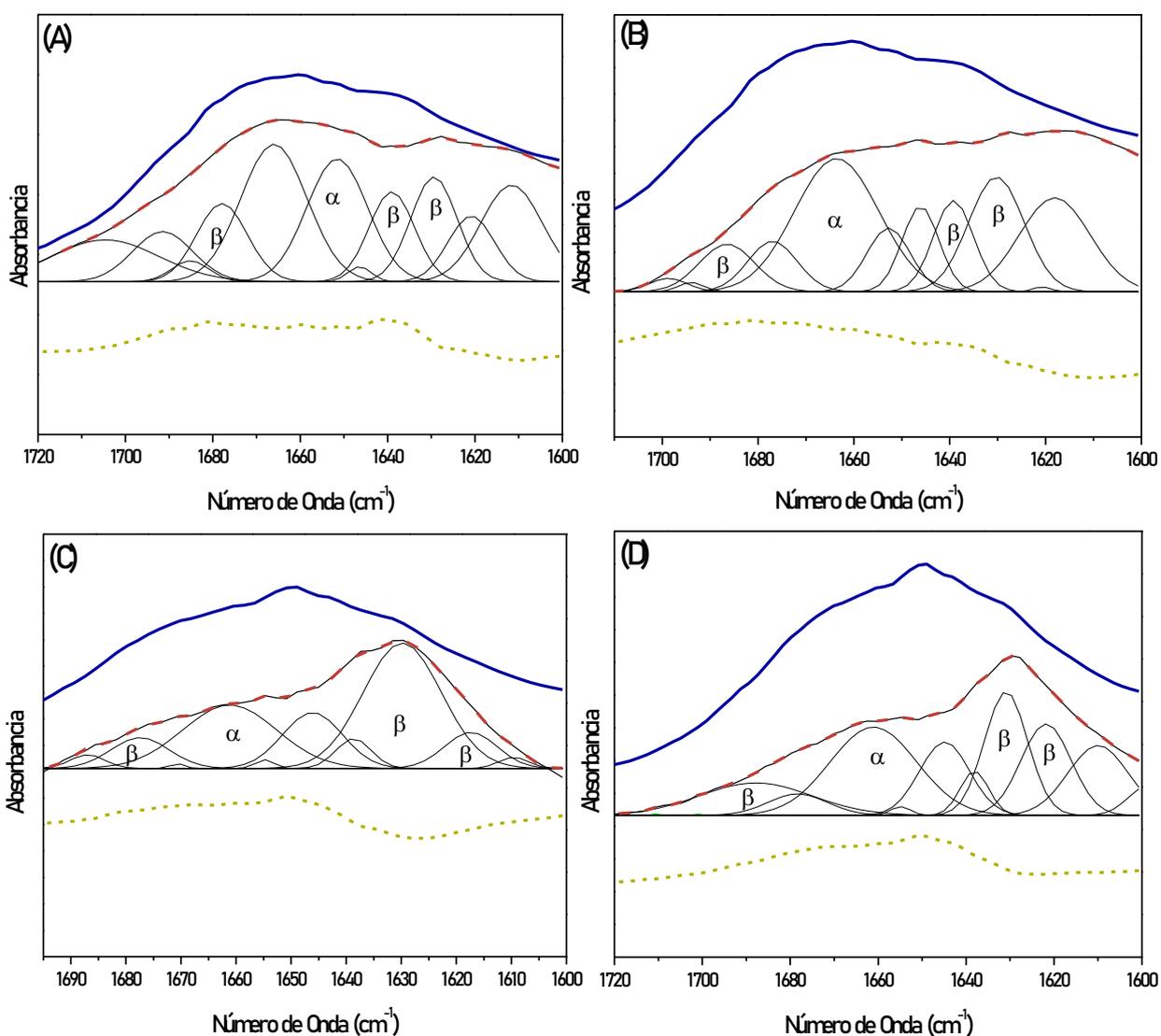
Con el objetivo de profundizar en este aspecto, se llevó a cabo el análisis por deconvolución de la banda amida I bajo un método idéntico al descrito en la sección IV.3.2.3.

Para llevar a cabo la comparación del análisis de la proteína antes (SLP) y después de la adsorción (SLP<sub>A</sub>) se obtuvo el espectro de esta última por sustracción del espectro del polímero y el buffer B al espectro del sistema polímero-proteína. Posteriormente, el espectro de la proteína adsorbida fue deconvolucionado para obtener los porcentajes de cada estructura secundaria contribuyente. En la figura V.8 se presentan los análisis de deconvolución de la banda Amida I para las proteínas adsorbidas. Si bien se observan ligeros cambios en la forma de la banda, al realizar al deconvolución se comprobó que la relación lámina-β/α-hélice se mantiene prácticamente igual en las proteínas adsorbidas en relación a los analizado anteriormente para las proteínas libres.

En el caso de la S1 las cantidades relativas de las distintas estructuras se mantuvieron en valores cercanos a los de la proteína libre, sin embargo, para el caso de la proteína S8 se observó un aumento tanto de la proporción tanto de α-hélice como de lámina-β, manteniendo la relación entre ambas. Este aumento se acompaña de una caída en la proporción de estructuras desordenadas (señaladas como “otros”), como se puede observar en la tabla V.4. En ninguno de los casos se observan indicios de agregación, fenómeno que se acompaña de fuertes absorciones entre los 1610 y 1628 cm<sup>-1</sup> y de un incremento en la proporción de estructuras desordenadas, contrario a lo observado [Jackson & Mantsch, 2008; Murayama & Tomida, 2004].

**Tabla V.4** Composición porcentual de la banda amida I, comparación proteínas libres y adsorbidas sobre los distintos sistemas

MUESTRA	S1 libre	MBA/S1	PU/S1	S8 libre	MBA/S8	PU/S8
$\alpha$ -hélice	16,1	18,7	17,5	13,0	24,6	23,7
Lámina $\beta$	46,0	48,6	45,5	25,2	47,1	45,1
Otros	38,0	32,8	37,0	61,8	28,3	31,2
$\beta/\alpha$	2,9	2,6	2,6	1,9	1,9	1,9


**Figura V.8** Banda amida I y su deconvolución para las proteínas de capa-S adsorbidas (trazo continuo negro y discontinuo bordó respectivamente), comparación con dicha banda para las proteínas libres (trazo continuo azul) y espectro diferencia entre los anteriores (trazo discontinuo ocre), (A) MBA/S1 (B) PU/S1 (C) MBA/S8 (D) PU/S8

### V.3.3.3 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

En la imagen V.2 se presentan las imágenes TEM tomadas para los sistemas polímero/proteína en comparación con las imágenes de las partículas poliméricas. En las mismas se observa una corona de proteína rodeando a las partículas poliméricas. En el caso del sistema MBA/S1 fue posible detectar partículas aisladas, sin embargo, para el sistema MBA/S8 las partículas se encontraron formando agregados. Moll y col. (2002) observaron por TEM una estructura similar en sistemas resultantes de adsorber proteínas de capa-S sobre liposomas [Moll et al., 2002].

A partir de las imágenes tomadas se logró estimar un espesor de la corona proteica ( $t_{SLP}$ ) de  $9,9 \pm 0,5$  nm para la proteína S1 y de  $13,8 \pm 0,6$  nm para la S8 sobre p-MBA. Por otro lado, el tamaño de la corona para las proteínas adsorbidas sobre p-U fue de  $14 \pm 1$  nm y  $31 \pm 1$  para S1 y S8 respectivamente.

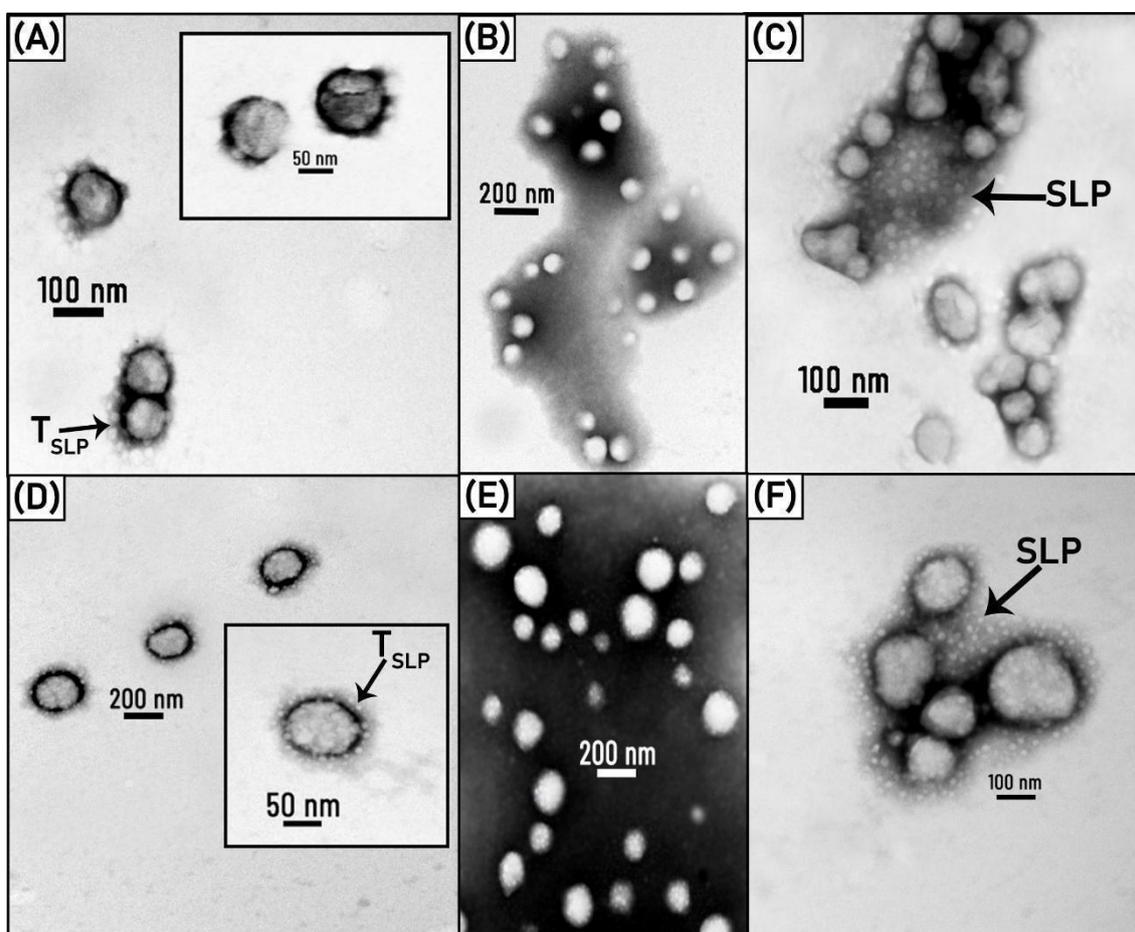


Imagen V.2 Micrografías TEM (A) MBA/S1 (B) p-MBA (C) MBA/S8 (D) PU/S1 (E) p-U (F) PU/S8

### V.3.3.4 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Con el objetivo de estudiar la estructura de los sistemas polímero/proteína y obtener información sobre el tamaño de las partículas, la morfología y la estructura interna se recurrió al análisis de la dispersión de rayos X a bajo ángulo [Minelli et al., 2014].

A partir de la información obtenida de las isoterma de adsorción, se seleccionaron los sistemas polímero/proteína obtenidos desde dos concentraciones iniciales de proteínas con la finalidad de estudiar la estructura de los sistemas en dos instancias de cobertura distintas. Las muestras denominadas (C) presentaron un exceso de proteína libre detectable en el sobrenadante, mientras que los sobrenadantes de las denominadas (D) no presentaron proteínas detectables, como se resume en la tabla V.5.

**Tabla V.5** Sistemas analizados por SAXS. POL representa a las partículas p-MBA y p-U, mientras que SLP representa a las proteínas S1 y S8.

SISTEMAS	[SLP] (mg/mL)	R= SLP/POL	SLP en sobrenadante
POL/SLP(C)	0,28	0,06	N.D. <sup>a</sup>
POL/SLP(D)	0,56	0,125	D. <sup>b</sup>

*a- No se detectaron proteínas mediante la técnica colorimétrica de Bradford.*

*b- Se detectó mediante Bradford la presencia de proteínas en el sobrenadante, se logró cuantificarlas.*

En la Figura V.9 y V.10 se presentan las curvas de SAXS obtenidas ( $I(q)$  vs  $q$ ) y los gráficos de Guinier ( $\ln I(q)$  vs  $q^2$ ) para los sistemas p-MBA/SLP y p-U/SLP, respectivamente. En comparación con los perfiles SAXS de las dispersiones poliméricas, los sistemas POL/SLP presentaron curvas más suaves y con un perfil diferente al observado para partículas poliméricas en dispersión, lo que sugiere un cambio de morfología al adsorber proteína sobre las mismas. Los gráficos de Guinier presentaron desviaciones positivas al comportamiento lineal a bajo  $q$  en todos los casos, lo que está asociado a la agregación de las partículas en suspensión [Putnam et al., 2007], e impide emplear la aproximación de Guinier para estimar el  $R_g$  de estas partículas polímero/proteína. Por esto, se recurrió al ajuste en la región de  $q$  de  $0,05$  a  $0,22 \text{ nm}^{-1}$  para obtener la información sobre la estructura del sistema.

Para las muestras denominadas POL/SLP(C) (en las que se detectó proteína en los sobrenadantes) el perfil SAXS logró describirse mediante el modelo de partículas esféricas polidispersas con una estructura *core-shell* empleando el software SasView. Como datos de entrada al modelo, se utilizaron los radios de partícula ( $R_g$ ) y densidad electrónica (SLD) obtenidos en la sección III.3.1.5 para las dispersiones poliméricas como parámetros para definir al núcleo polimérico (core) del ajuste aplicado a las dispersiones polímero/proteína. Los tamaños de la corona proteica junto a otros parámetros obtenidos del ajuste se

presentan en la tabla V.6. Para estas muestras POL/SLP(C), se obtuvo un espesor de la capa proteica ( $t_{\text{SLP}}$ ) de entre 10 y 20 nm, observándose en todos los casos un aumento de la polidispersidad media del sistema (PDI) en comparación con lo obtenido para la dispersión polimérica. Los resultados guardan relación con los espesores determinados por TEM y DLS. En adición, los valores de la densidad electrónica (SLD) de las proteínas arrojado por el modelo concuerdan con los reportados previamente para otras proteínas [Zhang et al., 2012].

Con respecto a los sistemas POL/SLP(D), sistemas obtenidos a partir de una baja concentración de proteínas, lograron describirse mediante una combinación lineal de los dos modelos empleados previamente: Sphere + CoreShell Sphere, es decir, por combinación de los resultados de ambos modelos propuestos para los polímeros y polímero/proteína. Este resultado probablemente se deba a que la cantidad de proteína colocada no es suficiente para cubrir toda la superficie polimérica expuesta, lo cual no puede ser descrito por un modelo sencillo (factor de forma).

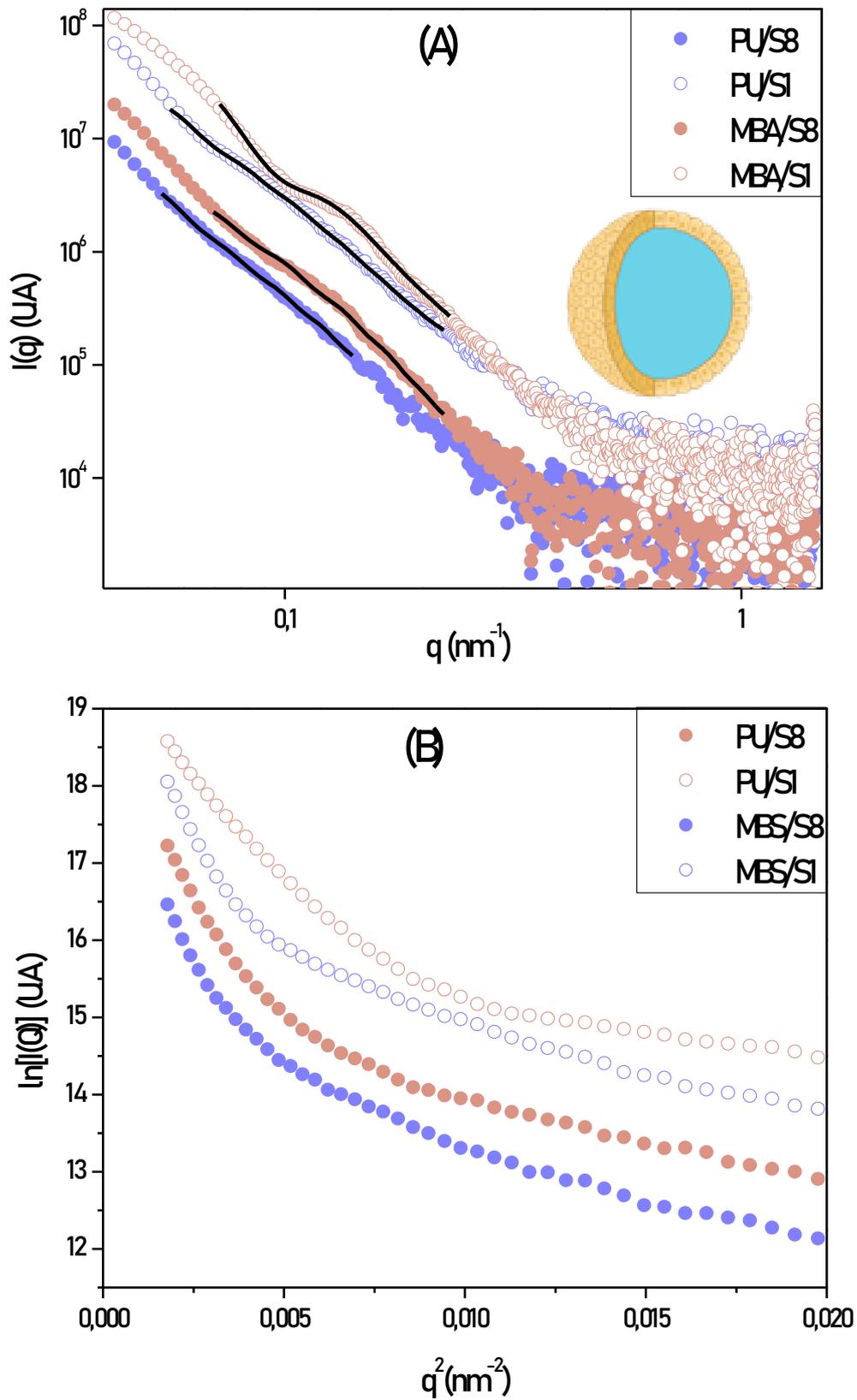


Figura V.9 (A) Perfiles SAXS y ajuste al modelo (trazo continuo) Core-Shell Sphere para las muestras (C) (B) Gráficos de Guinier para las muestras (C)

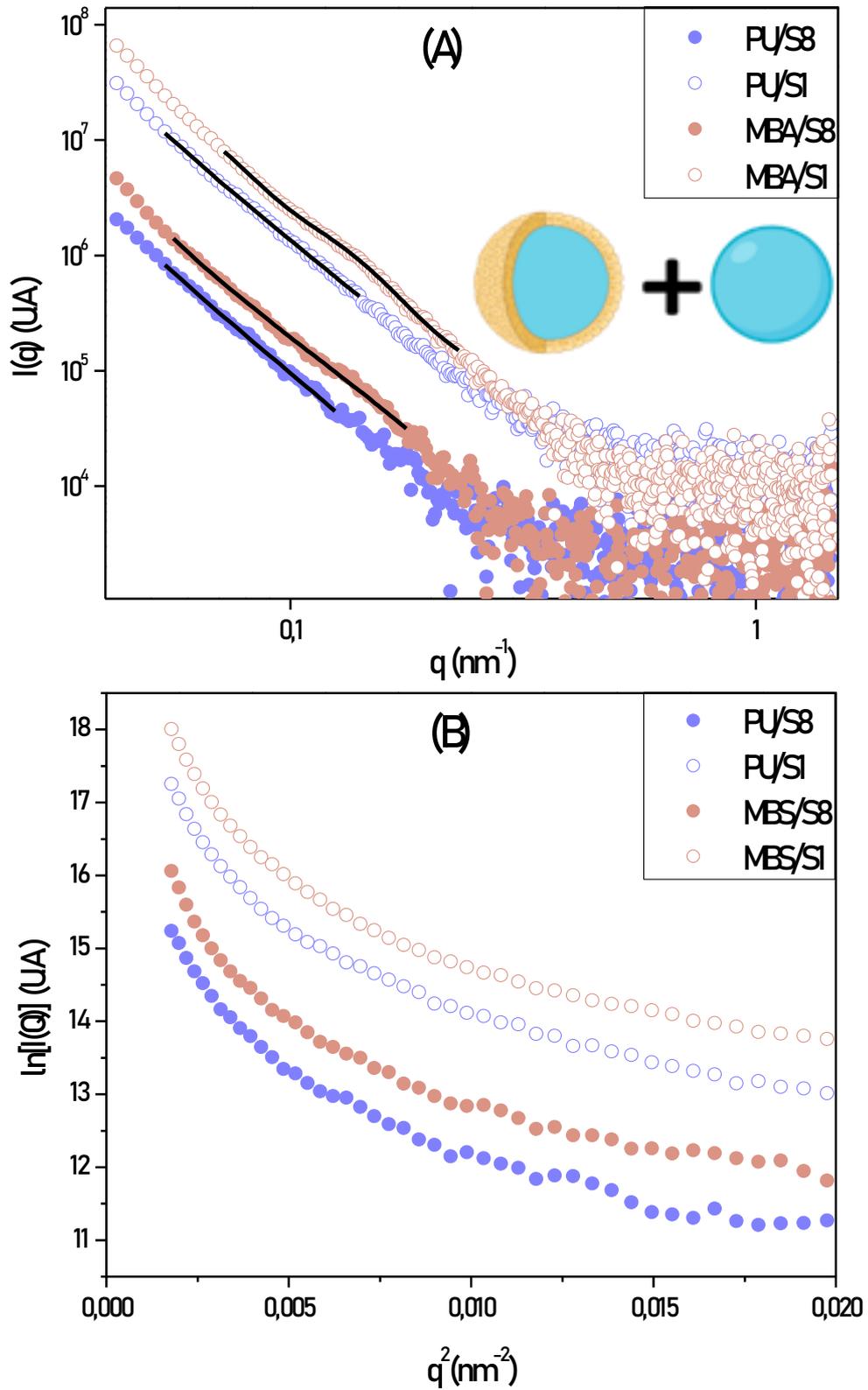


Figura V.10 (A) Perfiles SAXS y ajuste al modelo (trazo continuo) *Core-Shell Sphere+Sphere* para las muestras (D) (B) Gráficos de Guinier para las muestras (D)

**Tabla V.6** Propiedades de los sistemas polímero/proteína obtenidas por modelado de curvas SAXS

SISTEMA	R (nm) <sup>*</sup>	t <sub>SLP</sub> (nm)	PDI	SLD (Å <sup>-2</sup> )	χ <sup>2</sup>
MBA/S1(C)	36,36	10,74	0,49	11,8x10 <sup>-6</sup>	0,0340
MBA/S8(C)	36,36	12,29	0,45	11,0 x10 <sup>-6</sup>	0,0333
PU/S1(C)	64,64	19,54	0,56	11,8x10 <sup>-6</sup>	0,0140
PU/S8(C)	64,64	22,67	0,58	11,0 x10 <sup>-6</sup>	0,0150

*\* Radio del núcleo (partícula polimérica) obtenido mediante el ajuste de las partículas poliméricas realizado previamente.*

## V.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Mediante la construcción de isotermas, se logró estudiar el comportamiento de adsorción de dos proteínas de capa-S aisladas de dos cepas de *Lactobacillus kefir* sobre partículas poliméricas en dispersión acuosa con diferentes características en cuanto a su naturaleza química, grupos funcionales y densidad de carga superficial.

Las SLP presentaron mayor afinidad por las partículas poliméricas con mayor densidad de carga superficial, con una tendencia de S8 a adsorberse en mayor cantidad que S1. No obstante, la proteína S8 mostró una mayor selectividad en cuanto a las superficies ofrecidas, siendo su cantidad final de proteína adsorbida diferente según la funcionalidad de la superficie (grupos alquílicos, grupos hidroxilo o grupos carboxilos). En ese sentido, la proteína S1 presentó dos comportamientos, distinguiendo solo a las superficies con grupos alquilo de las otras partículas.

En base al ajuste por el modelo de Langmuir-Freundlich, se determinó que el proceso de adsorción se llevó a cabo de manera heterogénea (en cuanto a energía de los sitios) y presentando dependencia en los sitios de adsorción, fenómenos relacionados a la cooperatividad negativa establecida entre las proteínas adsorbidas.

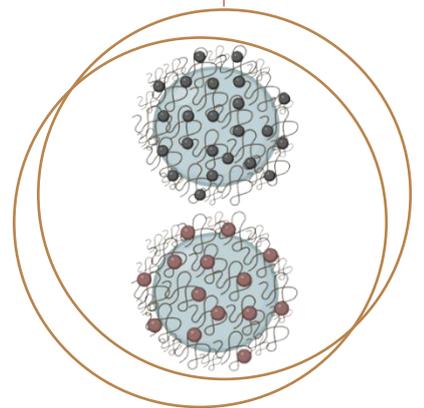
En conjunto, las observaciones indican que las interacciones entre las distintas series son altamente dependientes tanto de la proteína, como de la superficie ofrecida.

Los sistemas polímero/proteína seleccionados como potenciales soportes resultaron tener una morfología *core-shell* formada por una corona proteica alrededor de un núcleo constituido por una partícula polimérica, con espesores de la corona de entre 10 y 20 nm estimados a través de TEM, SAXS y DLS. En adición, mediante FTIR no se apreciaron cambios significativos de la banda Amida I, sugiriendo que las SLP no modificarían su estructura luego de la adsorción.

# VI

## Capítulo VI

# PREPARACIÓN DE LOS BIONANOCATALIZADORES



En el presente capítulo se describe la preparación de los bionanocatalizadores de platino y plata desarrollados en este trabajo de tesis, utilizando como soportes los sistemas polímero/proteína descritos. En adición, se presentan y discuten los resultados obtenidos de su caracterización.

## VI. PREPARACIÓN DE LOS BIONANOCATALIZADORES

### VI.1 INTRODUCCIÓN

Debido a la afinidad por distintos metales, junto a las características únicas de las SLP para autoensamblarse, se comenzó hace un tiempo a explotar su uso como plantillas para la fabricación y manipulación de *clusters* metálicos de tamaño nanométrico. Como ha sido descrito, se han reportado numerosos trabajos en los que se han empleado diferentes SLP con el fin de obtener arreglos de nanopartículas metálicas soportadas [Mertig et al., 2001; Mertig et al., 1999; Wahl et al., 2005; Wahl et al., 2001].

Entre los distintos organismos que poseen SLP, los pertenecientes a la familia *Bacillus* son potenciales candidatos para explorar la interacción con metales debido a las múltiples envolturas que poseen. Previamente, se ha reportado un estudio sobre la capacidad de interacción de cobre de la SLP aislada de *Bacillus sphaericus*. En dicho trabajo, además, se logró identificar el efecto competitivo del calcio y el zinc sobre la interacción con cobre indicando que la SLP aislada de *B. sphaericus* también interactúa con estos metales. Uno de los aspectos más interesantes del análisis radica en la importancia de la glicosilación de las SLP respecto a la capacidad de interacción con los metales. Mientras que la SLP aislada de *B. sphaericus*, glicosilada, presentó la capacidad de interactuar con cobre, la de *B. acidophilus*, no glicosilada, no presentó tal capacidad [Allievi, et al., 2011].

No obstante, un tipo de proteína no tan explorada para estas aplicaciones son las SLP aisladas de cepas de *Lactobacillus kefir*. La capacidad de estas SLP para interactuar con metales fue estudiada por Mobili y col. (2013), en dicho trabajo se demostró la capacidad de estas proteínas de captar cationes bivalentes como  $Pb^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$  y  $Ni^{+2}$  a través de la coordinación con los grupos carboxilo de la cadena lateral de los residuos de Asp y Glu, y algunas coordinaciones adicionales que involucraron a los grupos NH de la columna vertebral del péptido [Mobili et al., 2013]. Recientemente, Bolla y col. (2020a; 2020b) aislaron SLP de dos cepas de *Lactobacillus kefir* (*Lactobacillus kefir* CIDCA83111 (S8) y *Lactobacillus kefir* CIDCA8348 (S1)) utilizando cloruro de guanidinio 5M. Luego de ser dializada para eliminar el agente caotrópico, las proteínas fueron incubadas con soluciones acuosas de  $(NH_4)_2PtCl_4$  o  $AgNO_3$  (activación) y, después de un proceso de centrifugación-redispersión con el objetivo de eliminar el metal que no interactuó con la proteína, fueron reducidas empleando una corriente de  $H_2$  a 25 °C y presión atmosférica. De esta manera, lograron obtener MNPs con tamaño, forma y distribución perfectamente dirigidos por el ensamblaje de las SLP.

Cuando se utilizó la sal de platino como precursor, el orden estructural de las SLP aisladas condujo a la obtención de partículas con diámetros en el rango de 0,67 a 5,99 nm cuando emplearon la SLP S1, y entre 0,80 y 6,56 nm para S8, sugiriendo así que la simetría de la SLP podrían influir en el tamaño de las MNPs. En estos sistemas se observaron grupos de partículas de Pt subnanométricas, así como átomos individuales (adatoms) de Pt altamente dispersos sobre la superficie de las MNPs. El Pt obtenido sobre S8 presentó un

mayor número de átomos individuales que las MNPs obtenidas sobre S1, lo que sugiere que la organización de la SLP utilizada como soporte podría tener un papel importante en la estabilización de las especies subnanométricas de Pt [Bolla et al., 2020<sup>b</sup>].

Las mismas proteínas fueron empleadas para sintetizar nanopartículas de Ag estables [Bolla et al., 2020a]. Empleando las SLP S1 y S8, e incubando las mismas con  $\text{AgNO}_3$ , se obtuvieron MNPs de plata con diferentes tamaños y topografías según la naturaleza de la SLP utilizada y las condiciones de reducción aplicadas ( $\text{H}_2$  y/o cantidades variables de  $\text{NaBH}_4$ ). En todos los casos, observaron la formación de MNPs distribuidas uniformemente, con presencia de algunos agregados pequeños. Ante las mismas condiciones de reacción, las MNPs obtenidas utilizando S8 presentaron tamaños menores que aquellas sintetizadas empleando S1, mientras que la aplicación de un procedimiento de reducción drástico con  $\text{NaBH}_4$  condujo a la obtención de partículas más grandes. De esta manera, los resultados obtenidos demuestran que la nanoarquitectura de las NPs de Ag está influenciada tanto por el tipo de molde proteico como por las condiciones de reducción utilizada.

Por lo tanto, se podría lograr un crecimiento controlado de nanopartículas metálicas soportadas combinando las propiedades de estructuración que ofrece el uso de plantillas basadas en SLP, con las propiedades de los soportes basados en partículas poliméricas, conformando sistemas combinados que ofrecen la gran ventaja de obtener arreglos metálicos bien dispersos y mecánicamente resistentes en dispersión acuosa [Bai et al., 2017; Hood et al., 2014; Vogel et al., 2011; Yuan et al., 2012; Mei et al., 2005; Kralik et al., 2000].

## VI.2 MATERIALES Y MÉTODOS

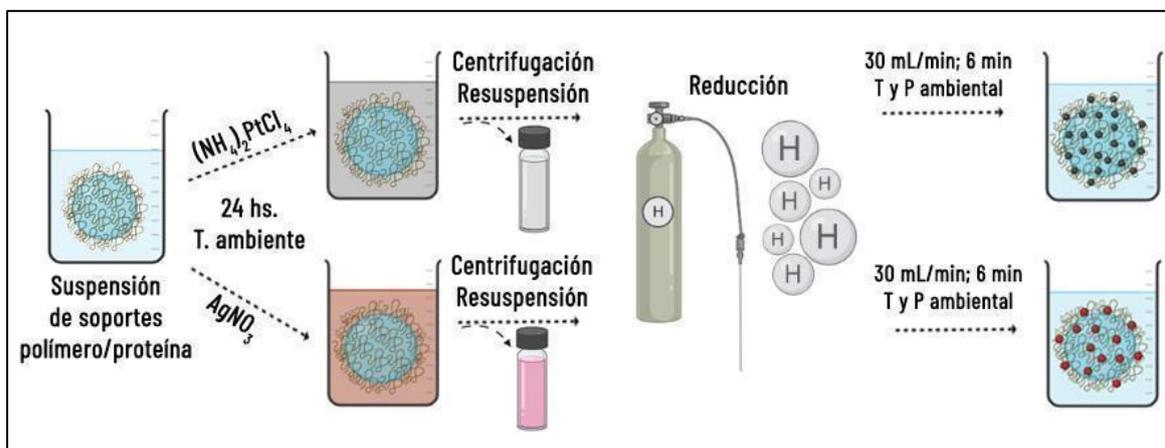
### VI.2.1 Reactivos

- Ácido Clorhídrico ( $\text{HCl}$ , Biopack)
- Ácido Nítrico ( $\text{HNO}_3$ , Cicarelli)
- Estándar para absorción atómica de Plata en  $\text{HNO}_3$  (Merck)
- Estándar para absorción atómica de Platino en  $\text{HCl}$  (Fluka)
- Hidrógeno gaseoso ( $\text{H}_2$ , N50, 99.999%, Air Liquide)
- Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , Cicarelli)
- Tetracloroplatinato de Amonio [ $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_4$ , Sigma-Aldrich]

### VI.2.2 Preparación de los bionanocatalizadores de platino y plata

La obtención de los bionanocatalizadores se llevó a cabo empleando una técnica de impregnación. Típicamente, la impregnación como metodología para obtener catalizadores heterogéneos implica el contacto del soporte con una determinada cantidad del precursor metálico de interés, seguida de un período corto de envejecimiento, secado y calcinado. En este trabajo se optó por cumplir con los primeros pasos del método de

impregnación. Sin embargo, el secado de las muestras fue reemplazado por procesos de lavado (centrifugación y resuspensión) para remover el precursor no adsorbido sobre el soporte, y la calcinación fue reemplazada por el empleo de una corriente de hidrógeno en condiciones suaves como proceso de reducción. En el esquema VI.1 se presenta el proceso que se ha llevado adelante en este trabajo para la obtención de los nanocatalizadores.



Esquema VI.1 Obtención de los nanocatalizadores metálicos empleando la técnica de impregnación.

Todos los bionanocatalizadores fueron preparados mediante la incubación de los soportes polímero/proteína seleccionados (sección V.2.2) con soluciones de los precursores metálicos correspondientes ( $\text{AgNO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_4$ ). Se prepararon catalizadores metálicos con contenidos nominales de 5 y 10 %p/p. En cada caso se puso en contacto la cantidad adecuada de una solución del precursor metálico de interés con una cantidad definida de una dispersión de los soportes llevando a un volumen final de un 1,00 ml, manteniendo al sistema a  $25^\circ\text{C}$  y presión atmosférica durante 24 horas. Transcurrido el período de incubación, las muestras se centrifugaron por 15 minutos a 13.500 rpm y posteriormente se separó el sobrenadante conteniendo el precursor metálico excedente. El *pellet* fue resuspendido en 1,00 mL de agua *Milli-Q* mediante agitación del sistema en un Vortex hasta homogeneidad de la suspensión. El sistema suspendido en agua *Milli-Q* fue sometido a una corriente de hidrógeno gaseoso con un caudal de 30 mL/min, a  $25^\circ\text{C}$  y presión atmosférica, durante 6 minutos. Concluido el proceso de reducción, los sistemas se reservaron a temperatura ambiente por 24 hs previo a su uso o caracterización. En la tabla VI.1 se resume la composición de los catalizadores preparados.

Tabla VI.1 Preparación de los bionanocatalizadores

CATALIZADOR P/SLP/M <sup>a</sup>	SOPORTE (mg)	Pt (mg)	Ag (mg)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PtCl <sub>4</sub> <sup>b</sup> (mL)	AgNO <sub>3</sub> <sup>c</sup> (mL)
P/SLP/Pt 5	5,06	0,25	-	0,05	-
P/SLP/Pt 10	5,06	0,51	-	0,1	-
P/SLP/Ag 5	5,06	-	0,25	-	0,47
P/SLP/Ag 10	5,06	-	0,51	-	0,94

*a- Se emplea una nomenclatura genérica (P/SLP/M) para representar ambas cepas de proteínas de capa-S empleadas (SLP), los polímeros utilizados (P) y el metal presente (M). El número representa la concentración nominal de metal*

*b- Se empleó una solución de 1,0 % p/v de concentración*

*c- Se empleó una solución de 0,85 mg/mL de concentración*

## VI.2.3 Caracterización de los bionanocatalizadores

### VI.2.3.1 Contenido metálico

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de metal de los sistemas preparados, se analizó el contenido metálico de los bionanocatalizadores mediante espectroscopía de absorción atómica. Para esto, las muestras fueron sometidas a una digestión ácida con el objetivo de eliminar la materia orgánica perteneciente a los soportes previo a la cuantificación. Se tomaron 1,50 mL de la dispersión en agua *Milli-Q* del bionanocatalizador correspondiente, y se la llevó a sequedad. Posteriormente, una masa conocida del material seco fue colocada en un crisol al que se le agregaron 0,05 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado y 1,00 mL de HCl 6M. Finalmente la muestra se calentó en un baño de arena, y se agregaron cantidades sucesivas de ácidos en caliente hasta lograr la digestión completa de la muestra. La solución obtenida fue llevada a 10,00 mL finales empleando HNO<sub>3</sub> 10% p/p y reservada para su cuantificación.

Las determinaciones fueron realizadas empleando un equipo Varían AA240 FLAME AA. El método de cuantificación utilizado fue estándar externo empleándose soluciones estándares de platino y plata como patrones. Para la obtención de las curvas de calibración se prepararon diluciones de distinta concentración a partir de una solución madre de 200 ppm del metal correspondiente, utilizando agua *Milli-Q*. El análisis se realizó por duplicado.

### VI.2.3.2 Caracterización por TEM y SAXS

Dado que para la caracterización de los catalizadores preparados se emplearán las técnicas descritas en los capítulos previos, en esta sección se mencionarán aquellos detalles del procedimiento que sean diferentes en cuanto a equipamiento y preparación de la muestra. Las muestras fueron caracterizadas en dispersión o como polvos obtenidos por liofilización de las mismas.

Las curvas de SAXS de las muestras P/SLP/Pt10 y P/SLP/Pt5 fueron adquiridas como se describió anteriormente. Las curvas obtenidas por sustracción de la contribución de los soportes al perfil de SAXS de los bionanocatalizadores fueron ajustadas empleando el programa SAXSView utilizando como factor de forma el modelo *Sphere*.

Las imágenes TEM fueron adquiridas como se describió previamente. La caracterización de los bionanocatalizadores monometálicos se llevó a cabo en tres equipos, el Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL 100 CX II de 100 kV, el equipo FEI TALOS F200A operado a 200 kV, perteneciente a YPF Tecnología, La Plata y el Microscopio de Transmisión Electrónica modelo TEM Philips CM200UT (LaB<sub>6</sub>) operado a 200 kV, perteneciente al Laboratorio de microscopía del Grupo Física de Metales, CNEA-Bariloche. En base a las imágenes se obtuvieron los tamaños de partícula según se definieron en el Capítulo III. En adición, se calculó la dispersión metálica (D) de las nanopartículas en los catalizadores empleando la siguiente ecuación:

$$D = \frac{6 M}{\sigma \rho_M} \left( \frac{\sum n_i d_i^2}{\sum n_i d_i^3} \right) \quad \text{Ecuación VI.1}$$

donde M y  $\rho_M$  representan el peso atómico y la densidad del metal presente en el catalizador analizado, respectivamente, y  $\sigma$  es el área superficial ocupada por un mol de metal tomando un valor de  $3,75 \times 10^4 \text{ m}^2/\text{mol}$  para el platino y  $1,05 \times 10^4 \text{ m}^2/\text{mol}$  para la plata. La dispersión metálica representa la fracción de átomos metálicos localizados en la superficie de un sistema [Bergeret & Gallezot, 2008].

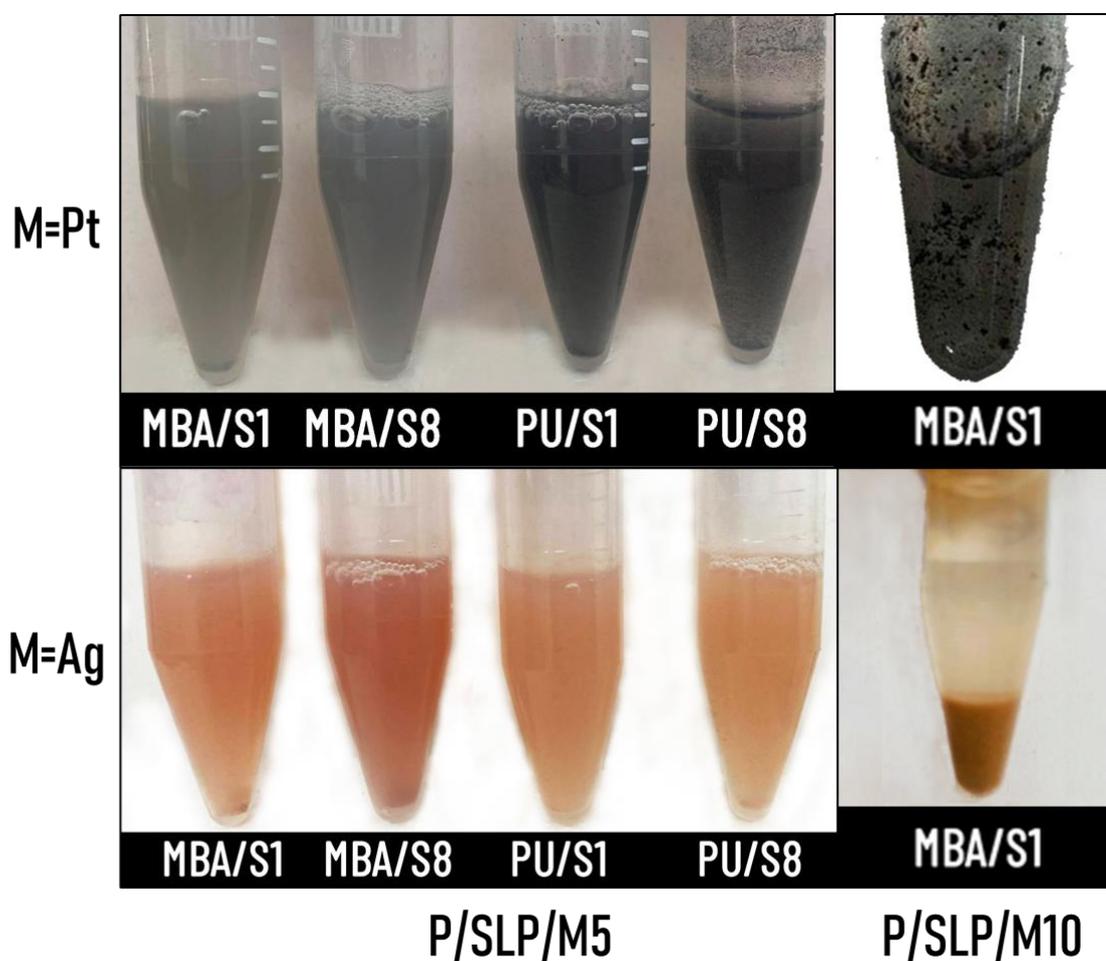
## VI.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### VI.3.1 Preparación de los bionanocatalizadores de platino y plata

Concluido el período de reducción, es decir, al finalizar el pasaje de la corriente de H<sub>2</sub>, las dispersiones se tornaron negras o grises en el caso de los sistemas conteniendo platino, y rojizas o pardas en el caso de los sistemas conteniendo plata. Esta observación cualitativa denotó la formación de partículas metálicas en los sistemas. Un aspecto para destacar sobre la preparación llevada a cabo es que los intentos de reducir los precursores metálicos en presencia de las partículas de polímero (en ausencia de las SLP) no

condujeron a la obtención de nanopartículas metálicas en ningún caso, mostrando así el rol fundamental que cumplen las SLP en este desarrollo.

Luego del proceso de reducción, las muestras denominadas P/SLP/M5 permanecieron en suspensión y demostraron poseer una estabilidad coloidal en el tiempo, mientras que las muestras denominadas P/SLP/M10 evidenciaron la formación de agregados al transcurrir el tiempo de almacenamiento, como puede observarse en la imagen VI.1. Dado que los sistemas P/SLP/M10 no presentaron las características macroscópicas buscadas para los mismos no fueron considerados para ser utilizados como catalizadores. No obstante, algunos de ellos fueron caracterizados con el fin de profundizar en su estudio y corroborar las observaciones cualitativas.



**Imagen VI.1 (A)** Imagen de los sistemas P/SLP/M5 conteniendo nanopartículas de platino **(B)** Imagen del sistema MBA/S1/Pt10, **(C)** Imagen de los sistemas P/SLP/M5 conteniendo nanopartículas de plata, **(D)** Imagen del sistema MBA/S1/Ag10

## VI.3.2 Caracterización de los bionanocatalizadores

### VI.3.2.1 Contenido metálico

Con el fin de conocer el contenido metálico de los catalizadores se evaluó la carga metálica de los bionanocatalizadores denominados P/SLP/M5. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla VI.2.

**Tabla VI.2** Determinación del contenido metálico de los catalizadores.

SISTEMA	Carga Metálica (%)
MBA/S1/Pt5	1,0 ± 0,5
MBA/S8/Pt5	1,3 ± 0,1
PU/S1/Pt5	1,60 ± 0,01
PU/S8/Pt5	1,4 ± 0,2
MBA/S1/Ag5	1,37 ± 0,06
MBA/S8/Ag5	1,00 ± 0,02
PU/S1/Ag5	1,6 ± 0,1
PU/S8/Ag5	1,77 ± 0,08

Los bionanocatalizadores preparados por la técnica de impregnación húmeda utilizada presentaron un contenido metálico de entre el 1 y el 1,8 %, valores que distan en gran medida del valor nominal establecido en la preparación (5%). Respecto a la influencia de los componentes del soporte en el contenido metálico no se observa una tendencia clara, por lo tanto, no es posible concluir respecto a la influencia del polímero o la proteína sobre la cantidad de metal presente en el sistema.

### VI.3.2.2 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

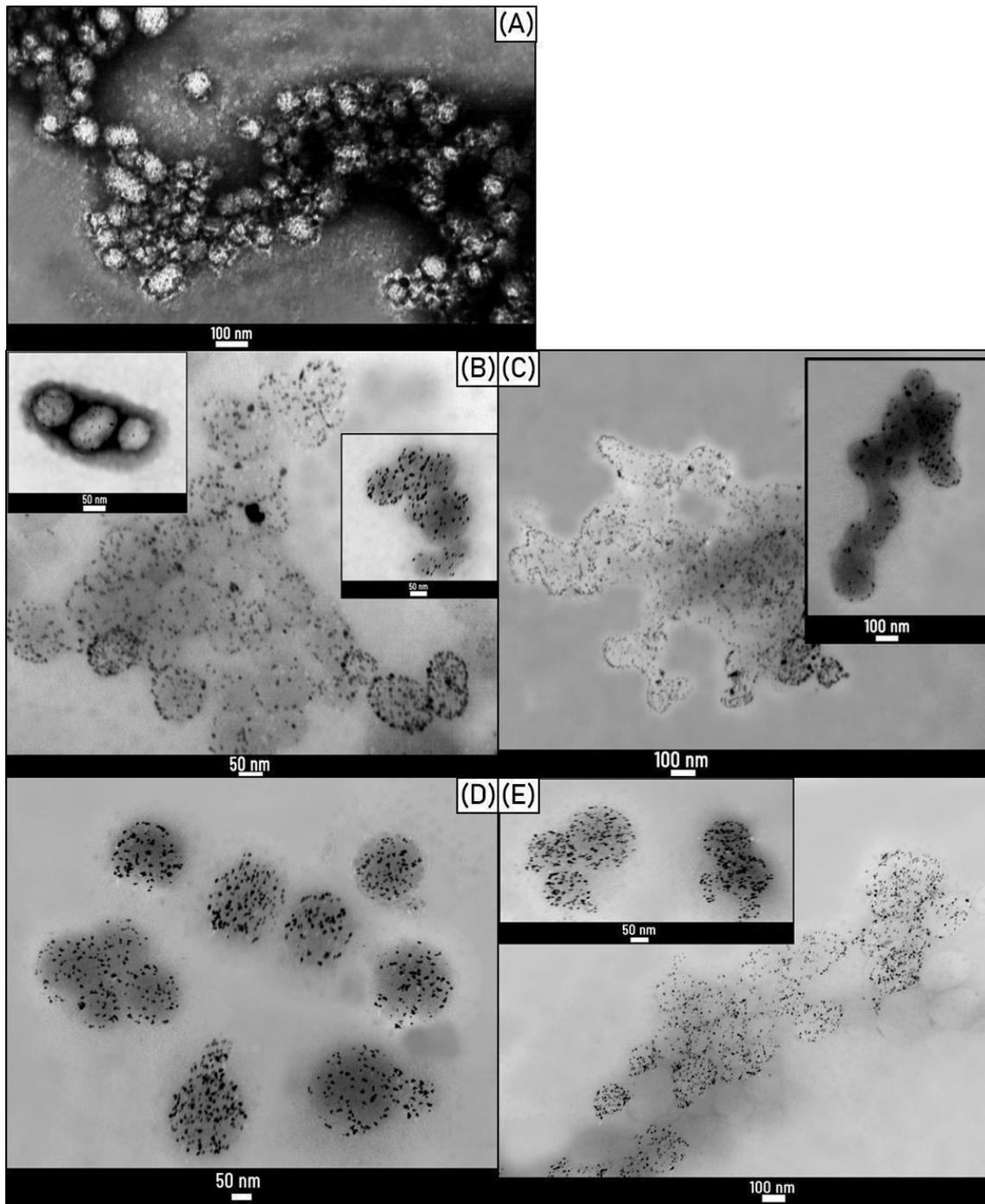
En las imágenes VI.2 y VI.3 se presentan las micrografías TEM de las muestras conteniendo nanopartículas de platino y plata respectivamente. En estas imágenes puede verse la presencia de nanopartículas metálicas. En todos los casos se observan sistemas con morfología *strawberry*, es decir, se distinguen pequeñas partículas metálicas esféricas presentes en toda la superficie del soporte polímero/proteína.

Los sistemas denominados P/SLP/M10 (imágenes VI.2.A y VI.3.A para MBA/S1/Pt10 y MBA/S1/Ag10, respectivamente) presentaron una abundante cantidad de nanopartículas metálicas, con presencia de nanoaglomerados de hasta 20 nm en el caso del platino y 50 nm en el caso de la plata que dificultaron la determinación del tamaño de las nanopartículas.

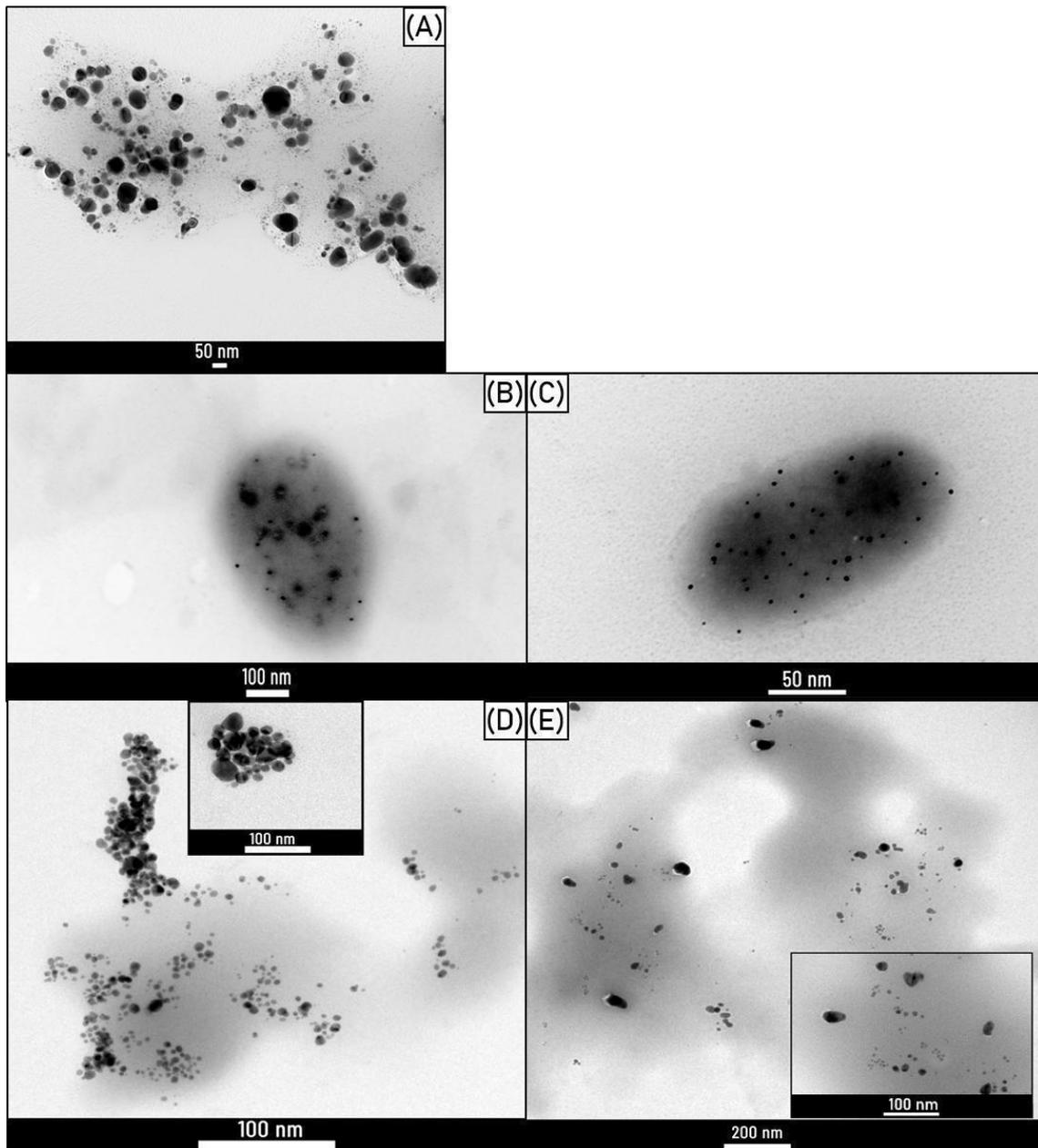
Estas observaciones microscópicas, junto a la evidente presencia de agregados macroscópicos en las suspensiones de las muestras (imagen VI.1 para P/SLP/M10), hicieron que las mismas no sean consideradas aptas para los fines catalíticos establecidos en este trabajo.

En cuanto a los sistemas denominados P/SLP/Pt5 se observó la misma morfología, caracterizada por la presencia de nanopartículas metálicas sobre los sistemas polímero/proteína uniformemente dispersas, aunque con algunos pequeños aglomerados que en ningún caso superaron los 10 nm de tamaño. Si bien los sistemas presentaron morfología *strawberry*, se observaron diferencias en la localización de las nanopartículas metálicas en función de la SLP utilizada. Cuando se utilizó la SLP S1 se obtuvieron sistemas en los que las nanopartículas metálicas se encuentran sobre toda la superficie expuesta de los soportes polímero/proteína, siendo posible identificar a las partículas nanocompuestas de manera individual aunque estén formando parte de pequeños grupos (imagen VI.2B y VI.2D). En la imagen insertada en la foto VI.2.B, que fue adquirida empleando tinción negativa, se puede confirmar que, aunque estén agrupadas, las partículas mantienen su carácter individual. En el caso de los sistemas obtenidos empleando la SLP S8, las partículas nanocompuestas presentaron un mayor grado de coalescencia, pudiendo observarse zonas de contacto entre las partículas del soporte (Imagen VI.2 C y E). Cabe destacar que en estos sistemas también se encontraron partículas formando agrupaciones pequeñas (imágenes insertadas en Imagen VI.2 C y E), aunque no individuales. Este mayor grado de vinculación entre las partículas de soporte al emplear la SLP S8 indicaría que esta proteína induciría una mayor interacción entre ellas, como consecuencia, los nanocompuestos coloidales no se observan como entidades individuales con facilidad como en el caso de la SLP S1. En la Imagen VI.4 (A y B, derecha) se presentan imágenes STEM-HAADF de las muestras MBA/SLP/Pt. En estas, se pueden apreciar regiones brillantes asociadas con las áreas que contienen elementos pesados, asignadas en este caso a la presencia del platino en los sistemas. En ambos casos se observa la presencia de puntos brillantes asociados a las partículas metálicas. No obstante, la muestra obtenida con S1 (Imagen VI.4 A, derecha) ofreció una distribución uniforme del brillo en los sistemas, mientras que el sistema obtenido con S8 presentó una zona brillante intensa entre las partículas del soporte, sugiriendo como se mencionó antes que la proteína influye de alguna manera sobre la morfología de los nanocompuestos preparados.

En el caso de las muestras P/SLP/Ag5 se observaron diferencias importantes según el tipo de polímero empleado en el soporte. En este sentido, los sistemas MBA/SLP/Ag5 presentaron características similares a las descritas para P/SLP/Pt5, mientras que los sistemas PU/SLP/Ag5 presentaron una menor dispersión de las partículas metálicas, observándose regiones con aglomerados de nanopartículas individuales, sin observarse sinterizados entre las mismas. En adición, se pueden apreciar grandes regiones ocupadas por los soportes polímero/proteína.



**Imagen VI.2** Micrografías TEM de los sistemas conteniendo nanopartículas de platino (A) MBA/S1/Pt10, (B) MBA/S1/Pt5, (C) MBA/S8/Pt5, (D) PU/S1/Pt5, (E) PU/S8/Pt5



**Imagen VI.3** Micrográficas TEM de los sistemas conteniendo nanopartículas de plata (A) MBA/S1/Ag10, (B) MBA/S1/Ag5, (C) MBA/S8/Ag5, (D) PU/S1/Ag5, (E) PU/S8/Ag5

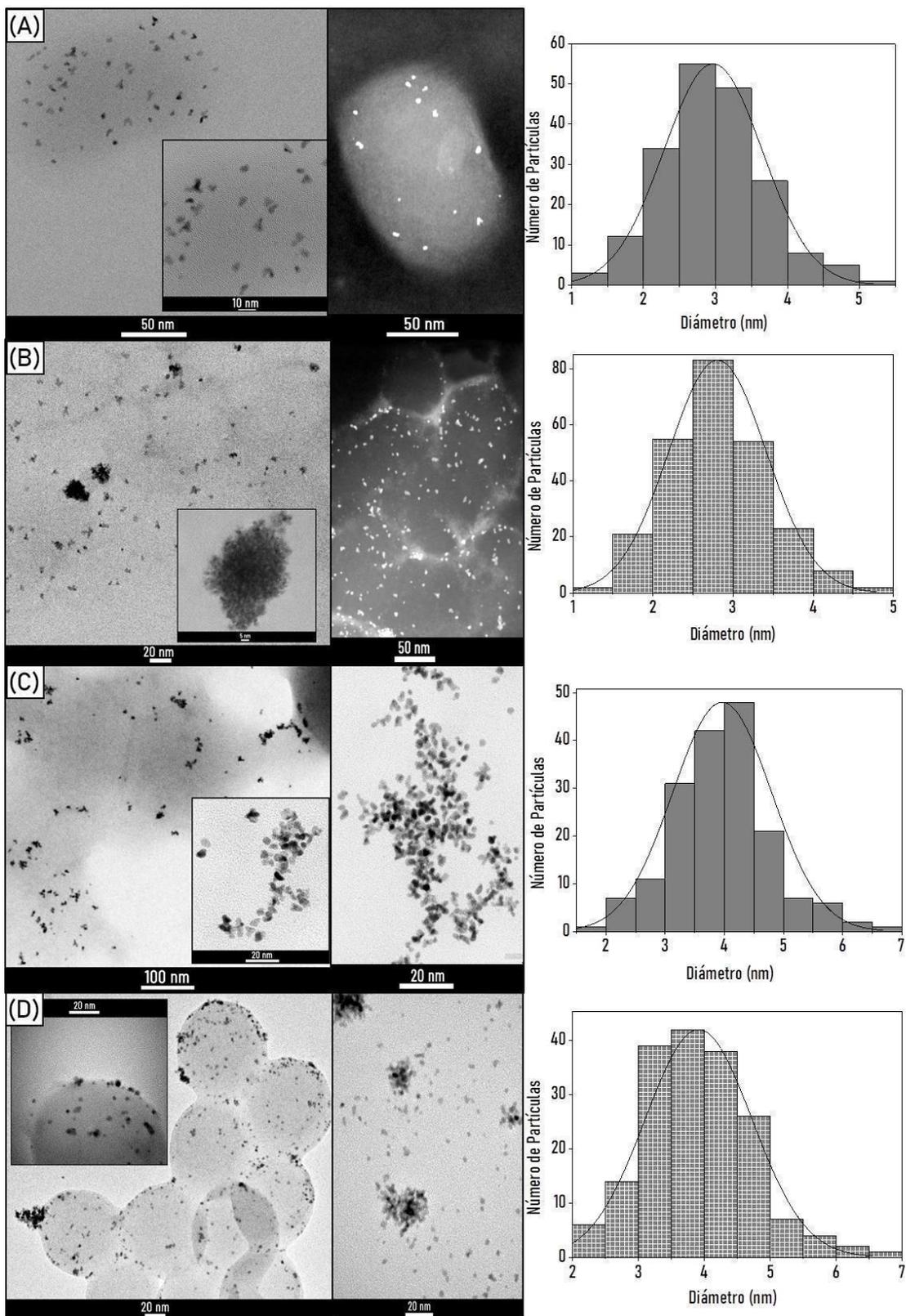
En las imágenes VI.4 y VI.5 se presentan micrográficas adicionales de los sistemas P/SLP/M5 junto a los histogramas de tamaño, para los sistemas conteniendo platino y plata respectivamente. A partir del análisis de las imágenes fue posible determinar el tamaño de las nanopartículas metálicas junto con la dispersión metálica (D) de las mismas. En el caso del platino las nanopartículas presentaron tamaños en el rango de 2 a 4 nm correspondientes a grados de dispersión metálica de entre 28 y 40%. Por otro lado, las nanopartículas de plata presentaron tamaños algo mayores a los de platino encontrándose en el rango de 6 a 8 nm con dispersiones metálicas de entre 14 a 18 %. En la tabla VI.3 se

presenta un resumen del tamaño de nanopartícula metálica y dispersión para cada bionanocatalizador obtenido.

**Tabla VI.3** Tamaño y dispersión de las nanopartículas metálicas

SISTEMA	$d_n$ (nm)	$d_s$ (nm)	$d_v$ (nm)	IP= $d_v/d_n$	D (%)
MBA/S1/Pt5	2,97	3,31	3,47	1,17	37,88
MBA/S8/Pt5	2,81	3,09	3,23	1,15	40,00
PU/S1/Pt5	3,96	4,21	4,35	1,10	28,39
PU/S8/Pt5	3,91	4,16	4,30	1,10	28,71
MBA/S1/Ag5	6,17	7,33	7,83	1,27	18,97
MBA/S8/Ag5	6,26	7,28	7,79	1,25	18,70
PU/S1/Ag5	7,88	8,53	8,85	1,12	14,85
PU/S8/Ag5	8,06	9,26	9,83	1,22	14,53

En todos los casos se observó un mayor tamaño de partícula para las nanopartículas de plata y, como consecuencia, estos sistemas presentan una menor dispersión metálica. En relación a la naturaleza del soporte, para ambos metales se obtuvieron nanopartículas de mayor tamaño cuando se empleó p-U como componente del soporte, independientemente de la SLP utilizada. Cabe destacar que los tamaños de las nanopartículas metálicas obtenidos son similares a lo reportado al reducir los precursores metálicos directamente sobre las proteínas S1 y S8 [Bolla et al., 2020<sup>a</sup>; Bolla et al., 2020<sup>b</sup>], lo que confirma que la interacción de las proteínas con las partículas poliméricas no modificó su capacidad para actuar como *biotemplates* en la obtención de *nanoclusters* metálicos.



**Imagen VI.4** Imágenes TEM (izquierda-centro) y/o micrografías STEM-HAADF (medio), histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de platino: **(A)** MBA/S1/Pt5, **(B)** MBA/S8/Pt5, **(C)** PU/S1/Pt5, **(D)** PU/S8/Pt5

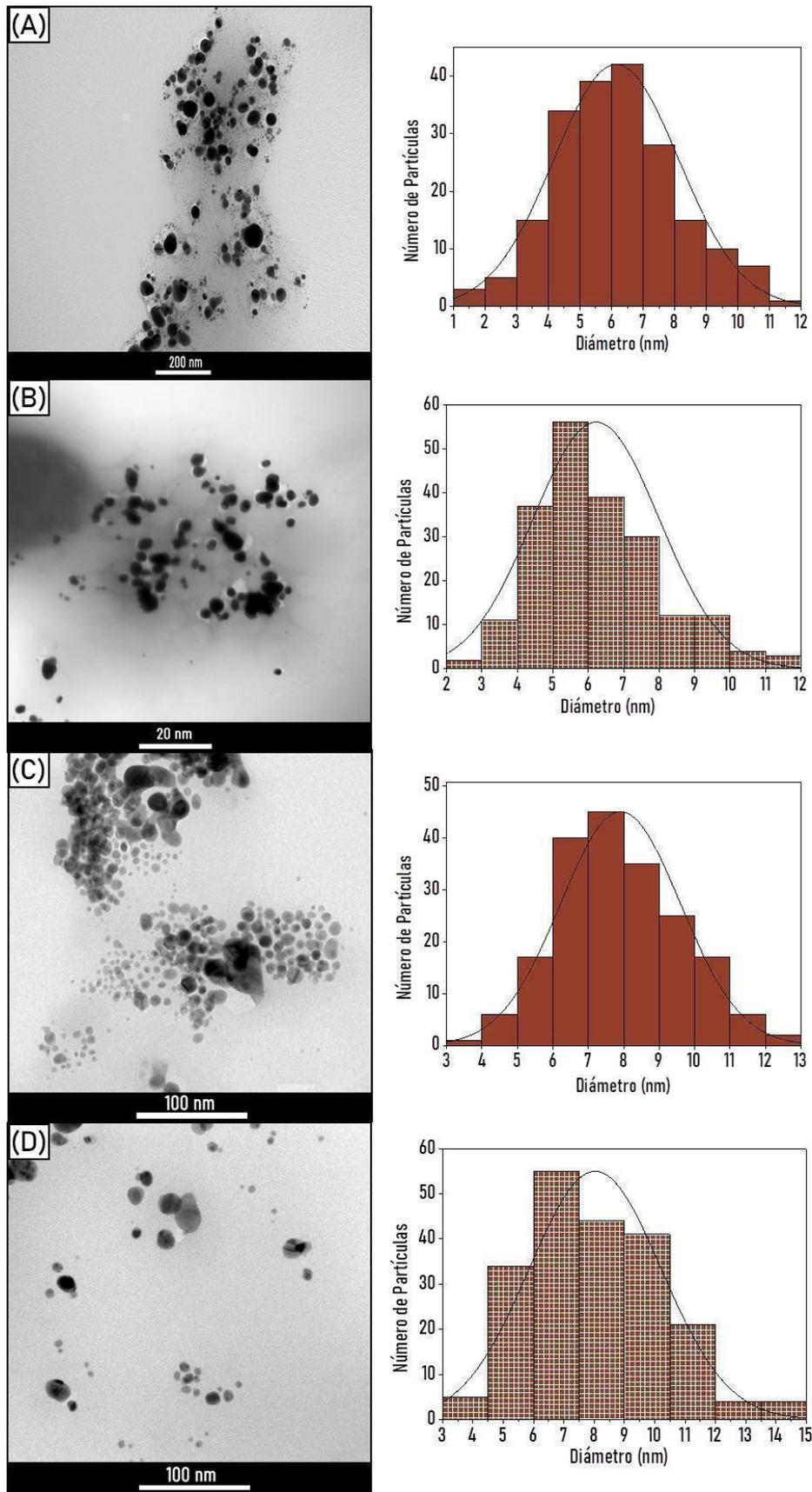
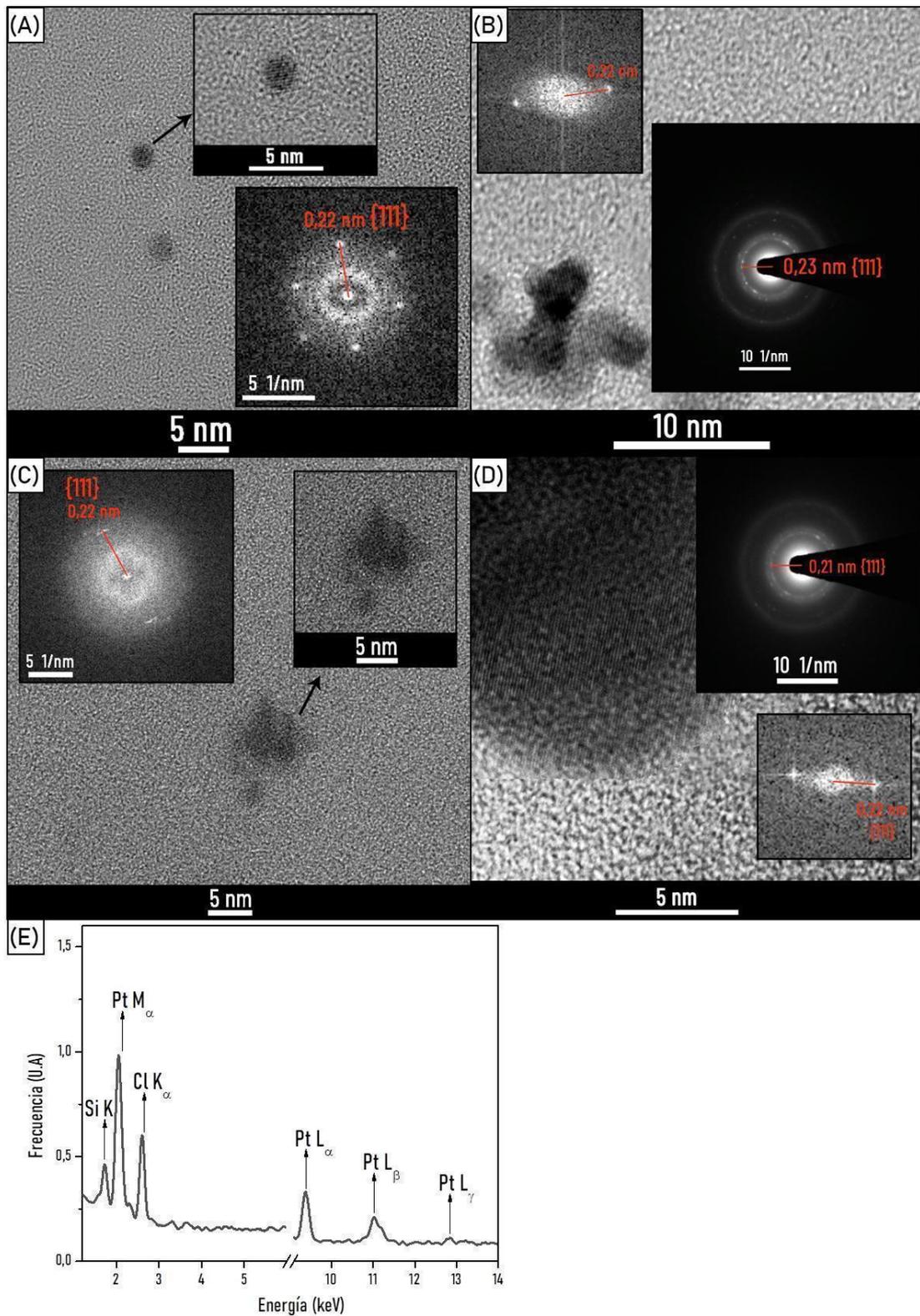


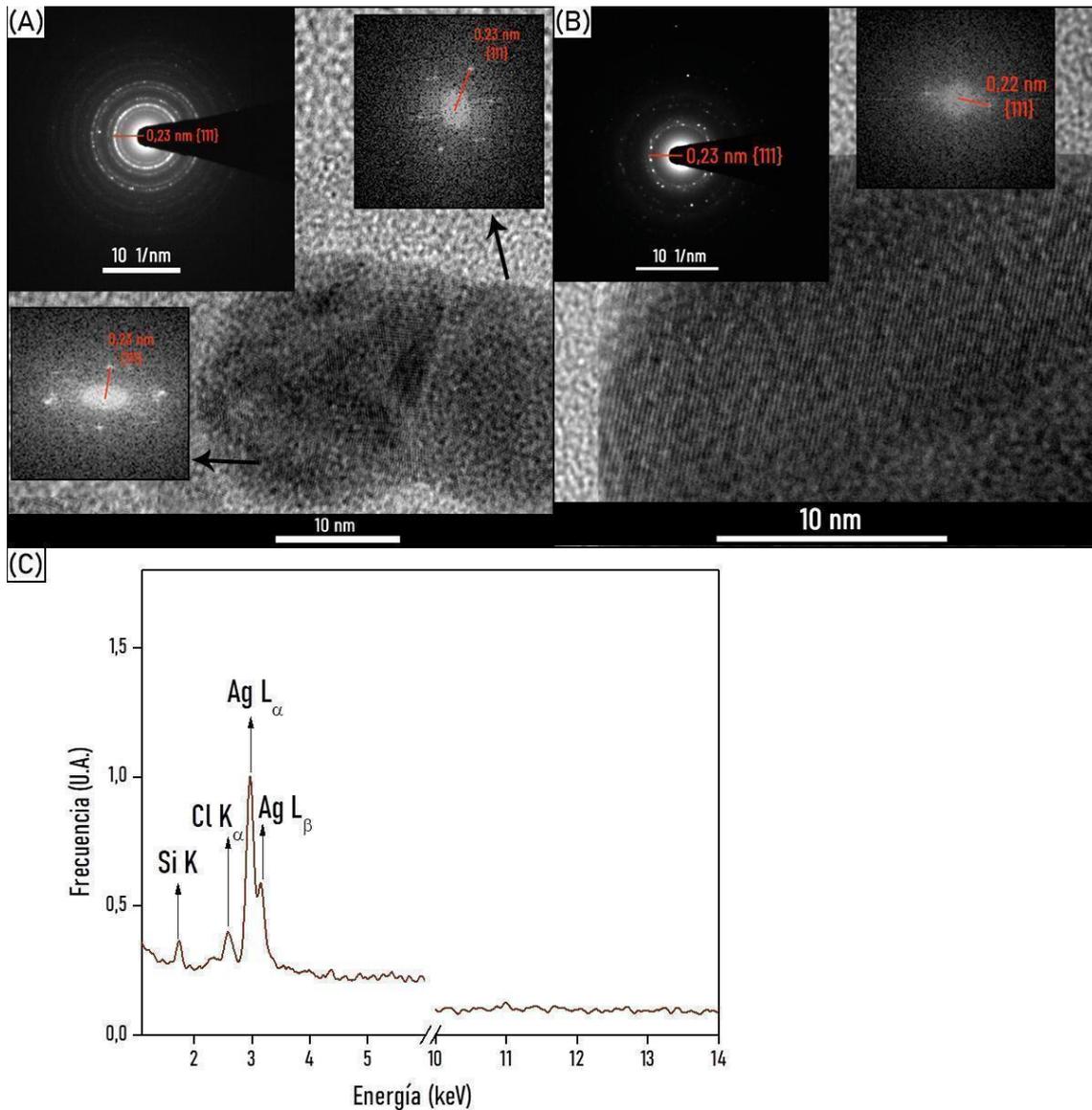
Imagen VI.5 Imágenes TEM (izquierda), histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de plata: (A) MBA/S1/Ag5, (B) MBA/S8/Ag5, (C) PU/S1/Ag5, (D) PU/S8/Ag5

En las imágenes VI.6 y VI.7 se presentan las imágenes tomadas en el modo HR-TEM, los patrones de difracción de área seleccionada y los espectros EDS obtenidos para las muestras conteniendo nanopartículas de platino y plata respectivamente. En los casos en los que fue posible se tomaron imágenes en las que se observó la presencia de planos cristalinos en las nanopartículas metálicas. En esos casos se pudo determinar una distancia interplanar de 0,22 nm para las nanopartículas metálicas de los sistemas P/SLP/Pt5, la cual es coincidente con la reportada para el plano {111} del platino [Miyazawa et al., 2017]. Por otro lado, en el caso de los sistemas P/SLP/Ag5 la distancia interplanar obtenida resultó coincidente con la reportada para el plano {111} de la plata [Kaur et al., 2013]. En el caso del platino, las imágenes HR-TEM permitieron evidenciar el gran alineamiento de los planos atómicos en las nanopartículas como se observa en las imágenes VI.6 B y D, mientras que las nanopartículas de plata presentaron una estructura cristalina no orientada (imagen VI.7A), situaciones típicas para cada metal.

En las imágenes VI.6 B y D y en la imagen VI.7 se presentan los patrones de difracción de área seleccionada para las nanopartículas de platino y plata respectivamente. Los resultados obtenidos para las distancias interplanares medidas a partir del anillo más brillante (plano cristalino mayoritario) en cada caso están de acuerdo con la distancia interplanar obtenida por HR-TEM. La identidad química de las nanopartículas fue confirmada empleando dispersión de rayos X (EDS), en las figuras VI.6E y VI.7C se presentan los espectros típicamente obtenidos para los sistemas con nanopartículas de platino y plata respectivamente. El análisis de los mismos se llevó a cabo empleando el Software NIST DTSA-II Lorentz a partir del cual se asignaron las bandas. A partir de los espectros de los sistemas P/SLP/Pt y P/SLP/Ag fue posible confirmar la identidad de las nanopartículas metálicas, ya que se identificaron las señales típicas de platino y plata atómicos respectivamente. En ambos casos se observaron también señales asociadas a la presencia de cloro dado que este elemento se encuentra en los sistemas debido al buffer-B empleado en su purificación.



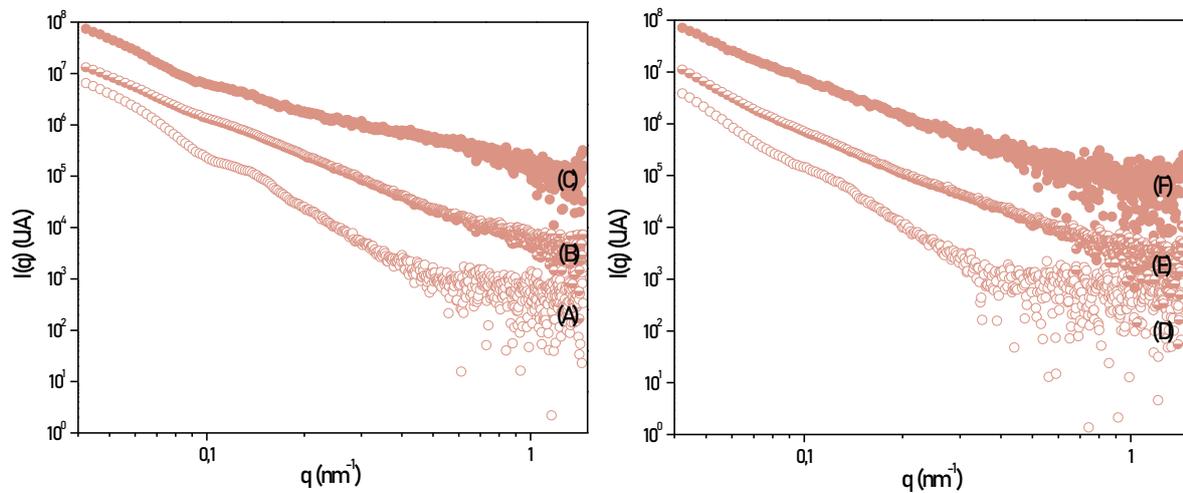
**Imagen VI.6** Imágenes HR-TEM, transformada rápida de Fourier y patrones de difracción de área seleccionada (insertados) de los sistemas conteniendo nanopartículas de platino: (A) MBA/S1/Pt5, (B) PU/S1/Pt5, (C) MBA/S8/Pt5, (D) PU/S8/Pt5 (E) Espectro EDS típicamente obtenido para estas muestras.



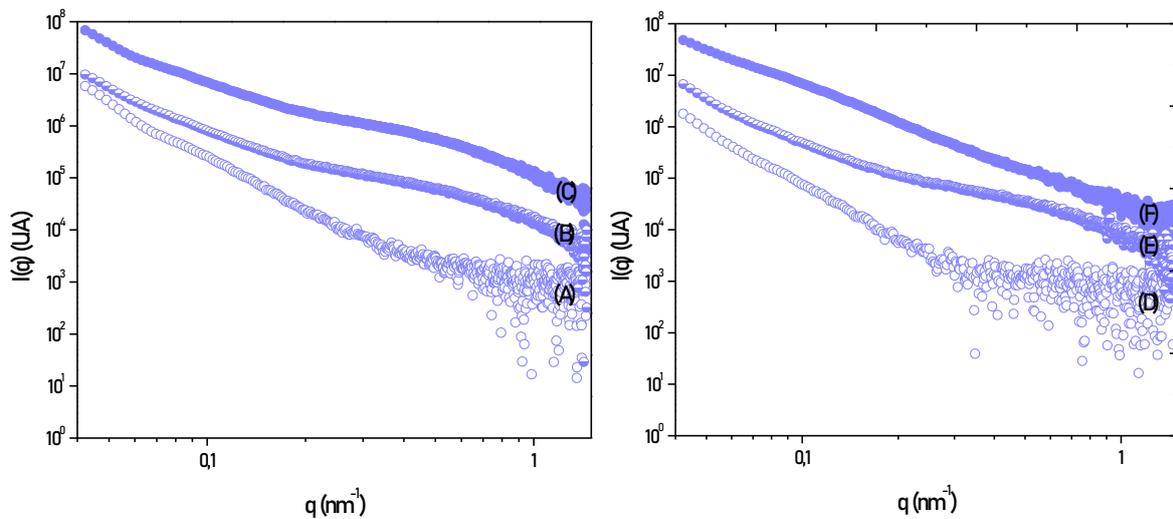
**Imagen VI.7** Imágenes HR-TEM, transformada rápida de Fourier y patrones de difracción de área seleccionada (insertados) de los sistemas conteniendo nanopartículas de plata: **(A)** PU/S1/Ag5, **(B)** PU/S8/Ag5 **(C)** Espectro EDS típicamente obtenido para estas muestras.

### VI.3.2.3 Dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS)

Las figuras VI.1 y VI.2 muestran las curvas SAXS obtenidas para los nanocatalizadores obtenidos con Pt (P/S1/Pt y P/S8/Pt, respectivamente) junto a la curva de SAXS de su correspondiente soporte con fines comparativos. Las curvas SAXS de los nanocatalizadores mostraron diferencias apreciables con respecto a las del soporte para valores de  $q$  mayores a  $0,2 \text{ nm}^{-1}$ , observándose un aumento de la intensidad relacionado con una contribución proveniente de la dispersión asociada a las nanopartículas de Pt.



**Figura VI.1** Curvas SAXS para los sistemas obtenidos empleando MBA, soportes y nanocatalizadores (A) MBA/S1 (B) MBA/S1/Pt5 (C) MBA/S1/Pt10 (D) MBA/S8 (E) MBA/S8 Pt/5 (F) MBA/S8/Pt10. Las curvas fueron desplazadas para mayor claridad visual.



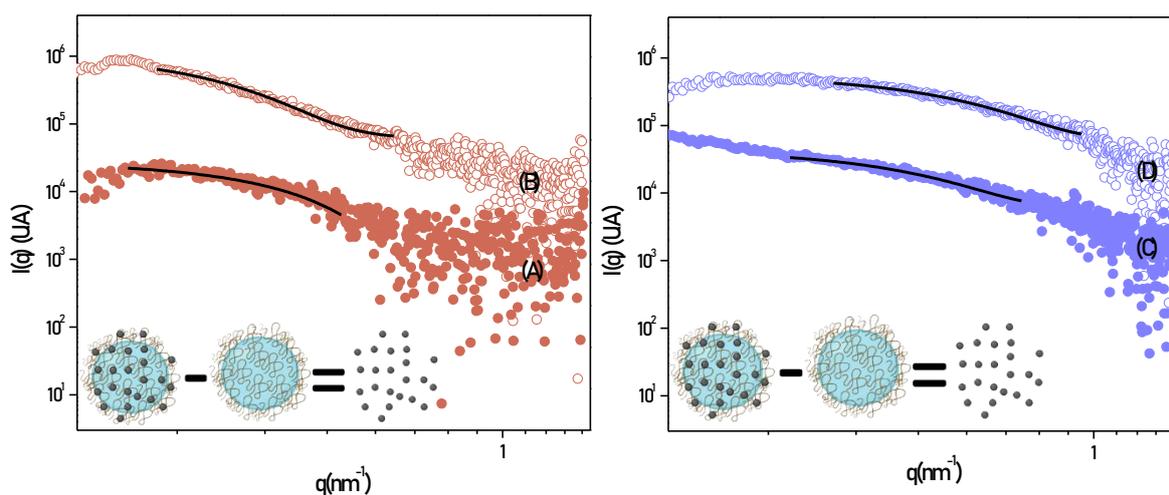
**Figura VI.2** Curvas SAXS para los sistemas obtenidos empleando PU, soportes y nanocatalizadores (A) PU/S1 (B) PU/S1/Pt5 (C) PU/S1/Pt10 (D) PU/S8 (E) PU/S8/Pt5 (F) PU/S8 Pt/10. Las curvas fueron desplazadas para mayor claridad visual.

Para las muestras P/SLP/Pt5, mediante la sustracción de la contribución de los soportes a la curva de SAXS de los nanocatalizadores, se obtuvieron curvas conteniendo principalmente la contribución a la dispersión a bajo ángulo por parte de las nanopartículas metálicas, las cuales se muestran en la Figura VI.3. Las mismas fueron ajustadas con el modelo *Sphere* con el que se logró el mejor ajuste en todos los casos, empleando el valor de la densidad electrónica (SLD)  $6,3 \times 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$  para el platino [Harwood et al., 1988]. En la figura VI.3 se presentan como una línea continua los ajustes obtenidos con los que se logró

estimar el tamaño de las partículas metálicas que se presenta en la Tabla VI.4, junto a los otros parámetros arrojados por el modelo.

**Tabla VI.4** Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas sin contribución del soporte para los sistemas denominados P/SLP/Pt5

SISTEMA	R (nm)	PDI	SLD ( $\text{\AA}^{-2}$ )	$\chi^2$
MBA/S1/Pt5	4,63	0,46	$6,3 \times 10^{-6}$	0,026
MBA/S8/Pt5	3,63	0,18	$6,3 \times 10^{-6}$	0,180
PU/S1/Pt5	5,81	0,55	$6,3 \times 10^{-6}$	0,009
PU/S8/Pt5	4,48	0,15	$6,3 \times 10^{-6}$	0,033



**Figura VI.3** Curvas SAXS para los sistemas denominados P/SLP/Pt5 obtenidas por sustracción de la contribución del soporte, ajustes efectuados con el modelo Sphere (trazo continuo) (A) MBA/S8/Pt5 (B) MBA/S1/Pt5 (C) PU/S8/Pt5 (D) PU/S1/Pt5. Las curvas fueron desplazadas para mayor claridad visual.

Por este método se obtuvieron tamaños de partícula de entre 3 y 5 nm, y de entre 4 y 6 nm para las nanopartículas de platino soportadas sobre MBA/SLP y p-U/SLP, respectivamente. Este rango de valores se encuentra en concordancia con lo determinado por TEM, observándose una vez más un mayor tamaño de partículas metálicas en aquellos catalizadores obtenidos sobre soportes conteniendo p-U.

## VI.4 CONCLUSIONES PARCIALES

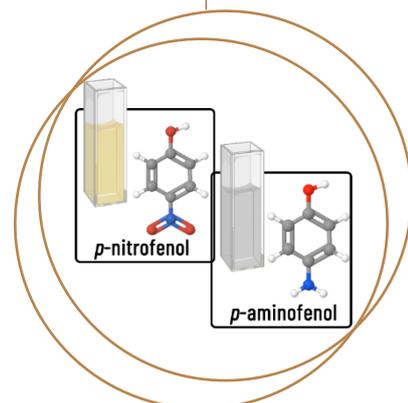
Se lograron obtener bionanocatalizadores con una carga metálica de aproximadamente un 1,5% p/p constituidos por nanopartículas metálicas de Pt o Ag soportadas sobre sistemas polímero/SLP empleando una metodología simple y económica, en un medio acuoso y en condiciones suaves y amigables por el medio ambiente durante todo el proceso de producción.

En base a microscopia TEM se observó que los bionanocatalizadores presentaron una morfología tipo *strawberry*, con nanopartículas metálicas cuyos tamaños fueron de entre 2 y 4 nm en el caso del platino, y de entre 6 a 8 nm en el caso de la plata, observándose en ambos casos planos cristalinos con una distancia interplanar coincidente con la reportada para el plano {111} de ambos metales. Los resultados obtenidos por SAXS estuvieron en acuerdo con los tamaños de partículas indicados. En todos los casos, se observó que las nanopartículas metálicas obtenidas sobre soportes constituidos por poliuretano presentaron un tamaño mayor que sus contrapartes obtenidas sobre poliacrílico.

# VII

Capítulo VII

## ESTUDIO DE LA PERFORMANCE CATALÍTICA: REDUCCIÓN DE *p*-NITROFENOL



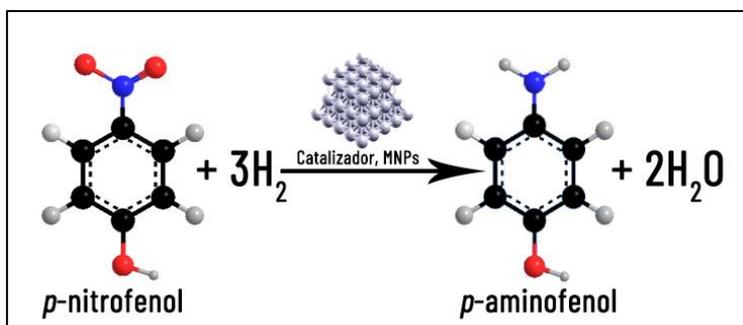
En este capítulo se presenta el estudio de la performance catalítica de los bionanocatalizadores obtenidos frente a la reacción de reducción en fase acuosa de *p*-nitrofenol empleando como reductor borohidruro de sodio.

Se presenta también el análisis en la influencia de la naturaleza del soporte, y la relación molar sustrato/catalizador en la conversión y constante de velocidad aparente.

## VII. ESTUDIO DE LA PERFORMANCE CATALÍTICA: REDUCCIÓN DE *p*-NITROFENOL

### VII.1 INTRODUCCIÓN

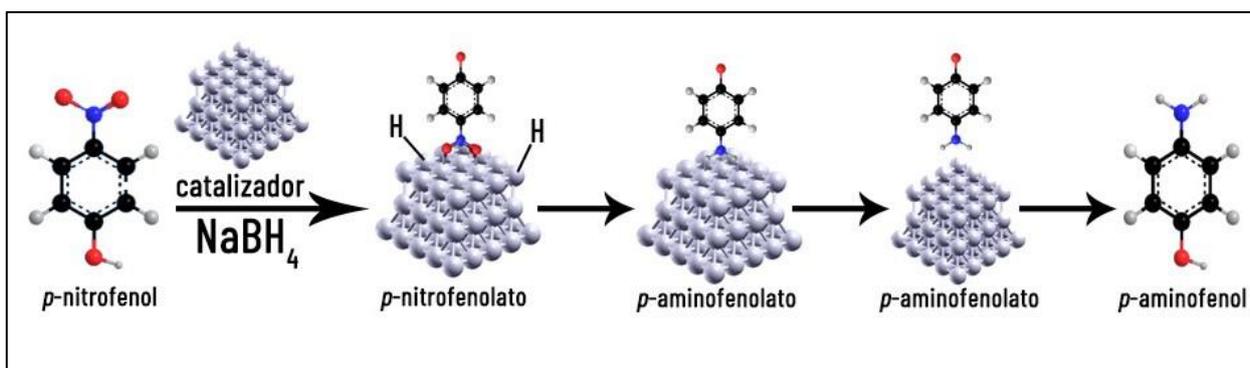
La síntesis de nanopartículas de metales nobles ha protagonizado muchas investigaciones debido a sus propiedades únicas. Su uso en la catálisis es una de las aplicaciones químicas más importante que poseen estos sistemas. Sin embargo, su uso como catalizador está a menudo limitado por la inestabilidad de las MNPs, por lo cual se han incorporado a sus síntesis agentes estabilizadores como los polímeros, los cuales previenen su agregación [Spadaro et al., 2010]. En este sentido, la reacción catalítica se comporta como un sistema bifásico en el cual se encuentra el catalizador en una fase sólida diferenciada de la fase líquida en donde se encuentran los reactivos usualmente disueltos. A menudo la reducción del grupo nitro de un compuesto dado frente a un exceso de  $\text{NaBH}_4$  ha sido utilizada como una reacción modelo para examinar el comportamiento catalítico de nanopartículas metálicas. En este sentido, la reducción de *p*-nitrofenol (*p*-NP) a *p*-aminofenol (*p*-AP) es una de las reacciones más utilizadas. Los ensayos de reacción en ausencia de catalizador, no muestran ningún cambio en la concentración de *p*-NP en el tiempo [Gomez et al., 2012]. Sin embargo, en general cuando los nanocatalizadores están presentes en el sistema la conversión suele ser completa. Los análisis espectrales UV-visibles del sistema reactivo durante el avance de reacción evidencian un punto isobéptico indicando la existencia de una reacción única. En algunos casos, se observó que la reacción transcurre con un claro comportamiento bifásico, con una fase inicial de reacción más lenta (período de inducción) seguida de la fase estacionaria con velocidad de reacción aproximadamente constante [Gu et al., 2014]. En otros trabajos se señala que este período de inducción tiende a disminuir con el aumento de la temperatura de reacción. La reacción de reducción de *p*-NP ocurre con un mecanismo concertado representado en el esquema VII.1.



Esquema VII.1 Representación y mecanismo de reacción de la reducción de *p*-nitrofenol.

La reacción presentada, al igual que la mayoría de las reacciones químicas, es acelerada drásticamente por catalizadores, ya sea de forma homogénea o heterogénea. Para describir el proceso propio de la catálisis heterogénea se han propuesto dos

mecanismos de reacción principales: el de Langmuir–Hinshelwood y el de Eley–Rideal. En el mecanismo de Langmuir–Hinshelwood las dos especies que reaccionan son quimisorbidas en la superficie del catalizador antes de que la reacción comience, mientras que en la propuesta de Eley-Rideal, una especie se encuentra inicialmente quimisorbida mientras que la otra reacciona directamente desde la fase en contacto. El mecanismo de Eley-Rideal describe una reacción entre un reactivo que ha sido quimisorbido y otro que no lo ha sido [Weinberg, 1996]. La reacción de reducción acuosa de *p*-nitrofenol fue modelada en términos cinéticos en múltiples instancias concluyéndose que la misma presenta una cinética tipo Langmuir-Hinshelwood (esquema VII.2) [Wunder et al., 2010; Zhao et al., 2015].

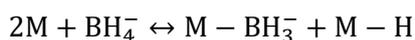


Esquema VII.2 Representación y mecanismo de reacción- Cinética Langmuir-Hinshelwood

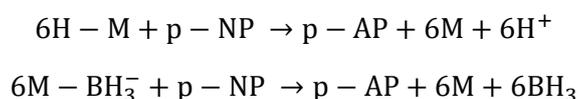
### VII.1.1 Catálisis heterogénea reducción de *p*-nitrofenol: Mecanismo de Langmuir-Hinshelwood

En este modelo se evalúa el avance de la reacción según la concentración de un reactivo a un tiempo  $t$  respecto a su concentración inicial. Esta puede seguirse por evaluación de la velocidad de aparición de productos o desaparición de reactivos mediante algún método analítico adecuado.

La descomposición del  $\text{NaBH}_4$  en presencia de metales procede generando dos intermediarios reactivos:  $\text{M-H}$  y  $\text{MBH}_3^-$  [Rakap & Özkar, 2012] según:



Estas especies reactivas serían las encargadas de reducir el *p*-nitrofenol a *p*-aminofenol con un consumo estequiométrico de 6 electrones [Holbrook & Twist, 1971] según:



A partir de esta observación el mecanismo de la reacción sería concertado (esquema VII.1). El NaBH<sub>4</sub> posee una elevada capacidad reductora, liberando hidrógeno gaseoso en soluciones acuosas a temperatura ambiente, proceso que se ve acelerado por distintos metales.

Teniendo en cuenta este mecanismo, es sencillo calcular la conversión del sustrato (C%) con la siguiente ecuación general:

$$C(\%) = \frac{(C_0 - C_t)}{C_0} 100 \quad \text{Ecuación VII.1}$$

donde C<sub>0</sub> y C<sub>t</sub> son las concentraciones molares de *p*-nitrofenol inicial (t<sub>0</sub>) y en un tiempo t, respectivamente. Este parámetro describe la proporción de reactivo que se ha consumido a tiempo t.

Cuando la técnica de elección para seguir el avance de la reacción es la espectrofotometría se debe considerar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer para el *p*-NP<sup>-</sup> (*p*-nitrofenolato, especie generada por desprotonación del *p*-NP en presencia de NaBH<sub>4</sub>) en el rango de concentración empleado en este trabajo. Las concentraciones serán directamente proporcionales a la absorbancia medida según:

$$A = \epsilon b C \quad \text{Ecuación VII.2}$$

siendo  $\epsilon$  el coeficiente de absortividad molar del *p*-NP<sup>-</sup>, b el camino óptico de la celda de medida (1,00 cm) y C la concentración molar de la especie absorbente.

La conversión presentada en la ecuación VII.1 queda entonces expresada en términos de absorbancia según:

$$C(\%) = \frac{(A_0 - A_t)}{A_0} 100 \quad \text{Ecuación VII.3}$$

donde A<sub>0</sub> y A<sub>t</sub> son las absorbancias en el tiempo cero (t<sub>0</sub>) y t, respectivamente. Generalmente, los resultados se presentan como porcentajes de conversión de *p*-NP, C (%).

Cuando la reacción es llevada a cabo frente a un franco exceso del agente reductor, la cinética de reacción puede tratarse como de *pseudo*-primer orden respecto a la concentración de *p*-NP. En una reacción de *pseudo*-primer orden el gráfico de ln(A<sub>t</sub>/A<sub>0</sub>) vs t, presentará un comportamiento lineal cuya pendiente corresponde a la constante de velocidad aparente (K<sub>app</sub>). Puede obtenerse la constante de velocidad aparente (K<sub>app</sub>) empleando la siguiente ecuación:

$$K_{app} t = -\ln \frac{C_t}{C_0} = -\ln \frac{A_t}{A_0} \quad \text{Ecuación VII.4}$$

La constante de velocidad aparente depende de la temperatura, presión y concentración de las especies involucradas en la reacción. Este parámetro es un indicador de la velocidad inicial de consumo de los reactivos.

Por otro lado, otro parámetro de gran interés en catálisis es el TOF (*TurnOver Frequency*), el cual describe la frecuencia de ciclos catalíticos por unidad de tiempo. Matemáticamente se expresa según:

$$\text{TOF} = \frac{dN}{dt} \quad \text{Ecuación VII.5}$$

donde N es el número de ciclos de reacción en el sitio activo y t el tiempo. El TOF ha sido definido con el propósito de ofrecer una forma más conveniente de expresar la actividad catalítica, representando el número de moléculas reactantes convertidas por minuto por ciclo catalítico para una determinada condición de reacción [Boudart, 1995].

Si bien el TOF se presenta como un parámetro que ofrece mejores bondades comparativas que la velocidad de reacción, por centrarse en el sitio activo y no en la tasa de consumo de reactivos o generación de productos, se han presentado algunos inconvenientes frente a su uso [Kozuch & Martin, 2012]. Esto está relacionado con varios aspectos como la definición adoptada de sitio activo, la homogeneidad de estos sitios, la exposición superficial de los sitios activos, entre otros [Boudart, 1995]. Además, el TOF depende de la concentración de los reactivos y productos incluso en condiciones de saturación. Teniendo en cuenta estos aspectos se han introducido modificaciones al cálculo de TOF que permiten superar estas dificultades, el cual se expresa para la reacción bajo estudio como:

$$\text{TOF} = \frac{\text{mol}_{p\text{-NP}} K_{\text{app}} M_{\text{M}}}{m_{\text{M}} D} \quad \text{Ecuación VII.6}$$

donde  $\text{mol}_{p\text{-NP}}$  es el número de moles de *p*-nitrofenol colocados en la mezcla de reacción,  $M_{\text{M}}$  y  $m_{\text{M}}$  representan el peso molar y la masa del metal soportado en el catalizador empleado, D representa la dispersión metálica del catalizador y  $K_{\text{app}}$  es la constante de velocidad aparente de la reacción. El resultado de este cálculo (TOF) describe la eficiencia instantánea de un catalizador. En esta línea, se utilizará en conjunto tanto la constante de velocidad aparente como el TOF para analizar comparativamente la eficiencia de los catalizadores desarrollados en este trabajo, los cuales han sido testeados manteniendo invariables las condiciones de temperatura y concentración de las especies durante la reacción [Kozuch & Martin, 2012].

## VII.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.2.1 Reactivos

- Borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ , Panreac)
- *p*-nitrofenol (*p*-NP, Sigma-Aldrich)

## VII.2.2 Evaluación del desempeño catalítico de los bionanocatalizadores desarrollados

Empleando la reducción de *p*-NP en medio acuoso se evaluó la actividad catalítica de los bionanocatalizadores denominados P/SLP/M5 (con M= Ag y Pt). El seguimiento de la reacción se llevó a cabo *in-situ* mediante espectroscopía UV-Vis a través de la evolución de la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción del *p*-nitrofenolato. La longitud de onda de trabajo se determinó obteniendo un espectro de absorción en el rango de 210 a 510 nm de una solución de *p*-NP en presencia de NaBH<sub>4</sub> 0,02 M, debido a que la especie desprotonada (*p*-nitrofenolato) presenta un mayor coeficiente de absorción que la especie neutra y por la naturaleza alcalina de la mezcla reactiva otorgada por el reductor, será ésta la especie predominante y responsable de la absorbancia. Las medidas de absorbancia se obtuvieron empleando un espectrofotómetro UV-Vis de doble haz, CINTRA 20, GBC Scientific Equipment. Para llevar adelante el estudio se emplearon cubetas de cuarzo de 1,00 cm de camino óptico y 4,00 mL de capacidad volumétrica. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 25°C y presión atmosférica, con el objetivo de diseñar una reacción compatible con el medio ambiente y así, debido a la naturaleza contaminante del *p*-NP, propiciar la remoción acuosa de un contaminante en condiciones de reacción suaves. Para realizar los ensayos se colocó en la cubeta un volumen de dispersión del bionanocatalizador, a continuación la solución de *p*-nitrofenol y en tercer lugar, el agua. En los distintos ensayos se procedió a variar, únicamente, la cantidad de catalizador colocada, como se puede observar en la tabla VII.1. Por último, con la cubeta colocada en el equipo se adicionó el reductor, tomando este instante como t<sub>0</sub> o tiempo de inicio de reacción a partir del cual se contabilizó el tiempo total registrando espectros en el rango de 210 a 510 nm cada 1 minuto. Cada condición ensayada fue realizada por triplicado.

**Tabla VII.1** Cantidades empleadas en los ensayos de desempeño catalítico de los catalizadores.

ENSAYO	1	2	3
VOL CAT (mL) <sup>a</sup>	0,003	0,03	0,05
MASA CAT (g)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$2,6 \times 10^{-5}$
VOL NaBH <sub>4</sub> (mL) <sup>b</sup>	0,7	0,7	0,7
VOL <i>p</i> -NP (mL) <sup>c</sup>	0,5	0,5	0,5
VOL H <sub>2</sub> O (mL)	1,797	1,77	1,75
R= 100 (M/RVO) <sup>d</sup>	0,1	0,7	1,2

*a- De la suspensión producto de la redispersión a 10,00 mL de los pellets descrita en el apartado VI.2.2*

*b- [NaBH<sub>4</sub>] = 0,02 M*

*c- [p-NP] =  $5 \times 10^{-4}$  M*

*d- Relación porcentual molar entre el reactivo (p-nitrofenol) y el metal (moles metálicos colocados)*

La concentración inicial del *p*-NP fue seleccionada de manera que la lectura de absorbancia de la banda de interés se encuentre dentro del rango de cuantificación lineal. Gracias al elevado coeficiente de absortividad molar que presenta el *p*-nitrofenolato a la longitud de onda de trabajo ( $\epsilon_{p-NP}^{400\text{ nm}} = 18,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), se pudo utilizar una concentración final del mismo de  $8,3 \times 10^{-5} \text{ M}$  en la mezcla de reacción.

El agente reductor en todos los casos fue colocado en franco exceso, con un exceso molar de reductor/*p*-NP de 56. Excesos mayores presentaron burbujeo vigoroso dificultando las medidas espectroscópicas.

### VII.2.3 Ensayos de Reutilización

Con el objetivo de estudiar la capacidad de reutilización de los catalizadores obtenidos se diseñaron ensayos de reciclado de los mismos. Para este estudio se utilizaron las cantidades detalladas en la tabla VII.1 para el ensayo N°3. Finalizada la reacción llevada a cabo como se describió anteriormente, se procedió a retirar 0,12 ml del sector superior de la cubeta con el objetivo de adicionar a la misma 0,05 ml de *p*-nitrofenol ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) y 0,07 ml de NaBH<sub>4</sub> (0,2M) manteniendo el volumen final constante. Este procedimiento se repitió diez veces.

## VII.2.4 Caracterización de los catalizadores luego de la reacción

Para posibilitar la recuperación del catalizador post reacción se diseñó un ensayo empleando una mayor cantidad del mismo en la mezcla de reacción (0,3 ml; 0,0015 g) lo cual implicó una relación (R) de 50, con el fin de contar con una cantidad de material que permitiera su manipulación durante el aislamiento y posterior caracterización. Los bionanocatalizadores fueron sometidos al mismo número de ciclos que en los ensayos de reuso (10 ciclos). Finalizados los ciclos de reusos se separó el catalizador usado, posteriormente se lo lavó por centrifugación-redispersión. Por último se resuspendieron en agua *Milli-Q* para su posterior caracterización.

Con el objetivo de analizar posibles daños o modificaciones en las estructuras nanométricas de los catalizadores luego de su empleo en la reacción de reducción acuosa de *p*-nitrofenol, se estudiaron y compararon los catalizadores frescos y reutilizados mediante microscopía TEM como se describió previamente para el análisis de dispersiones.

Además, con la finalidad de analizar si el empleo de los catalizadores impulsó modificaciones en la estructura de los componentes del soporte, o si presentan indicios de adsorción de reactivos o productos de reacción (envenenamiento del catalizador), se obtuvieron los espectros FTIR empleando las condiciones descritas en los capítulos previos.

## VII.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El *p*-nitrofenol posee un máximo de absorción en 317 nm que se ve desplazado hacia 400 nm debido a la desprotonación causada por la presencia del  $\text{NaBH}_4$  ( $\text{pK}_{\text{a}_{\text{p-NP}}}=7,16$ ) el cual incrementa el pH de la solución a un valor de aproximadamente 11. Luego de añadir el reductor a la mezcla la coloración cambia de un amarillo pálido a un amarillo intenso característico del *p*-nitrofenolato como se puede observar en la figura VII.1.

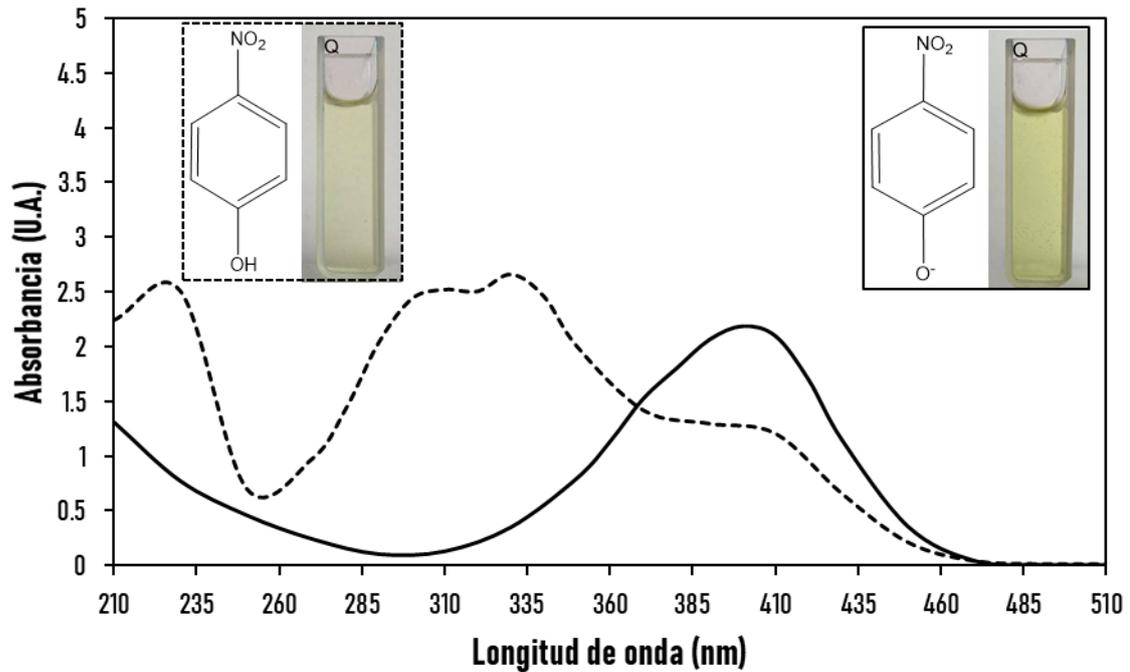


Figura VII.1 Espectro de absorción del *p*-nitrofenol (trazo discontinuo) y del *p*-nitrofenolato (trazo continuo).

Al monitorear la reacción mediante espectroscopía UV-vis, se observa como decrece la intensidad de la banda de absorción a 400 nm conforme avanza la reacción debido al consumo del *p*-NP-, mientras que a 300 nm aumenta la banda de absorción asociada al producto de la reacción (*p*-AP). El avance de la reacción puede percibirse también visualmente ya que al adicionar el catalizador a la mezcla reactiva, la coloración pierde intensidad en el tiempo hasta obtenerse una solución incolora. Ambos fenómenos pueden observarse en la imagen VII.2 y en las imágenes insertadas.

Como se puede observar en la figura VII.2, los espectros asociados al avance de la reacción presentan un punto isobéptico localizado aproximadamente a 320 nm. Esto indicaría que la reacción procede sin intermediarios estables, encontrándose en la mezcla de reacción únicamente el *p*-NP y el *p*-AP.

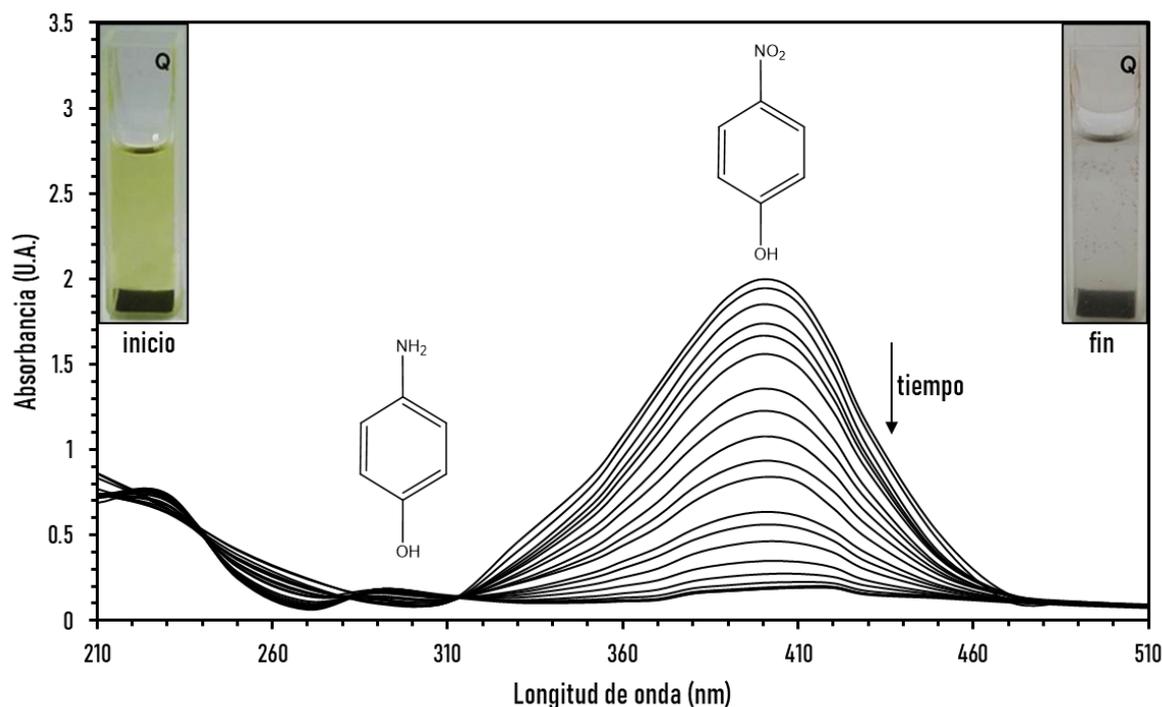


Figura VII.2 Evolución del espectro de absorción UV-vis en el tiempo conforme avanza la reacción de reducción del *p*-nitrofenol. En las imágenes insertadas se muestra la coloración de la mezcla reactiva al inicio y al final de la reacción.

### VII.3.1 Desempeño catalítico de los bionanocatalizadores

En las figuras VII.3 y VII.4 se presentan las curvas de conversión en función del tiempo para los bionanocatalizadores denominados P/SLP/Pt5 y P/SLP/Ag5, respectivamente. Para cada catalizador se presentan las curvas de conversión obtenidas al colocar distintas cantidades del mismo, expresando dicha cantidad como la relación molar porcentual entre el reactivo y el metal colocado ( $R\% = M/RVO$ ).

En las figuras insertadas dentro de las figuras VII.3 y VII.4 se presentan los gráficos para la linealización logarítmica,  $\ln(A/A_0)$  vs  $t$ , para cada catalizador en cada una de las cantidades colocadas. Cabe destacar que tanto en las curvas de conversión como en los gráficos de  $\ln(A/A_0)$  vs  $t$ , se presentan los valores asociados a la media calculada entre las repeticiones, sin la barra de error para mayor claridad visual. En todos los casos el gráfico  $\ln(A/A_0)$  vs  $t$  presentó una tendencia lineal para los primeros 10 minutos de reacción, confirmando la hipótesis inicial en la cual se consideró a la velocidad de reacción como de pseudo-primer orden respecto al *p*-nitrofenol, debido al exceso de reductor colocado. Mediante un ajuste de la tendencia lineal observada se calculó la constante de velocidad aparente de cada ensayo ( $K_{app}$ ) desde la pendiente de la recta. Empleando el valor de  $K_{app}$  calculado, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en esta tesis para la

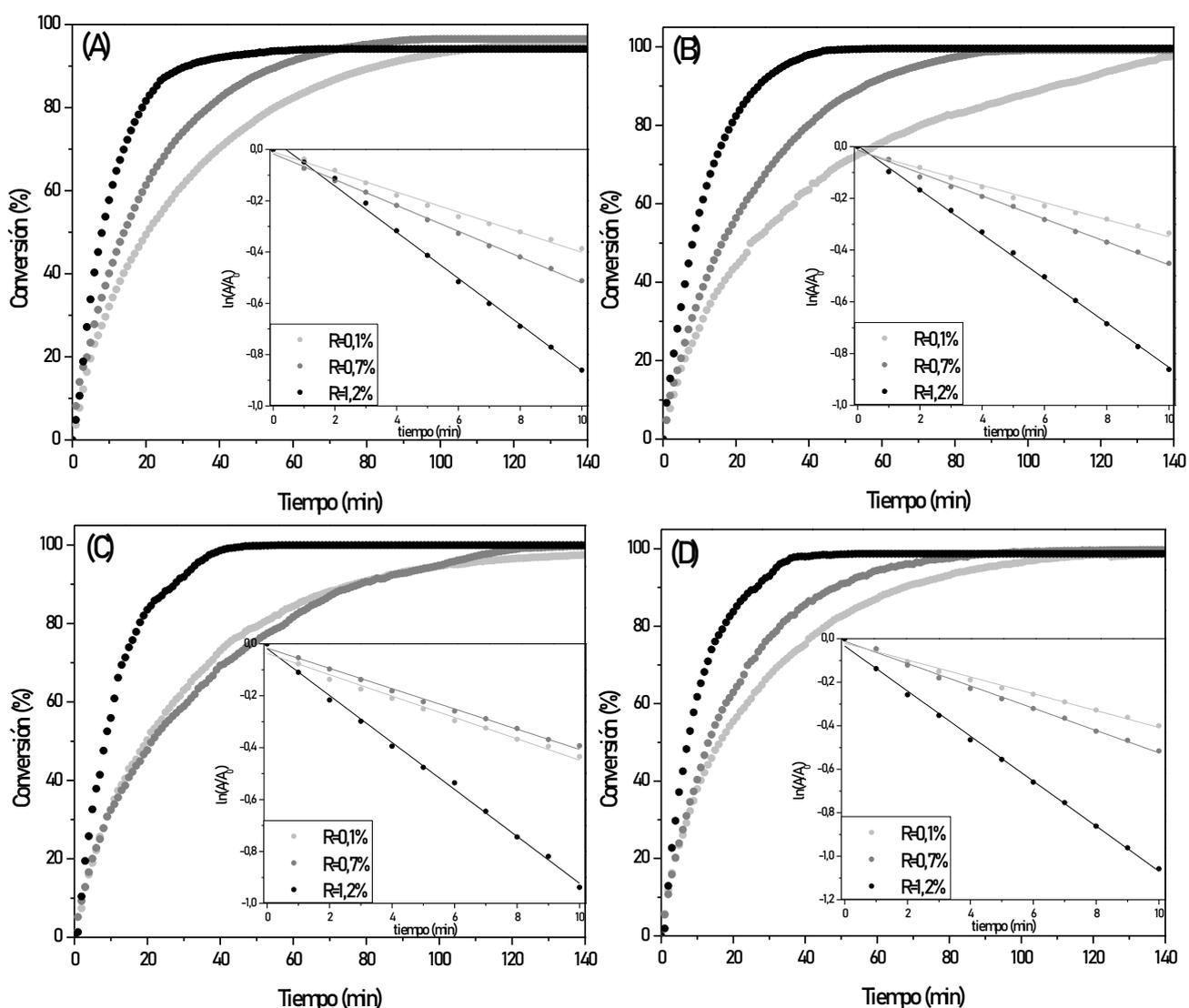
dispersión metálica (D), el contenido metálico de los catalizadores, y otros parámetros como la concentración de *p*-NP y el peso molecular del metal, se calculó TOF en cada caso.

En la tabla VII.2 se presentan los parámetros obtenidos producto del análisis de la performance catalítica (%C,  $K_{app}$  y TOF) de todos los bionanocatalizadores para todas las concentraciones de catalizador. Como se puede observar en las figuras VII.3 y VII.4, todos los bionanocatalizadores ensayados resultaron activos y presentaron un buen desempeño frente a la reducción acuosa de *p*-nitrofenol, para todas las condiciones ensayadas. En líneas generales, para los bionanocatalizadores de platino la constante aparente,  $K_{app}$ , tomó valores de entre 0,033 y 0,014  $\text{min}^{-1}$ , mientras que para los bionanocatalizadores de plata el valor se encontró entre 0,013 y 0,14  $\text{min}^{-1}$ . La velocidad de reacción aumentó conforme se incrementó la cantidad de catalizador utilizada en las reacciones, mientras que la máxima conversión alcanzó valores entre el 90% y 100% en todos los casos. En adición, el tiempo requerido para alcanzar la máxima conversión lograda varió según la cantidad de catalizador colocada, siendo de aproximadamente 40, 80 y 120 minutos al colocar 0,1; 0,7 y 1,2 % M/RVO, para los catalizadores de platino. En el caso de los bionanocatalizadores de plata dicho tiempo requerido varió entre 20, 30 y 40 para las cantidades mencionadas, respectivamente. El valor del TOF representa, como se mencionó anteriormente, el número de moléculas reactantes convertidas por minuto por ciclo catalítico para una determinada condición de reacción. Para los catalizadores de platino este valor se encontró entre 208 y 839  $\text{min}^{-1}$  aumentando conforme se incrementa la constante de velocidad aparente. En el caso de los bionanocatalizadores de plata el valor del TOF fue de 95 a 1391  $\text{min}^{-1}$  manteniendo la tendencia vinculada a  $K_{app}$  mencionada para los catalizadores de platino.

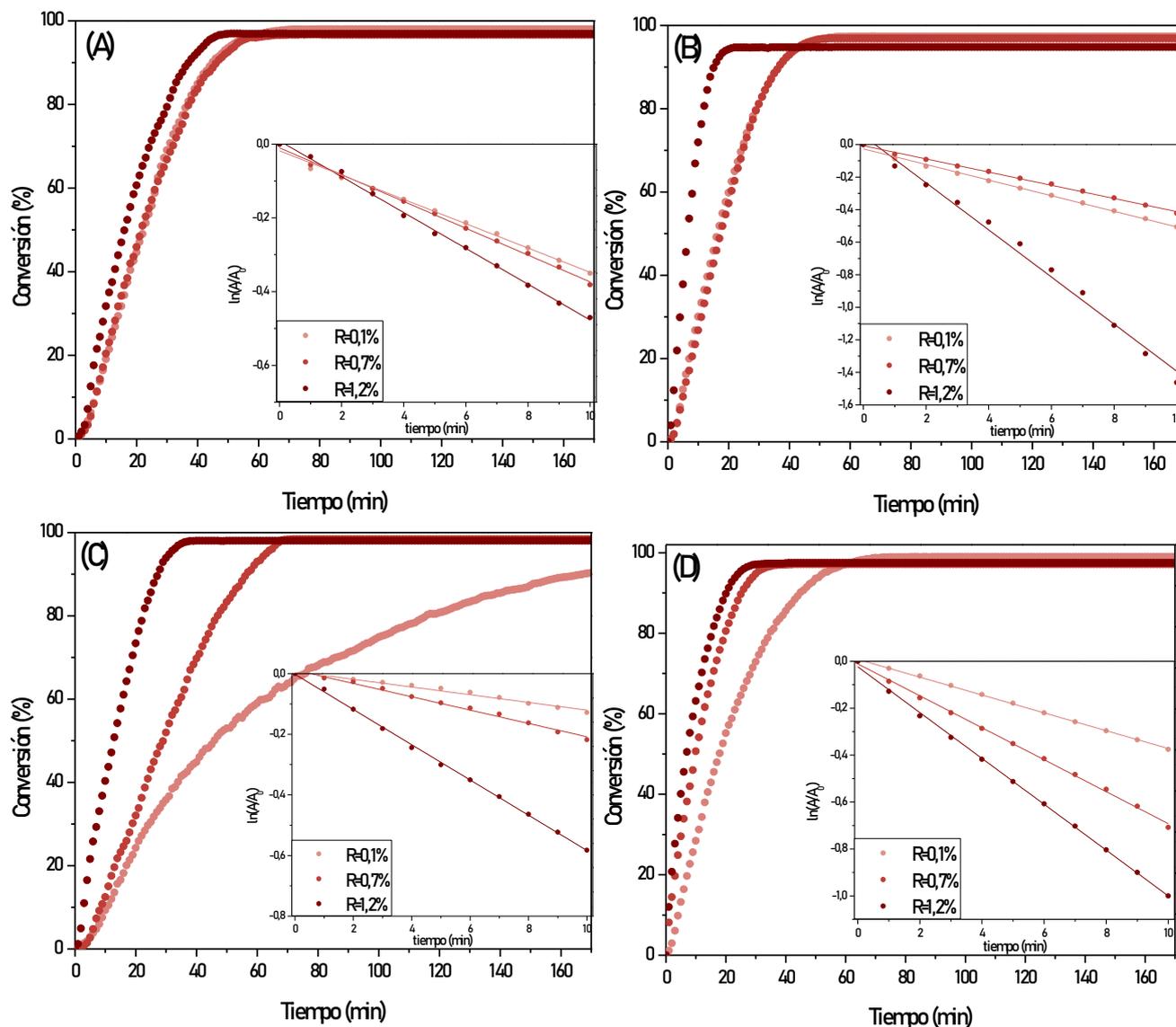
**Tabla VII.2** Actividad catalítica de los bionanocatalizadores en función de la cantidad de catalizador colocada R%=M/RVO

CATALIZADOR	R=100 (M/RVO) → PARÁMETROS ↓	0,1	0,7	1,2
MBA/S1/Pt	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,039±0,003	0,050±0,002	0,090±0,006
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	335±21	433±11	774±43
	Conversión final (%)	95,3±2,9	96,5±0,6	94,1±0,4
MBA/S8/Pt	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,033±0,007	0,044±0,001	0,086±0,009
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	208±36	277±6	536±46
	Conversión final (%)	98±2	99,1±0,5	99,5±0,4
PU/S1/Pt	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,041±0,003	0,039±0,004	0,090±0,002
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	293±15	279±23	646±9
	Conversión final (%)	98±1	99,8±0,2	99,93±0,05
PU/S8/Pt	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,039±0,006	0,051±0,004	0,104±0,001
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	316±40	413±26	839±8
	Conversión final (%)	99,86±0,06	99,95±0,05	98,7±0,9
MBA/S1/Ag	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,033±0,006	0,039±0,003	0,049±0,005
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	228±35	270±20	337±28
	Conversión final (%)	98±0,3	97±2	96,9±0,3
MBA/S8/Ag	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,048±0,005	0,041±0,006	0,14±0,03
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	461±40	389±47	1391±200
	Conversión final (%)	97±1	97±3	95±2
PU/S1/Ag	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,013±0,006	0,022±0,002	0,06±0,01
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	95±36	164±10	434±85
	Conversión final (%)	90,4±0,8	98±1	98,0±0,4
PU/S8/Ag	$K_{app}(\text{min}^{-1})$	0,035±0,006	0,068±0,007	0,098±0,005
	TOF ( $\text{min}^{-1}$ )	256±37	493±44	707±27
	Conversión final (%)	99,0±0,6	97,1±0,8	98±1

En el caso de los catalizadores de platino, considerando el comportamiento catalítico de los sistemas MBA/S/Pt5 (Figura VII gráficos A y B), se observa un incremento gradual de la  $K_{app}$  (con la consiguiente disminución del tiempo en el cual se alcanza la máxima conversión) en acuerdo con el aumento de la concentración del catalizador. Sin embargo, los catalizadores análogos PU/S/Pt5 (Figura VII gráficos C y D) presentan un comportamiento similar para las concentraciones de catalizador más bajas en término de estas variables. Contrariamente, en los catalizadores de plata con soportes de naturaleza acrílica, se observa una menor diferencia en la performance al variar la concentración de catalizador, a diferencia de lo que ocurre en sus contrapartes soportadas sobre poliuretano, para las que se observó un incremento de  $K_{app}$  y una disminución del tiempo al cual se alcanza la máxima conversión al aumentar la concentración del catalizador. No obstante, para los catalizadores de ambos metales, al emplear un 1,2 % M/RVO se lograron mayores velocidades iniciales de reacción en la conversión del *p*-nitrofenol.

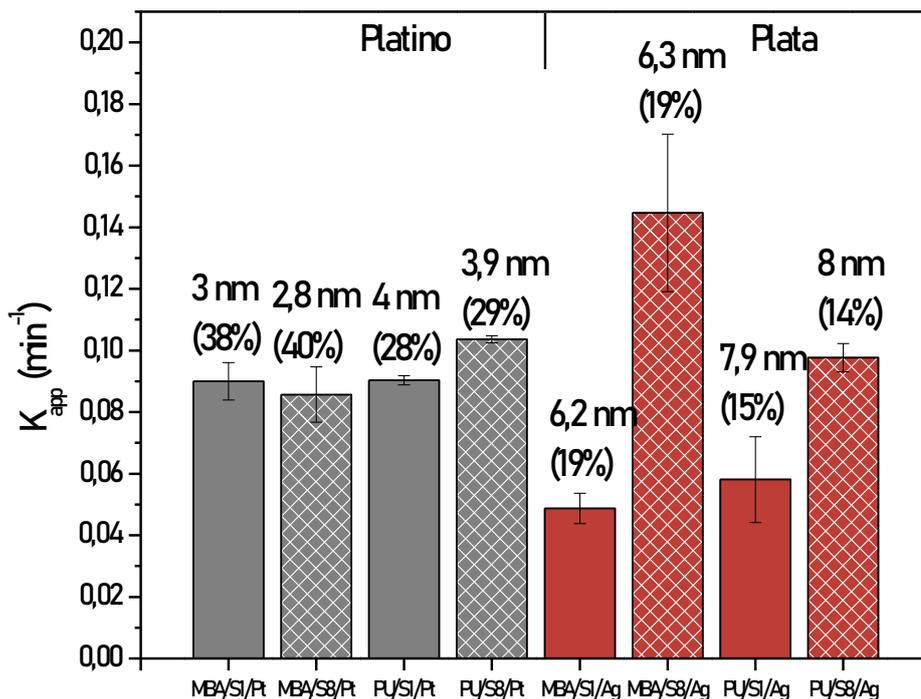


**Figura VII.3** Curvas de conversión y de  $\ln(A/A_0)$  vs  $t$  para los catalizadores de platino, MBA/S1/Pt (A), MBA/S8/Pt (B), PU/S1/Pt (C), PU/S8/Pt (D). Se presenta el valor de la media observada de los triplicados omitiendo la barra de error para mayor claridad visual.



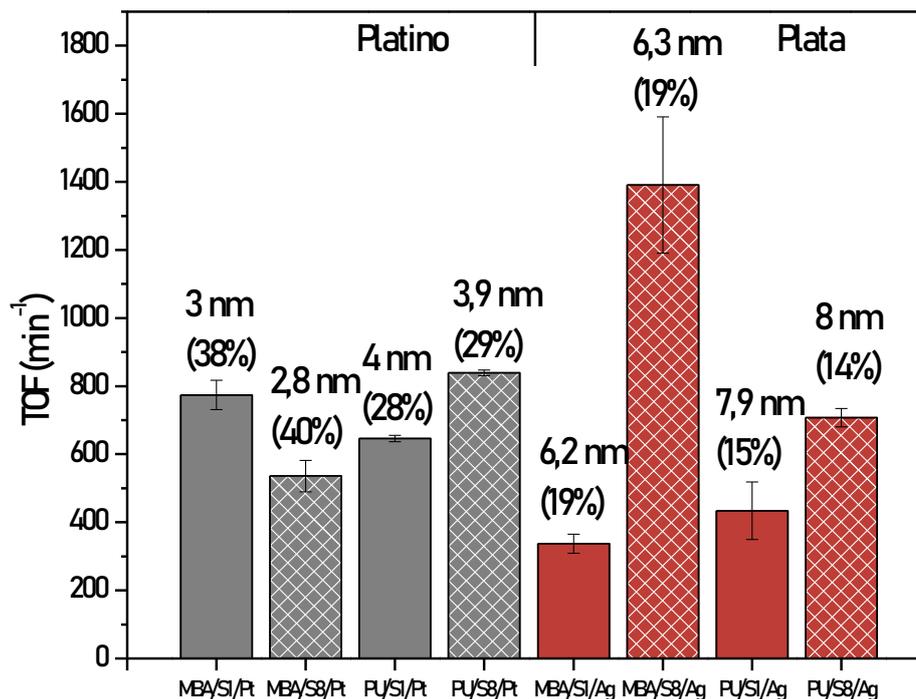
**Figura VII.4** Curvas de conversión y  $\ln(A/A_0)$  vs  $t$  para los catalizadores de plata, MBA/S1/Ag (A), MBA/S8/Ag (B), PU/S1/Ag (C), PU/S8/Ag (D). Se presenta el valor de la media observada de los triplicados omitiendo la barra de error para mayor claridad visual.

En la figura VII.5 se presenta un gráfico comparativo de la dispersión metálica, el tamaño de las partículas y las constante de velocidad aparente calculadas para la reacción llevada a cabo con la relación porcentual metal/reactivo de 1,2 para los distintos catalizadores ensayados. Como se puede observar, para los bionanocatalizadores de platino, se presenta poca diferencia en la constante de velocidad aparente conforme varía el soporte. Sin embargo, en el caso de los catalizadores de plata, para tamaños de partícula prácticamente idénticos e iguales dispersiones metálicas, la velocidad aparente es mucho mayor en el caso de los soportes obtenidos empleando S8. Esto sugiere que la velocidad de reacción no depende únicamente de las características morfológicas de las partículas metálicas, sino también de las particularidades del soporte, particularmente de la SLP.



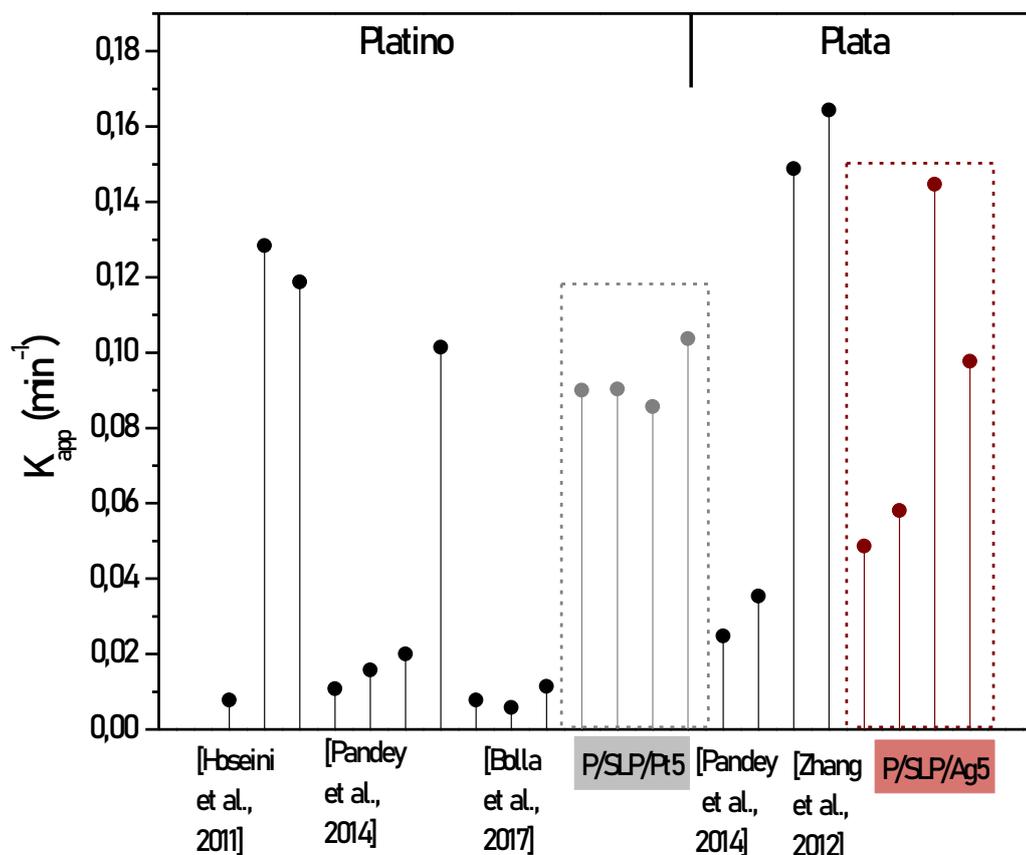
**Figura VII.5** Comparación de la velocidad aparente de reacción, colocando 1,2% M/RVO, de los distintos catalizadores desarrollados. Junto a las barras y su error, se presenta el tamaño promedio de nanopartícula y la dispersión metálica del catalizador.

En la figura VII.6 se presenta el gráfico comparativo del TOF para todos los sistemas catalíticos ensayados colocando un 1,2% de metal respecto al reactivo, junto a los tamaños de partícula y la dispersión metálica. En el caso de los bionanocatalizadores de platino no se observó una tendencia clara de los valores de TOF en relación a los soportes empleados. No obstante, nuevamente en los nanobiocatalizadores de plata se observó una excelente performance catalítica en términos de TOF, y en acuerdo con lo discutido anteriormente sobre la  $K_{app}$ , se observan diferencias importantes según la SLP utilizada en el soporte (P/S8). Esto reafirma que la naturaleza de este tipo de soportes no solo juega un papel fundamental dirigiendo la síntesis de las nanopartículas metálicas, sino también impartiendo características únicas en su desempeño catalítico.



**Figura VII.6** Comparación del TOF al colocar 1,2% M/RVO, de los distintos catalizadores desarrollados. Junto a las barras y su error, se presenta el tamaño promedio de nanopartícula y la dispersión metálica del catalizador.

El desempeño catalítico observado, específicamente en término de la velocidad de reacción resulta comparable con los valores más altos reportados previamente para sistemas metálicos soportados. En la figura VII.7 se presentan los valores de  $K_{app}$  obtenidos en distintos trabajos empleando nanopartículas metálicas soportadas y llevando a cabo la reacción de reducción de *p*-nitrofenol en condiciones similares a las empleadas en este trabajo. Como se puede observar, la velocidad de reacción lograda con los catalizadores obtenidos (presentada en color gris para el platino y bordó para la plata) resultó similar e incluso mayor a la reportada para diversos sistemas, tanto en el caso del platino como en el de la plata. Si bien, como se mencionó en el apartado VII.1.1, los análisis comparativos entre distintos catalizadores resultan más acertados al emplear el TOF como parámetro descriptivo de la capacidad catalítica, en la mayor parte de los trabajos empleados como referencia no se encontró reportado el valor de dicho parámetro por lo que se utilizó la constante de velocidad aparente para realizar el análisis comparativo.



**Figura VII.7** Comparación de la velocidad de reacción aparente para la reacción de reducción de *p*-nitrofenol acuosa, catalizada con metales reportados previamente. Los datos señalados en color gris y rojo corresponden a los valores obtenidos en este trabajo para los catalizadores de platino y plata respectivamente.

### VII.3.2 Ensayos de reutilización

La posibilidad de utilizar los catalizadores desarrollados en sucesivos ciclos de reacción con un desempeño aceptable en cada uno de ellos es de gran importancia dadas las ventajas económicas y ambientales. Las condiciones de reacción empleadas para los ensayos de reutilización fueron las descritas en la sección VII.2.2 y la relación metal/reactivo seleccionada para ensayar la reutilización fue de 1,2%.

En la figura VII.8 se presentan las curvas de conversión obtenidas en los ciclos de reutilización número 1, 3, 5, 7 y 10 para los bionocatalizadores de platino. Si bien se realizó un total de 10 ciclos, se presentan únicamente las curvas mencionadas para una mejor visualización de la conducta.

En el caso del bionocatalizador denominado PU/S1/Pt5, se observa una caída pequeña en la actividad catalítica conforme aumentan los ciclos de reuso, comenzando con

una conversión final del 98% y finalizando luego de 10 usos con una conversión del 95%. Respecto a la constante de velocidad aparente se observa una disminución mayor a la observada para la conversión, como puede apreciarse en la figura VII.9. , en el primer uso la  $K_{app}$  fue de  $0,1 \text{ min}^{-1}$  mientras que en el uso N°10 la misma resultó ser  $0,07 \text{ min}^{-1}$  (representando una caída del 31% aproximadamente). Por otro lado, el catalizador PU/S8/Pt presentó mayores caídas en la actividad catalítica respecto al catalizador mencionado previamente, como puede observarse en la figura VII.7. En este caso la conversión inicia siendo del 99% y en el 10<sup>mo</sup> uso la misma disminuyó a un 78%. Respecto al comportamiento de la velocidad aparente de reacción, en el primer uso la constante de velocidad fue de  $0,1 \text{ min}^{-1}$  disminuyendo a  $0,07 \text{ min}^{-1}$  luego de 10 usos (representando una caída del 33%). Ambos catalizadores presentaron una similar disminución de la velocidad aparente de reacción con el aumento del número de ciclos de reuso, mientras que el catalizador de platino soportado sobre PU/S8 presentó una mayor pérdida de la actividad catalítica al concluir el 10<sup>mo</sup> uso. Para ambos catalizadores la disminución de la velocidad de reacción comienza a darse en el uso número 8, al igual que la caída de actividad catalítica para PU/S8/Pt, por lo que (despreciando efectos asociados a la pérdida de masa) podría estimarse que en este uso comenzaría a darse una desactivación del catalizador (parcial) probablemente asociada a la adsorción de *p*-nitrofenol y/o *p*-aminofenol.

Un análisis similar sobre el desempeño de reutilización puede hacerse sobre los bionanocatalizadores con soportes de naturaleza acrílica. En los cuales se observa una mayor caída en la conversión entre el primer y el último uso en el caso del soporte conteniendo la proteína S8, iniciando con una conversión del 97% y finalizando con una de aproximadamente 76%. Para el catalizador cuyo soporte contiene S1 la conversión inicia siendo del 95% y finaliza el 10<sup>mo</sup> ciclo con una conversión del 87%. Respecto a la variación de la  $K_{app}$ . Para ambos soportes la  $K_{app}$  decrece desde  $0,09$  a  $0,06 \text{ min}^{-1}$  entre el primer y el décimo uso (una caída de aproximadamente 33%). Al igual que para los soportes de naturaleza poliuretánica, la marcada disminución en la constante de velocidad aparente comienza a observarse a partir del 8<sup>vo</sup> uso.

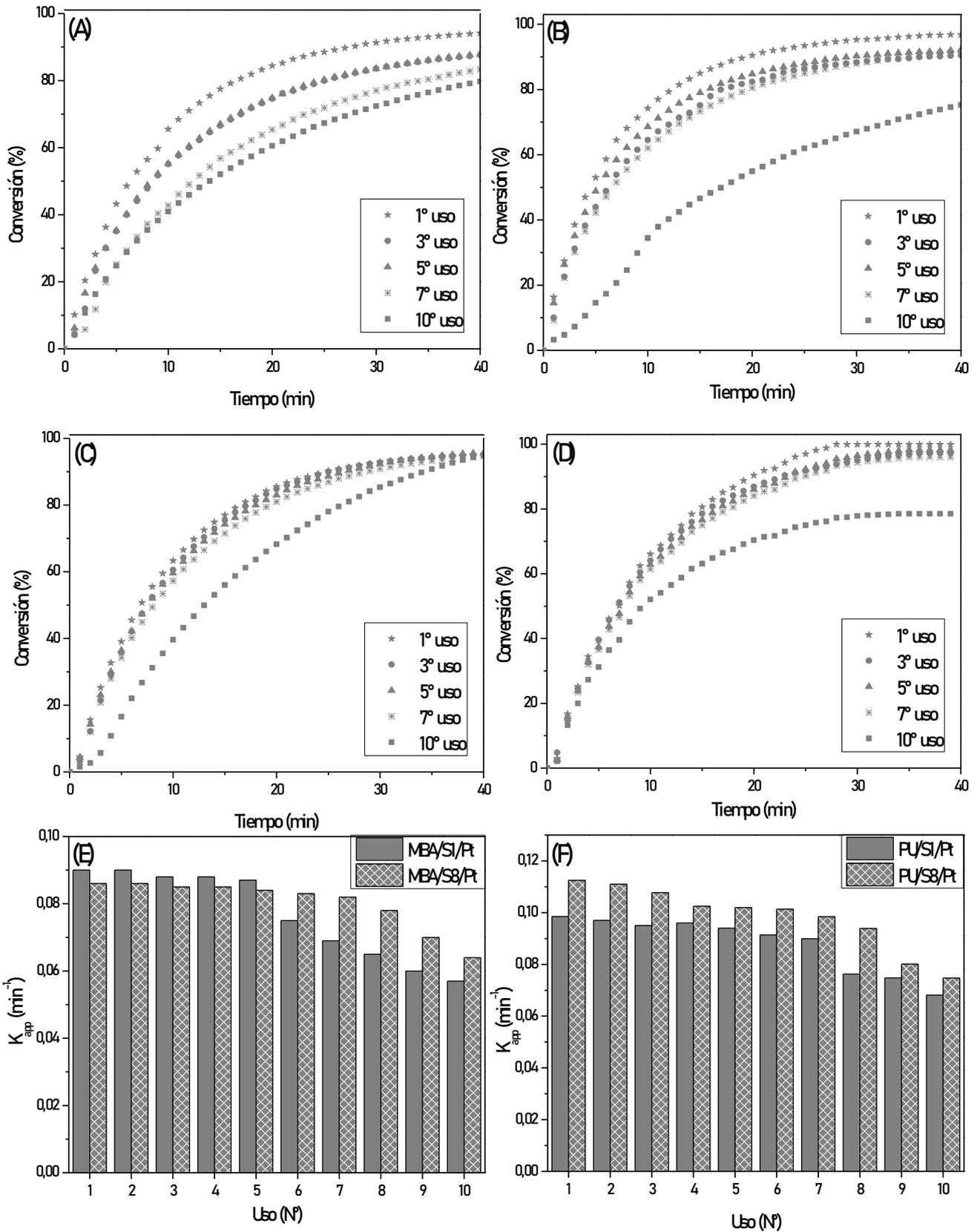


Figura VII.8 Reutilización de los catalizadores de platino, MBA/S1/Pt (A), MBA/S8/Pt (B), PU/S1/Pt (C), y PU/S8/Pt (D). Constante de velocidad aparente frente a la reutilización de los catalizadores de platino, MBA/SLP/Pt (E) y PU/SLP/Pt (F).

De igual forma, se analizó la capacidad de reutilización de los catalizadores de plata obteniéndose las curvas presentada en la figura VII.9. Nuevamente, se presentan curvas seleccionadas (ciclos número 1,3 5, 7 y 10) para permitir una correcta visualización de la conducta.

En el caso de los catalizadores de plata la disminución en la velocidad aparente se da desde el primer ciclo de reuso (es decir, en el uso N°2) y la magnitud del decaimiento resultó mayor respecto a sus análogos de platino. El catalizador PU/S1/Ag comienza el primer uso con un 98% de conversión y finaliza el 10<sup>mo</sup> uso con un 79% de conversión, por su parte, la constante de velocidad aparente pasa de tener un valor de 0,06 a 0,03 min<sup>-1</sup> entre el primer y el décimo uso, respectivamente (representando una caída del 47%). En el catalizador PU/S8/Ag se observa una menor pérdida de la actividad catalítica pasando de convertir un 98% a un 90% luego de 10 usos, mientras que la constante de velocidad aparente disminuye desde un valor inicial de 0,1 a 0,03 (representando una caída del 72,5%), destacando en este caso que este sistema mantuvo su actividad hasta el 8vo uso. Por otro lado, los bionanocatalizadores con soportes de naturaleza acrílica presentaron una conducta de reutilización diferente según la proteína presente en el soporte. En el caso del soporte MBA/S1 se observa una menor caída en la  $K_{app}$  al transcurrir los 10 usos, iniciando en un valor de 0,05 y finalizando en 0,03 min<sup>-1</sup> (una disminución del 40%). Al analizar el catalizador soportado sobre MBA/S8 se observa una disminución más marcada, comenzando con una  $K_{app}$  de 0,1 para el primer ciclo y finalizando el 10<sup>mo</sup> ciclo con una de 0,02 min<sup>-1</sup> (una caída del 80%). Respecto a la conversión se observa la misma tendencia, donde en el catalizador con soporte MBA/S1 muestra una caída de la conversión desde un valor inicial del 90% hasta un 74%, mientras que en el caso del soporte MBA/S8 la disminución se da desde un valor de 94% hasta un 63%.

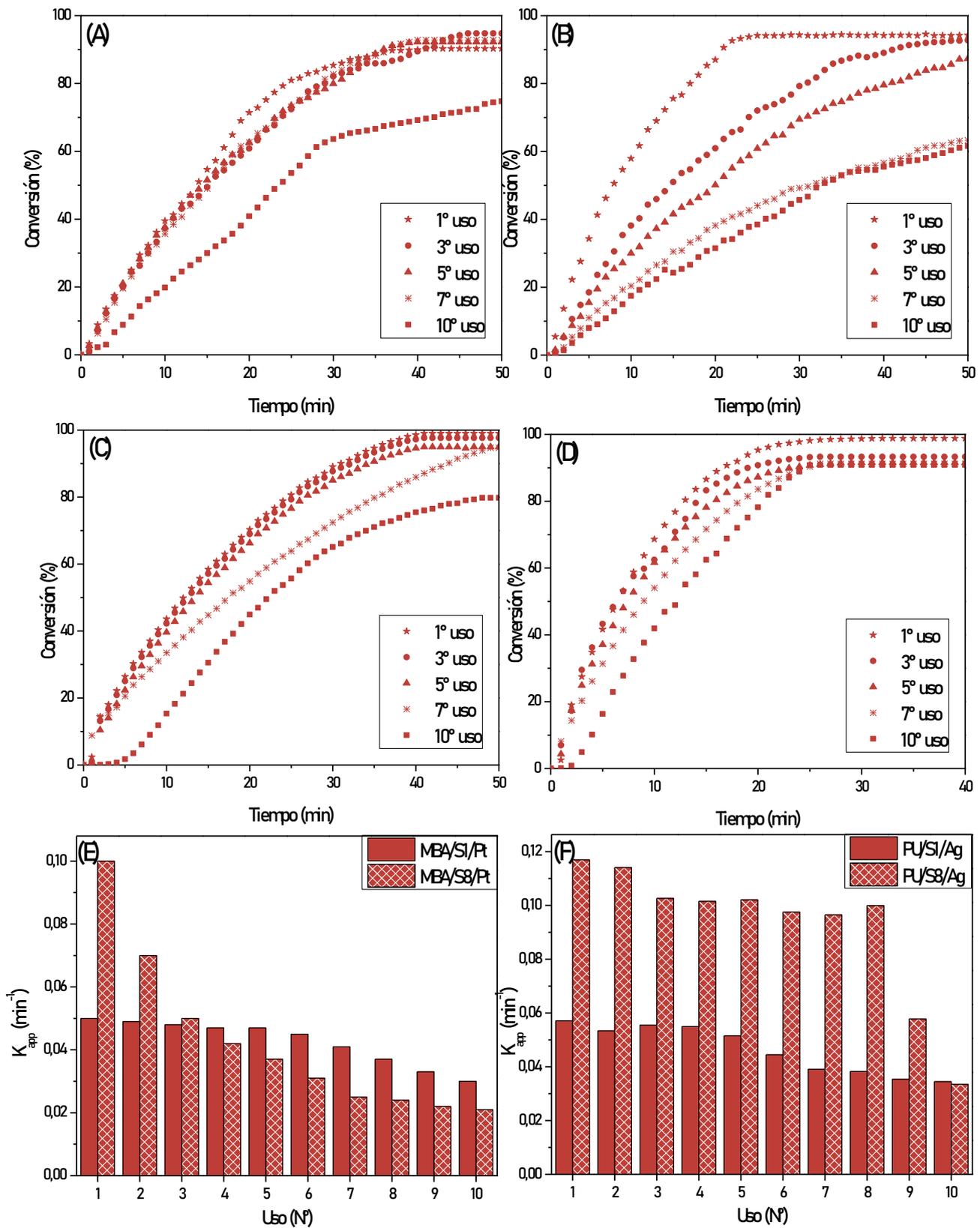


Figura VII.9 Reutilización de los catalizadores de plata, MBA/S1/Ag (A), MBA/S8/Ag (B), PU/S1/Ag (C), y PU/S8/Ag (D). Constante de velocidad aparente frente a la reutilización de los catalizadores de plata, MBA/SLP/Ag (E) y PU/SLP/Ag (F).

En líneas generales, todos los bionanocatalizadores desarrollados continuaron presentando un buen desempeño catalítico luego de 10 ciclos de uso en las condiciones utilizadas en el estudio. Globalmente, se observó una mejor performance de reuso para los catalizadores de platino (en términos de la conversión y  $K_{app}$  luego de los usos) respecto a los de plata. En el caso de los catalizadores de platino, la caída en la constante de velocidad aparente comenzó a manifestarse a partir del 8<sup>vo</sup> ciclo de uso, mientras que en el caso de los catalizadores de plata esta disminución comenzó a apreciarse en ciclos anteriores. Esto podría deberse a que, la plata por ser un metal más fácilmente oxidable que el platino, pierda sitios activos conforme se realizan los ciclos de reuso debido a oxidación y/o lixiviación.

Producto del análisis de la *performance* catalítica de los bionanocatalizadores desarrollados se puede proponer la existencia de una influencia del soporte en la conducta catalítica frente a la reacción de reducción acuosa de *p*-nitrofenol. Este efecto se manifestó claramente en los catalizadores de plata, mientras que en los de platino no se observó en tal magnitud. En forma general, todos los catalizadores desarrollados presentaron una muy buena *performance* catalítica frente a la reacción de reducción estudiada, analizando el desempeño tanto en términos de la constante de velocidad aparente, como del TOF.

### VII.3.3 Caracterización de los catalizadores reutilizados

Con la finalidad de realizar una caracterización estructural de los catalizadores luego de su empleo en la reacción, se realizó un ensayo con una mayor cantidad de catalizador (R%=50) tal que se posibilitara su recuperación. Las curvas de conversión y los resultados del análisis sobre las  $K_{app}$  para los catalizadores de platino y plata en estas condiciones se presentan en el Anexo IV.

#### VII.3.3.1 Microscopía electrónica de Transmisión (TEM)

En las imágenes VII.1 y VII.2 se presentan las imágenes TEM de los bionanocatalizadores reutilizados y sus correspondientes histogramas (tamaño de MNPs), para los catalizadores de plata y platino, respectivamente.

En las imágenes puede verse que, en todos los catalizadores (tanto de platino como de plata), se observó la misma morfología descrita para los catalizadores frescos. De esta manera, podría inferirse en que la morfología de los sistemas (nanoestructura *strawberry*) y de las nanopartículas no ha sufrido mayores alteraciones luego de la reutilización de los catalizadores. No obstante, se pudo apreciar en algunos casos la presencia de agregados de nanopartículas (imagen insertada en la Imagen VII.1A).

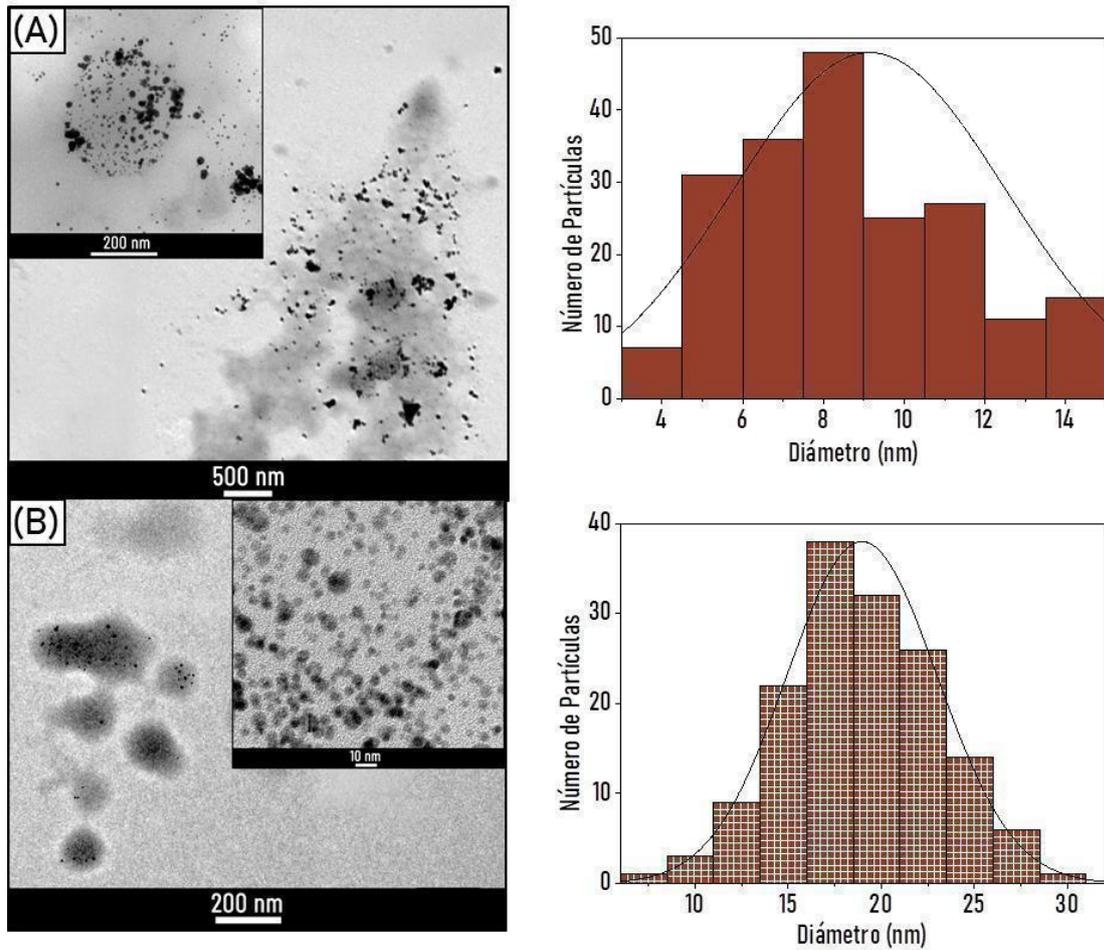
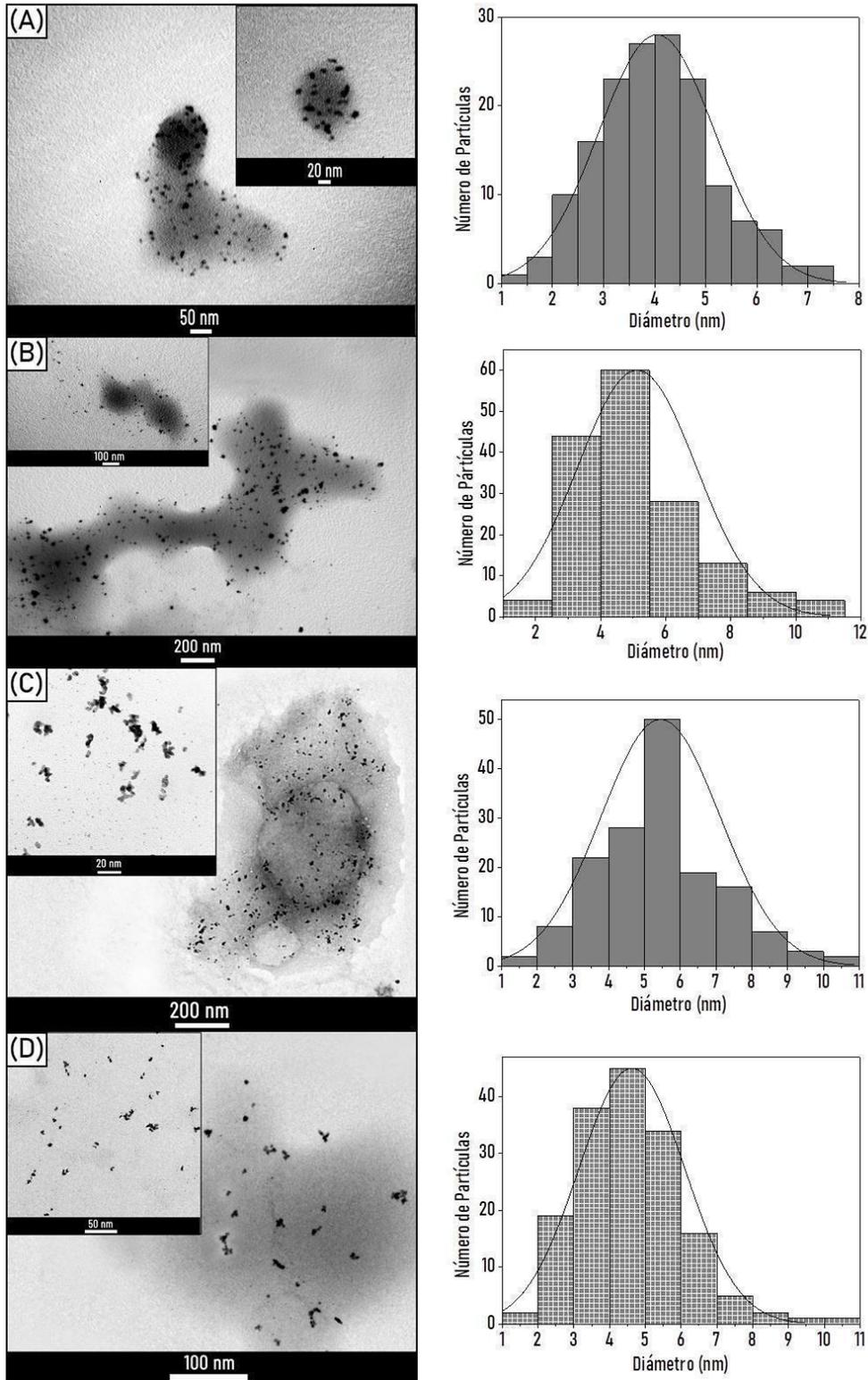


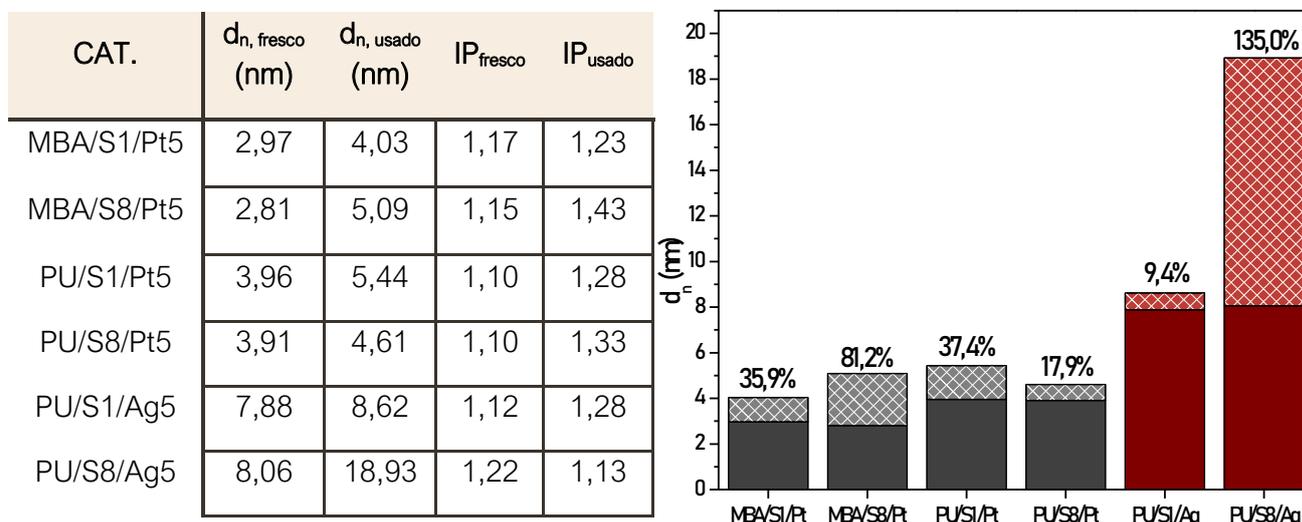
Imagen VII.1 Imágenes TEM (izquierda) e histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de Plata luego de ser utilizados como catalizadores en la reacción de estudio: (A) PU/S1/Pt5, (B) PU/S8/Ag5



**Imagen VII.2** Imágenes TEM (izquierda) e histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de platino luego de ser utilizados como catalizadores en la reacción de estudio: **(A)** MBA/S1/Pt5, **(B)** MBA/S8/Pt5, **(C)** PU/S1/Pt5, **(D)** PU/S8/Pt5

A partir de las imágenes se determinó el tamaño de las nanopartículas metálicas que se presentan en la VII.3, junto al mismo parámetros pertenecientes a los catalizadores frescos.

**Tabla VII.3** Tamaño, dispersión y cambio en el tamaño de las nanopartículas metálicas presentes en los nanocatalizadores utilizados.

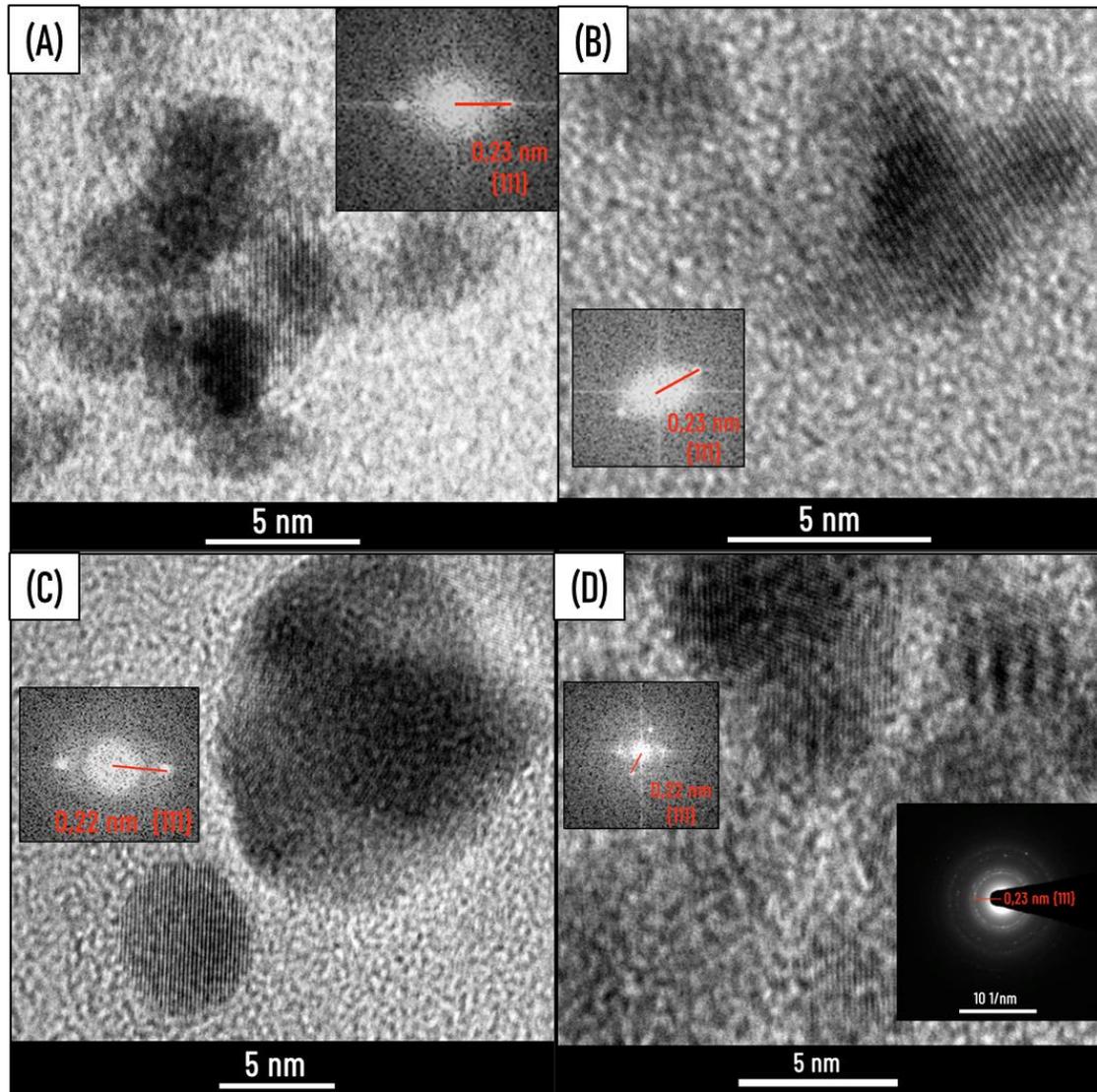


**Figura VII.10** Cambio relativo de tamaño de las nanopartículas luego del empleo de los sistemas como catalizadores en la reacción de reducción de *p*-nitrofenol. Tamaño inicial (relleno continuo), tamaño final (relleno con textura) y cambio relativo porcentual.

En todos los casos las nanopartículas metálicas experimentaron un aumento de tamaño respecto a los sistemas sin ser utilizados en la reacción. Como se puede observar en la figura VII.10, el cambio de tamaño relativo en los distintos sistemas no sigue una tendencia. Es notoria la diferencia en el cambio de tamaño sufrido por las nanopartículas de plata soportadas sobre el sistema PU/S8, las cuales ya poseían inicialmente un tamaño muy superior al resto de los sistemas y luego de la reacción presentaron el mayor aumento. No obstante, el tamaño de las partículas luego de los ciclos de reuso sigue siendo adecuado para su empleo en catálisis.

Los bionanocatalizadores con soportes de naturaleza poliuretánica fueron además analizados en el modo HR-TEM para profundizar el estudio estructural. En la imagen VII.3 se presentan las imágenes HR-TEM de los bionanocatalizadores PU/SLP/M, y en las imágenes insertadas se muestra la transformada rápida de Fourier para las partículas observadas (para el catalizador denominado PU/S8/Ag5 se presenta también el patrón de difracción). Como se puede observar en la imagen VII.3 se lograron identificar partículas con planos cristalinos, confirmando que luego de su empleo como catalizadores en la reacción de estudio, la naturaleza cristalina de las nanopartículas observadas se mantiene, con distancias interplanares correspondiente al plano {111} para ambos metales. Para el sistema PU/S8/Ag5 logró obtenerse el patrón de difracción de área seleccionada (SAED) confirmando nuevamente la naturaleza policristalina de nanopartículas metálicas, como se puede ver en la imagen VII.3. Los resultados se corresponden con lo observado para los

catalizadores frescos, confirmando que los bionanocatalizadores preparados no presentan cambios drásticos con posterioridad a su empleo.

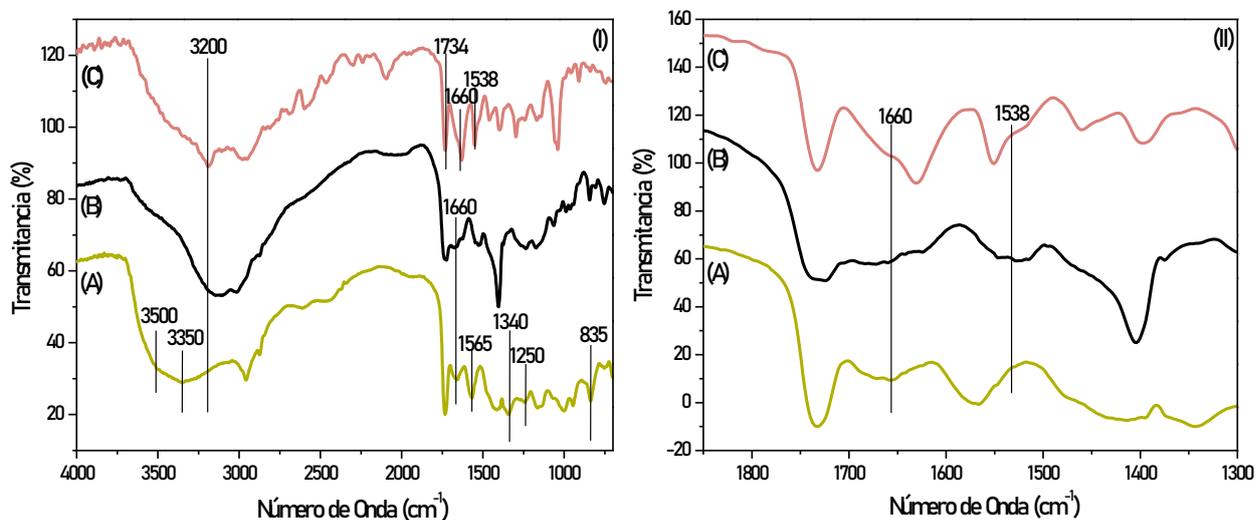


**Imagen VII.3** Imágenes HR-TEM, transformada rápida de Fourier (insertadas) y patrones de difracción de área seleccionada de los bionanocatalizadores luego de ser empleados en la reacción de estudio: (A) PU/S1/Pt5, (B) PU/S8/Pt5 (C) PU/S1/Ag5, (D) PU/S8/Ag5

### VII.3.3.2 Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los sistemas seleccionadas para realizar el análisis FTIR luego de la utilización de los bionanocatalizadores fueron los denominados MBA/SLP/Pt. Esta elección se debe a que los espectros de los soportes de naturaleza poliuretánica poseen una elevada complejidad, particularmente en la zona de las bandas analizadas.

En las figuras VII.11 y VII.12 se presentan los espectros FTIR obtenidos para los sistemas MBA/SLP/Pt5 luego de ser reutilizados. En el mismo gráfico se presentan los espectros del soporte (MBA/SLP) y de los catalizadores frescos para comparación.



**Figura VII.11** Espectros FTIR obtenidos para los sistemas MBA/S1 Pt 5%, II. Ampliación en la zona de las bandas características de las proteínas (A) MBA/S1/Pt5 luego del empleo en la reacción de reducción, (B) MBA/S1/Pt5 (C) MBA/S1, soporte empleado como referencia

En la tabla VII.4 se resume la asignación de las principales bandas analizadas, sin tener en cuenta aquellas que fueron previamente asignadas y estudiadas, con el objetivo de identificar las diferencias entre los espectros de los sistemas previo y post ser empleados como catalizadores en la reacción de estudio. En ambos catalizadores se encontraron bandas que evidencian la presencia del producto de reacción (*p*-aminofenol), como es el caso del estiramiento simétrico del enlace N-H a los  $3350\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu\text{N-H}$ ) y el respectivo estiramiento asimétrico identificado a los  $3500\text{ cm}^{-1}$ . En sumatoria se observan las bandas asociadas a la torsión dentro y fuera del plano del grupo  $\text{NH}_2$  ( $\delta\text{H-N-H}$ ) localizadas en los  $1560$  y  $825\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Por otro lado se identificó una banda asociada al *p*-nitrofenol, puntualmente al estiramiento simétrico del grupo nitro ( $\nu\text{N=O}$ ) a los  $1340\text{ cm}^{-1}$ .

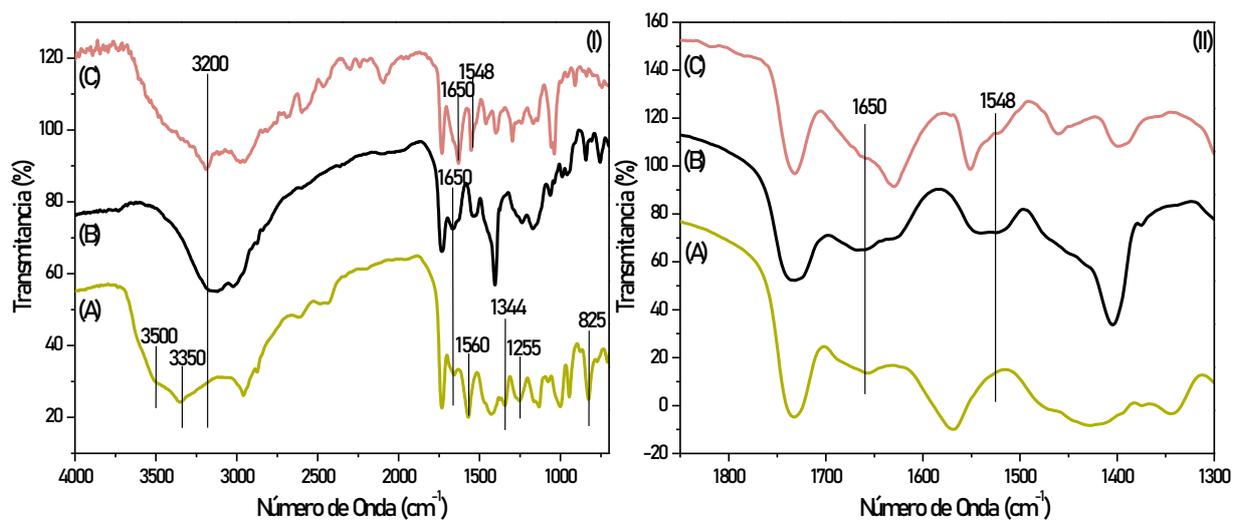


Figura VII.12 Espectros FTIR obtenidos para los sistemas MBA/S8 Pt5, II. Ampliación en la zona de las bandas características de las proteínas (A) MBA/S8/Pt5 luego del empleo en la reacción de reducción, (B) MBA/S8/Pt5, (C) MBA/S8, soporte empleado como referencia

Tabla VII.4. Asignación de las principales bandas de absorción en la región infrarroja de los catalizadores utilizados en la reacción de reducción del *p*-nitrofenol

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	GRUPO FUNCIONAL	MODO VIBRACIONAL	COMPUESTO
3500	NH <sub>2</sub>	$\nu_{as}$ N-H	<i>p</i> -aminofenol
3355-3350	NH <sub>2</sub>	$\nu_s$ N-H	<i>p</i> -aminofenol
1565-1560	NH <sub>2</sub>	$\delta$ H-N-H (en el plano)	<i>p</i> -aminofenol
1344-1340	NO <sub>2</sub>	$\nu_s$ N=O	<i>p</i> -nitrofenol
1255-1250	NH <sub>2</sub>	$\nu$ Ar-N	<i>p</i> -aminofenol
835-825	NH <sub>2</sub>	$\delta$ H-N-H (fuera del plano)	<i>p</i> -aminofenol

## VII.4 CONCLUSIONES PARCIALES

Los sistemas nanocompuestos desarrollados actuaron como catalizadores activos frente a la reducción de *p*-nitrofenol con NaBH<sub>4</sub> en medio acuoso en condiciones suaves, mostrando un excelente desempeño catalítico.

Todos los catalizadores permitieron alcanzar conversiones de entre el 90 y 100%. La constante de velocidad aparente para los catalizadores de platino varió entre 0,033 y 0,14 min<sup>-1</sup>, mientras que en el caso de los de plata los valores de K<sub>app</sub> fueron de entre 0,013 a 0,14 min<sup>-1</sup>, en función de la cantidad de catalizador empleada.

En los bionanocatalizadores de platino no se observó una influencia de la naturaleza del soporte sobre el desempeño catalítico.

Los bionanocatalizadores de plata obtenidos sobre soportes basados en la SLP S8 se comportaron de manera más eficiente en términos de K<sub>app</sub> y TOF que sus contrapartes basadas en S1. Esta observación sugiere que el soporte ejerce una influencia sobre el desempeño catalítico.

Todos los catalizadores lograron ser reutilizados con éxito en al menos 10 ciclos. En general, aunque con particularidades, para todos los catalizadores se observó algún grado de disminución de la K<sub>app</sub> y C% de la reacción sin llegar a observar la pérdida total de la actividad catalítica. Además, los nanocatalizadores reutilizados mantuvieron características morfológicas similares a los catalizadores frescos, con evidencia de un aumento del tamaño de las partículas metálicas.

# VIII

---

*Capítulo VIII*

---

## CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

---



## VIII. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

### VIII.1 CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo de tesis doctoral se logró diseñar y obtener un sistema combinado partícula polimérica/proteínas de capa-S aisladas de *Lactobacillus kefir* que posibilitó la síntesis y estabilización de nanopartículas de plata y platino soportadas. Estos bionanomateriales compuestos se comportaron como bionanocatalizadores con muy buena *performance* catalítica frente a la reacción de reducción de *p*-nitrofenol siendo capaces de ser reutilizados en hasta diez ciclos.

- El soporte propuesto (partícula polimérica/SLP) ofreció estabilización e inmovilización a las nanopartículas metálicas.
- Las SLP soportadas sobre partículas poliméricas no perdieron su capacidad de dirigir y orientar la síntesis de nanopartículas metálicas que presentan en suspensión. En este sentido, las partículas poliméricas (poliuretánicas o acrílicas) con densidad de carga superficial negativa y conteniendo grupos carboxílicos, ofrecieron superficies de anclaje preferidas para estas SLP sin afectar su organización.
- La composición del soporte (combinación partículas poliméricas/SLP) influye en el desempeño catalítico de los nanobiocatalizadores dependiendo del metal empleado.

## VIII.2 PERSPECTIVAS A FUTURO

Concluida esta etapa de estudio sobre los sistemas desarrollados y su aplicación catalítica se proyecta continuar evaluando algunos aspectos complementarios a los previamente presentados.

En este sentido se planea:

- Extender el estudio del proceso de adsorción y autoensamblaje de proteínas de capa-S sobre superficies con diferentes características.
- Extender y escalar la aplicación de los bionanocatalizadores desarrollados testeándolos en término de actividad y/o selectividad frente a otras reacciones de reducción con diversas implicancias

## ANEXOS

### ANEXO I: Análisis de proteínas mediante espectroscopía infrarroja

La espectroscopia infrarroja es uno de los métodos clásicos para la determinación de la estructura de moléculas pequeñas debido a su sensibilidad por la composición química y la arquitectura de las moléculas. Esto convirtió a la espectroscopia infrarroja en una valiosa herramienta para la investigación de la estructura de las proteínas, principalmente al análisis del plegamiento y desplegamiento. La riqueza de información obtenida por esta técnica se puede explotar incluso para sistemas biológicos más grandes que las proteínas, por ejemplo la identificación de cepas bacterianas mediante el análisis FTIR [Barth, 2007]. Entre las ventajas del análisis por FTIR se encuentra que puede realizarse aún en muestras con alta dispersión de luz visible, como las suspensiones de partículas poliméricas por lo que es la técnica más elegida para monitorear la interacción de proteínas con sistemas dispersantes [Witte mann et al., 2004].

La absorción de radiación electromagnética por parte de las proteínas proviene de dos grandes interacciones: la absorción de las cadenas laterales de los aminoácidos y la absorción a cargo de la estructura peptídica (primaria). Respecto a la primera de las contribuciones, lógicamente habrá una dependencia en función de la naturaleza de los residuos presentes en la proteína. La información obtenida producto de este análisis suele ser empleada para estudiar cambios de estructura ante modificaciones en el entorno, como el pH (protonación-desprotonación de los residuos), la coordinación con algunos cationes y los enlaces por puente de hidrógeno establecidos.

Respecto a la segunda contribución, producto de la interacción de la estructura peptídica con la radiación se generan cinco bandas a destacar por su rol en la interpretación de la estructura secundaria de las proteínas.

- Vibración NH (zona: 3300-3070  $\text{cm}^{-1}$ ): Amida A y amida B

La vibración de estiramiento N-H da lugar a la banda amida A entre 3310 y 3270  $\text{cm}^{-1}$ . Como esta banda se debe exclusivamente al grupo -NH resulta insensible a la conformación de la proteína. Su frecuencia depende de la fuerza del enlace de hidrógeno. La amida A suele ser parte de una doble de resonancia de Fermi con el segundo componente que absorbe débilmente entre 3100 y 3030  $\text{cm}^{-1}$  y conforma la denominada amida B.

- Amida I: 1650  $\text{cm}^{-1}$

La vibración de la banda amida I, que absorbe cerca de los 1650  $\text{cm}^{-1}$ , surge principalmente de la vibración de estiramiento C=O con contribuciones menores de la vibración de estiramiento C-N fuera del plano, la deformación C-C-N y la flexión en plano NH. En las proteínas, la medida en que las diversas coordenadas internas (componentes) contribuyen al modo normal de amida I depende de la estructura de la secuencia peptídica. La vibración amida I se ve mínimamente afectada por la naturaleza de la cadena lateral, la dependencia más fuerte de esta vibración es con la estructura secundaria y es, por lo tanto, la vibración de amida que se usa más comúnmente para el análisis de ésta.

- Amida II:  $1550\text{ cm}^{-1}$

El modo vibracional denominado amida II resulta como combinación del estiramiento N-H en el plano y la vibración de estiramiento C-N con menor contribución del estiramiento C-O en el plano y los estiramientos C-C y N-C

Como la banda Amida I, la Amida II apenas se ve afectada por las vibraciones de la cadena lateral. Sin embargo, la gran diferencia entre ambas es que la correlación entre la estructura secundaria de la proteína y la frecuencia es menos sencilla que para la vibración amida I. No obstante, proporciona valiosa información estructural y, de ser necesario, la predicción de la estructura secundaria se puede hacer empleando únicamente la amida II

- Amida III:  $1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$

El modo Amida III se origina en la combinación de la flexión N-H en el plano y el estiramiento C-N con pequeñas contribuciones de la flexión C-O en el plano y la vibración C-C. En polipéptidos, la composición de este modo es más complejo, ya que depende de la estructura de la cadena lateral y también dado que la flexión N-H contribuye a varios modos en la región de  $1400\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ . A pesar de las contribuciones de la cadena lateral a la banda amida III, este modo se puede utilizar también para la predicción de la estructura secundaria.

En este trabajo se utilizó, principalmente, la información estructural ofrecida por la banda amida I por lo que se ampliará sobre la conducta de dicha señal.

El mecanismo fundamental que hace que la vibración amida I sea sensible a la estructura secundaria es el acoplamiento del dipolo de transición (TDC). Esta es una interacción de resonancia dada entre los dipolos oscilantes de los grupos amida vecinos y el acoplamiento depende de su orientación relativa y su distancia. El acoplamiento será más fuerte cuando los osciladores vibren con la misma frecuencia. Por otro lado, los efectos del establecimiento de enlaces puente de hidrógeno se han examinado computacionalmente en cálculos *ab initio* y experimentalmente, encontrándose que cada uno de los dos posibles enlaces de hidrógeno al grupo C=O reduce la frecuencia de la amida I en 20 a  $30\text{ cm}^{-1}$  y un enlace de hidrógeno ligado al grupo -NH la reduce en 10 a  $20\text{ cm}^{-1}$ . Los cambios se vuelven más bruscos cuando se emplea un modelo continuo para el agua y se la incluye en los cálculos [Torii et al., 1998; Mennucci & Martinez, 2005]. Como consecuencia de ambas contribuciones la posición y la forma de la banda Amida I depende fuertemente de la estructura secundaria de la proteína y debido a esto en los últimos años se han desarrollado diversas técnicas para obtener, de este modo vibracional, la mayor cantidad de información estructural como sea posible.

La sensibilidad de la vibración amida I con la estructura secundaria es tal que permite estudiar el plegado, el despliegue y la agregación de las proteínas a través de la espectroscopia en el infrarrojo [Barth, 2007].

Mientras que la proteína plegada nativa exhibe una banda amida I con clara estructura fina, la proteína desplegada muestra una banda amida I amplia y sin rasgos centrada cerca de los  $1650\text{ cm}^{-1}$ , que es característica de una estructura desordenada. En adición, los agregados de proteína suelen presentar una banda cerca o por debajo de los

1620  $\text{cm}^{-1}$  propia de la contribución de los puentes de hidrógeno de las láminas  $\beta$  intermoleculares [Surewicz et al., 1990]. En este sentido, cabe destacar que se ha reportado la formación de agregados irreversibles y la conversión de la estructura secundaria hacia láminas  $\beta$  como procesos que ocurren en simultáneo. Por este motivo se ha sugerido que el aumento de la contribución de las láminas  $\beta$  en la estructura secundaria de las proteínas es un paso necesario durante la nucleación y el alargamiento (etapas iniciales del proceso de agregación) [Frieden, 2007].

En líneas generales, la contribución de cada tipo de sub-estructura secundaria a la banda amida I se vincula a los puentes de hidrógeno establecidos. En la estructura  $\beta$ -plegada estos son más fuertes y se encuentran entre los 1640-1630  $\text{cm}^{-1}$  mientras que los relacionados con las estructuras  $\alpha$ -hélice son más débiles por ser enlaces más largos y su absorción se da a mayor número de onda en los 1660-1648  $\text{cm}^{-1}$ . La absorción por encima de 1670  $\text{cm}^{-1}$  está asociada a los giros en los cuales el estiramiento del grupo carbonilo sucede en el interior de la proteína modificando su frecuencia.

Los dos enfoques más comúnmente usados para determinar la estructura secundaria a partir de un espectro infrarrojo son:

- I. El ajuste de la banda amida I en sus bandas sub-componentes principales después de identificar cada posición con técnicas de estrechamiento de banda como la derivada segunda, en lo que se conoce como la autodeconvolución Fourier del espectro (FSD).
- II. Descomponer la banda de amida I en base a espectros que se han calculado a partir de un conjunto de espectros obtenidos para proteínas de calibración cuya estructura secundaria es perfectamente conocida y típicamente determinada por rayos X en su forma cristalina.

En este trabajo se emplea el método mencionado en primer lugar con el cual se logran buenas predicciones al clasificar los componentes de la banda en:  $\alpha$ -hélice, lámina  $\beta$ ,  $\beta$ -giros y estructuras irregulares, técnica que tiene un error aproximado en la predicción del 7% luego del correcto pre-tratamiento del espectro [Barth, 2007]. En este trabajo se optó por no distinguir entre las conformaciones  $\beta$ , unificándolas bajo la denominación lámina  $\beta$ , tanto a las  $\beta$ -paralelas como a las  $\beta$ -antiparalelas.

El algoritmo usado para la deconvolución de las bandas fue descrito inicialmente por Kauppinen y col. (1981) en el cual se parte de la asunción de la forma Lorentziana de la banda original irresuelta. Más tarde Byler & Susi (1986) descubrieron que se obtenían resultados muy similares, con la necesidad de cumplir algunos requisitos matemáticos menos, al realizar el ajuste empleando una función Gaussiana. En este trabajo se optó por la segunda técnica de ajuste.

## ANEXO II: Análisis de la permanencia en suspensión de los polímeros y las proteínas

Con el objetivo de optimizar la velocidad de centrifugación a emplear en el proceso de purificación de los sistemas polímero/proteína se ensayó el comportamiento de sedimentación frente a distintos tiempos y velocidades de centrifugación (V). La concentración de las soluciones empleadas en el ensayo fue idéntica a la que presenta cada componente en la combinación.

**Tabla Anexo II** Conducta frente a la centrifugación

POL/PROT	Tiempo (min)	V:2000 rpm	V:4000 rpm	V: 6000 rpm	V:8000 rpm	V:10000 rpm	V: 12500 rpm
MB	5	x	x	x	x	x	x
	15	x	x	x	x	x	✓
	30	x	✓	✓	✓	✓	✓
MBH	5	x	x	x	x	x	x
	15	x	x	x	x	✓	✓
	30	x	✓	✓	✓	✓	✓
MBA	5	x	x	x	x	x	x
	15	x	x	x	✓	✓	✓
	30	x	✓	✓	✓	✓	✓
PU	5	x	x	x	x	x	x
	15	x	x	x	✓	✓	✓
	30	x	✓	✓	✓	✓	✓
83111	5	x	x	x	x	x	x
	15	x	x	x	x	x	x
	30	x	x	x	x	x	x
8348	5	x	x	x	x	x	x
	15	x	x	x	x	x	x
	30	x	x	x	x	x	x

x: Sin evidencia de sedimentación, ✓: Sedimentación visible

## ANEXO III: Análisis estadístico de los modelos de adsorción

### Selección del mejor modelo

Una vez obtenido el ajuste no lineales para cada modelo, la comparación de la bondad de ajuste entre los cuatro modelos se llevó a cabo analizando los valores obtenidos para los parámetros presentados en la sección V.3.1.

Tabla Anexo III.1 Comparación de la bondad de ajuste de los modelos analizados.

POL/PROT	MODELO	$r^2$	RSS	$X^2$	ARE
MB/S1	Langmuir	0,8981	$2,69 \times 10^{-03}$	$5,39 \times 10^{-05}$	0,0642
	Freundlich	0,8777	$3,23 \times 10^{-03}$	$6,47 \times 10^{-05}$	0,0681
	Langmuir-Freundlich	0,9897	$2,18 \times 10^{-05}$	$5,45 \times 10^{-07}$	0,0245
	Temkin	0,8951	$2,77 \times 10^{-04}$	$5,55 \times 10^{-05}$	0,0646
MB/S8	Langmuir	0,8939	$3,28 \times 10^{-04}$	$6,57 \times 10^{-05}$	0,0589
	Freundlich	0,8617	$4,28 \times 10^{-04}$	$8,56 \times 10^{-05}$	0,0670
	Langmuir-Freundlich	0,9647	$8,73 \times 10^{-05}$	$2,18 \times 10^{-05}$	0,0209
	Temkin	0,8820	$3,65 \times 10^{-04}$	$7,30 \times 10^{-05}$	0,0613
MBH/S1	Langmuir	0,8294	$2,56 \times 10^{-03}$	$5,12 \times 10^{-04}$	0,0726
	Freundlich	0,7888	$3,17 \times 10^{-03}$	$6,33 \times 10^{-04}$	0,0809
	Langmuir-Freundlich	0,9645	$4,26 \times 10^{-04}$	$1,06 \times 10^{-04}$	0,0271
	Temkin	0,8183	$2,73 \times 10^{-03}$	$5,45 \times 10^{-04}$	0,0743
MBH/S8	Langmuir	0,9291	$7,28 \times 10^{-04}$	$1,46 \times 10^{-04}$	0,0542
	Freundlich	0,9210	$8,11 \times 10^{-04}$	$1,62 \times 10^{-04}$	0,0569
	Langmuir-Freundlich	0,9704	$2,43 \times 10^{-04}$	$6,07 \times 10^{-05}$	0,0301
	Temkin	0,9282	$7,36 \times 10^{-04}$	$1,47 \times 10^{-04}$	0,0544
MBA/S1	Langmuir	0,7557	$3,19 \times 10^{-03}$	$6,37 \times 10^{-04}$	0,0644
	Freundlich	0,6860	$4,10 \times 10^{-03}$	$8,19 \times 10^{-04}$	0,0727
	Langmuir-Freundlich	0,9914	$8,99 \times 10^{-05}$	$2,25 \times 10^{-05}$	0,0105
	Temkin	0,7198	$3,66 \times 10^{-03}$	$7,31 \times 10^{-04}$	0,0689
MBA/S8	Langmuir	0,8376	$1,00 \times 10^{-02}$	$2,00 \times 10^{-03}$	0,0698
	Freundlich	0,7985	$1,24 \times 10^{-02}$	$2,49 \times 10^{-03}$	0,0783
	Langmuir-Freundlich	0,9658	$1,69 \times 10^{-03}$	$4,22 \times 10^{-04}$	0,0263
	Temkin	0,8254	$1,08 \times 10^{-02}$	$2,15 \times 10^{-03}$	0,0720
PU/S1	Langmuir	0,6979	$2,38 \times 10^{-02}$	$4,76 \times 10^{-03}$	0,1773
	Freundlich	0,6854	$2,48 \times 10^{-02}$	$4,96 \times 10^{-03}$	0,1816
	Langmuir-Freundlich	0,9933	$4,21 \times 10^{-04}$	$1,05 \times 10^{-04}$	0,0233
	Temkin	0,6966	$2,39 \times 10^{-02}$	$4,78 \times 10^{-03}$	0,1779
PU/S8	Langmuir	0,7087	$8,66 \times 10^{-02}$	$1,73 \times 10^{-02}$	0,4397
	Freundlich	0,7638	$7,02 \times 10^{-02}$	$1,40 \times 10^{-02}$	0,3396
	Langmuir-Freundlich	0,9866	$3,19 \times 10^{-03}$	$7,99 \times 10^{-04}$	0,0485
	Temkin	0,7086	$8,66 \times 10^{-02}$	$1,73 \times 10^{-02}$	0,4394

Con la finalidad de conocer el valor que toman los parámetros característicos del proceso de adsorción (como la constante de afinidad, la cantidad máxima adsorbida y el factor de heterogeneidad de la superficie) dado que permiten describir de manera más extensa la interacción entre el polímero y la proteína, se recurrió a modelar los datos obtenidos en función de los modelos presentados en la introducción del capítulo V. Más allá de la conducta gráfica del ajuste observada, la elección del modelo que ofrece la mejor correlación con los datos experimentales se logró por comparación de diversos parámetros de bondad de ajuste para el ajuste no lineal realizado cuyos resultados se presentan en la tabla Anexo III.1.

Si bien la linealización se ha utilizado para estimar los parámetros característicos de la adsorción de ciertos sistemas debido a la simplicidad en la estimación, se ha demostrado una gran variación entre las distintas linealizaciones existentes tanto para los valores estimados de los parámetros, como también en el valor de los coeficientes de correlación. Por otro lado, una linealización extensa puede dar lugar a resultados erróneos en comparación con las predicciones optimizadas por métodos no-lineales. Distintas pruebas estadísticas demostraron la existencia de aberraciones en los valores linealmente estimados por lo tanto, resulta más confiable encontrar los coeficientes del modelo por un método no lineal. Los resultados obtenidos a partir de modelos de adsorción linealizados tendrán, por lo mencionado previamente, un carácter aproximado, no exacto [Subramanyam & Das, 2009]. Por último, la linealización de las isotermas lograda mediante la transformación matemática de los datos obtenidos puede alterar implícitamente la estructura de los errores del modelo e incumplir los supuestos del mismo. Esto explicaría el hecho de que típicamente a bajas concentraciones la expresión lineal de Freundlich se ajusta mejor a los datos experimentales que la expresión lineal de Langmuir, mientras que esta última se ajusta mejor a concentraciones elevadas [Allen et al., 2002].

Debido a las variaciones y alteraciones en los parámetros generadas por la linealización se optó por realizar ajustes no-lineales y para ello se utilizó el Software Origin Pro8.5, empleando el método computacional basado la conducta asintótico-simétrica con un máximo de 400 iteraciones. Dentro de los algoritmos ofrecidos por la plataforma se utilizó el de Levenberg-Marquardt (procedimiento estándar para rutinas de ajuste no-lineal). Se ponderó el peso de los datos en función de la desviación presentada en la modalidad de operación *Direct Weighting*.

Tabla Anexo III.2 Parámetros obtenidos a partir del ajuste con cada modelo.

POL/PROT	MODELO	K (ml/m <sup>2</sup> )	q <sub>m</sub> (mg/m <sup>2</sup> )	N	A(m <sup>2</sup> /molec)
MB/S1	Langmuir	2,7550	0,3981	-	4,04x10 <sup>-17</sup>
	Freundlich	0,7940	-	0,80	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>10,1357</b>	<b>0,8232</b>	<b>3,08</b>	<b>9,23x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	0,9204	1,2062	-	1,35x10 <sup>-16</sup>
MB/S8	Langmuir	1,2765	1,7300	-	6,61x10 <sup>-17</sup>
	Freundlich	0,9719	-	0,51	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>15,9595</b>	<b>1,0288</b>	<b>3,38</b>	<b>2,07x10<sup>-16</sup></b>
	Temkin	4,8024	0,5531	-	1,11x10 <sup>-16</sup>
MBH/S1	Langmuir	0,8248	4,7938	-	2,32x10 <sup>-17</sup>
	Freundlich	2,1813	-	0,63	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>18,2498</b>	<b>2,2150</b>	<b>3,83</b>	<b>6,22x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	2,3705	1,7896	-	5,02x10 <sup>-17</sup>
MBH/S8	Langmuir	0,2265	9,8703	-	1,16x10 <sup>-17</sup>
	Freundlich	0,8802	-	0,88	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>5,5649</b>	<b>2,0504</b>	<b>2,67</b>	<b>2,49x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	0,4878	4,5954	-	5,59x10 <sup>-17</sup>
MBA/S1	Langmuir	2,3643	3,6741	-	3,03x10 <sup>-17</sup>
	Freundlich	2,5883	-	0,37	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>450,9440</b>	<b>2,5111</b>	<b>6,67</b>	<b>4,43x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	13,9088	0,9587	-	1,16x10 <sup>-16</sup>
MBA/S8	Langmuir	1,0094	6,3359	-	1,81x10 <sup>-17</sup>
	Freundlich	3,1910	-	0,58	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>24,2461</b>	<b>3,2644</b>	<b>4,01</b>	<b>3,51x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	3,2046	2,2208	-	5,16x10 <sup>-17</sup>
PU/S1	Langmuir	0,2421	11,8419	-	9,40x10 <sup>-18</sup>
	Freundlich	2,3377	-	0,89	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>438,7443</b>	<b>2,1326</b>	<b>9,03</b>	<b>5,22x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	0,5101	5,6135	-	1,98x10 <sup>-17</sup>
PU/S8	Langmuir	0,0001	35122,6193	-	3,26x10 <sup>-21</sup>
	Freundlich	4,1157	-	1,33	-
	<b>Langmuir-Freundlich</b>	<b>27,0754</b>	<b>3,8965</b>	<b>6,45</b>	<b>2,94x10<sup>-17</sup></b>
	Temkin	0,0009	4423,3072	-	2,59x10 <sup>-20</sup>

## ANEXO IV: Ensayos de reutilización

Se presentan las curvas de conversión y los resultados del análisis sobre las  $K_{app}$  para los catalizadores de platino y plata se presentan. En comparación con los resultados obtenidos al colocar un 1,2% de metal respecto al reactivo, se observan constantes de velocidad aparente mayores debido a la mayor cantidad de catalizador colocado. Sin embargo, en el caso del catalizador MBA/S8/Ag esta diferencia es de pequeña magnitud. Respecto a la capacidad de reutilización no se observan diferencias significativas al emplear una mayor cantidad de catalizador. La principal diferencia entre el estudio de reutilización al colocar distintas cantidades de catalizador radica en la reducción de la brecha observada entre los metales. Al emplear mayor cantidad de catalizador se observan menores diferencias en la disminución de la constante de velocidad y la conversión entre los catalizadores de plata y platino.

A continuación, en las figuras AIII.1 y AIII.2, se presentan las curvas de reacción y el análisis de la constante de velocidad aparente para los catalizadores desarrollados.

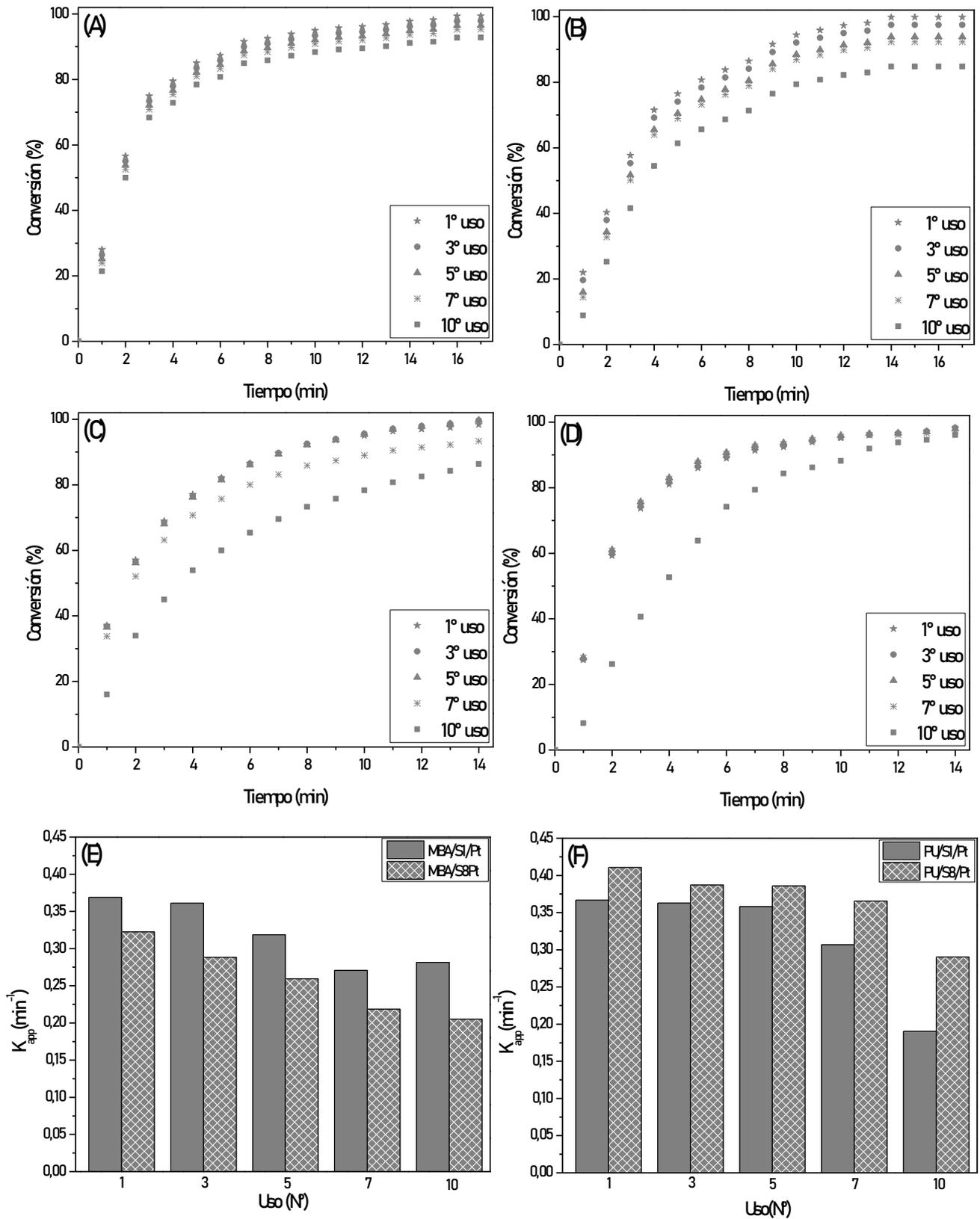


Figura AIII.1 Reutilización de los catalizadores de platino, MBA/S1/Pt (A), MBA/S8/Pt (B), PU/S1/Pt (C), PU/S8/Pt (D) y constante de velocidad aparente frente a la reutilización de MBA/SLP/Pt (E) y PU/SLP/Pt (F).

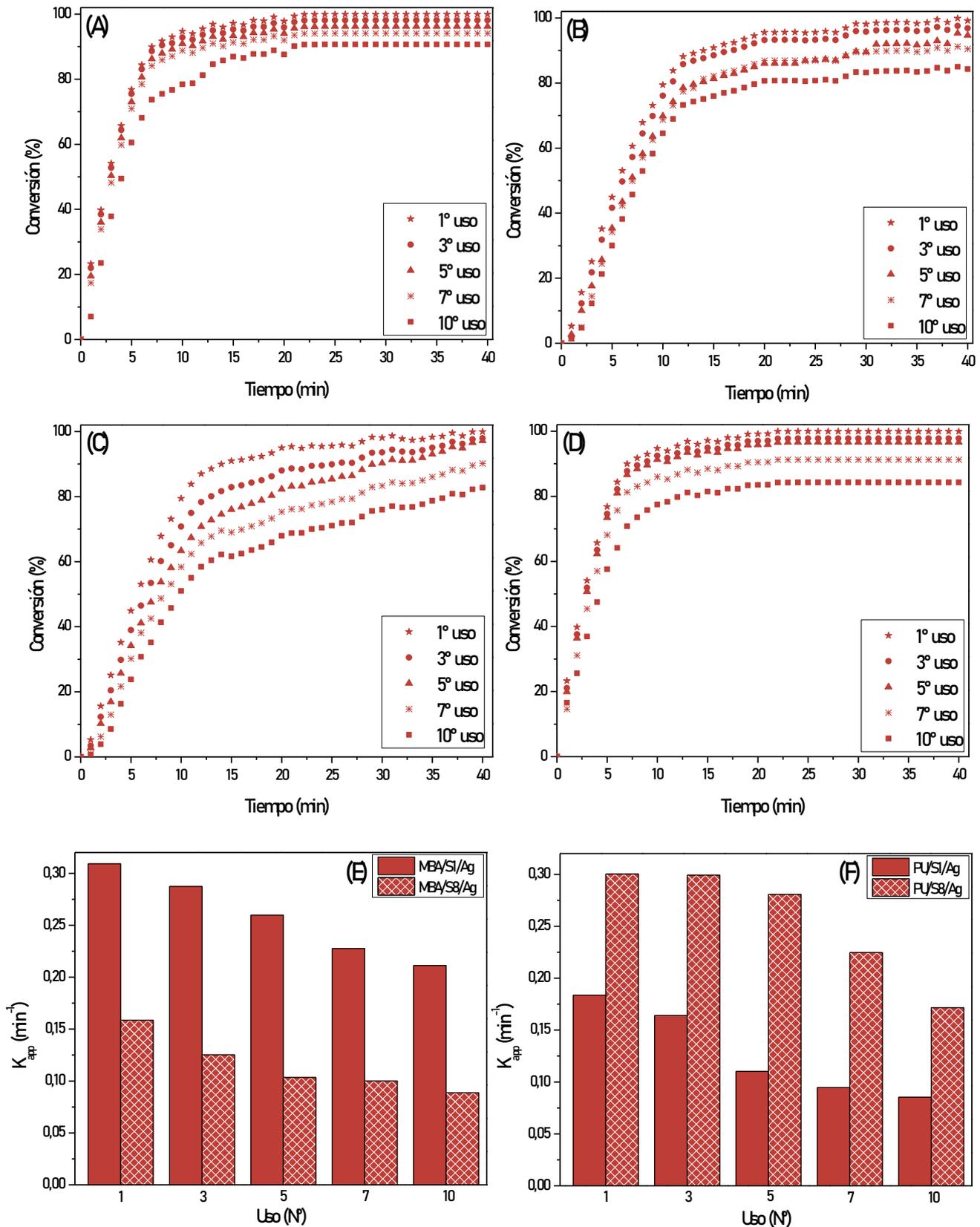


Figura AIII.2 Reutilización de los catalizadores de plata, MBA/S1/Ag (A), MBA/S8/Ag (B), PU/S1/Ag (C), PU/S8/Ag (D) y constante de velocidad aparente frente a la reutilización de MBA/SLP/Ag (E) y PU/SLP/Ag (F).

# ÍNDICE DE ESQUEMAS, FIGURAS, IMÁGENES Y TABLAS

## ESQUEMAS

<b>Esquema I.1</b> Estructura del ácido acrílico y del ácido metacrílico, de los cuales se deriva la familia de los monómeros acrílicos (ésteres acrílicos).	36
<b>Esquema I.2</b> Esquema de síntesis de los poliuretanos	40
<b>Esquema I.3</b> Representación esquemática de la síntesis de poliuretanos en dispersión acuosa preparados por el método de prepolímero en masa.	43
<b>Esquema I.4</b> Mecanismo de reacción de reducción de <i>p</i> -nitrofenol en dos pasos	56
<b>Esquema III.1</b> Estructura de los monómeros vinílicos empleados en este trabajo de tesis	61
<b>Esquema III.2</b> Representación esquemática de la síntesis de p-MB por polimerización en emulsión	62
<b>Esquema III.3</b> Representación esquemática de la síntesis de p-MBA por polimerización en emulsión	63
<b>Esquema III.4</b> Representación esquemática de la síntesis de p-MBH por polimerización en emulsión	64
<b>Esquema III.5</b> Estructura de los monómeros empleados en la obtención del poliuretano	65
<b>Esquema III.6</b> Representación esquemática de la síntesis de poliuretano por el método del prepolímero	66
<b>Esquema V.1</b> Ilustración esquemática de los experimentos de adsorción de proteínas de capa-S sobre superficies poliméricas	113
<b>Esquema VI.1</b> Obtención de los nanocatalizadores metálicos empleando la técnica de impregnación modificada.	135
<b>Esquema VII.1</b> Representación y mecanismo de reacción de la reducción de <i>p</i> -nitrofenol	154

## FIGURAS

<b>Figura I.1</b> Efecto del tamaño en los metales	18
<b>Figura I.2</b> Métodos de síntesis de nanopartículas	19
<b>Figura I.3</b> Representación esquemática de los tipos de arreglos 2D de las proteínas de capa-S agrupados de acuerdo con las posibles simetrías. En gris oscuro se muestra la unidad morfológica seleccionada arbitrariamente [Schuster & Sleytr, 2013].	28
<b>Figura I.4</b> Arquitectura del autoensamblado de las proteínas de capa-S sobre diferentes superficies [Pum & Sleytr, 2014; Sleytr et al., 2011]	30
<b>Figura I.5</b> Adsorción de proteínas en función de la presencia de glicósidos [Schuster & Sleytr, 2015]	31
<b>Figura I.6</b> Representación del mecanismo de polimerización en emulsión	38
<b>Figura I.7</b> Propiedades físicas de las partículas poliméricas que influyen en el proceso de adsorción de proteínas	44
<b>Figura I.8</b> Adsorción de una proteína sobre una superficie polimérica, proteína hidratada, adsorción y deshidratación	45
<b>Figura I.9</b> Representación de la unión por vía no covalente (arriba) y covalente usando un sitio reactivo específico en la proteína (abajo) [Boyer et al., 2011]	48
<b>Figura I.10</b> Interacción entre proteínas y partículas poliméricas	48
<b>Figura I.11</b> Representación de la reacción de reducción de <i>p</i> -NP a <i>p</i> -AP en presencia de catalizador.	55
<b>Figura III.1</b> Espectros FTIR de los polímeros sintetizados: <b>(A)</b> p-MB, <b>(B)</b> p-MBH, <b>(C)</b> p-MBA, <b>(D)</b> p-U	76
<b>Figura III.2</b> Curvas de titulación conductimétrica: <b>(A)</b> p-MB, <b>(B)</b> p-MBH, <b>(C)</b> p-MBA, <b>(D)</b> p-U Se presenta la media de los valores obtenidos por duplicado sin sus barras de error para mayor claridad visual	79
<b>Figura III.3</b> Imágenes TEM e histogramas: <b>(A)</b> p-MB, <b>(B)</b> p-MBH, <b>(C)</b> p-MBA, <b>(D)</b> p-U	81
<b>Figura III.4 (I)</b> Curvas SAXS y ajustes y gráfico log-log <b>(II)</b> Aplicación de la ley de Guinier para: <b>(A)</b> p-U, <b>(B)</b> p-MBA	83
<b>Figura IV.1</b> Distribución del diámetro promedio de las SLP S1 <b>(A)</b> , SLP S1 sonicada <b>(B)</b> , SLP S8 <b>(C)</b> , y SLP S8 sonicada <b>(D)</b>	95
<b>Figura IV.2.1</b> FTIR proteínas de capa-S <b>(A)</b> S1 <b>(B)</b> S8	97

<b>Figura IV.2.2</b> FTIR en la región de la banda Amida I de proteínas de capa-S <b>(A)</b> S1 <b>(B)</b> S8	97
<b>Figura IV.3</b> Espectros FTIR y ajuste de curvas en la región Amida I para las SLP S1 <b>(A)</b> y S8 <b>(B)</b> . Se muestran los componentes gaussianos individuales junto a sus asignaciones (trazo continuo) y el mejor ajuste (trazo discontinuo).	99
<b>Figura V.1</b> Comparación teórica de los modelos de Freundlich, Langmuir, Langmuir-Freundlich y Temkin. Para una mejor apreciación de las diferencias las constantes se han modificado hasta lograr un desplazamiento óptimo de las curvas.	111
<b>Figura V.2</b> Isotermas de adsorción de las proteínas de capa-S S8 <b>(I)</b> y S1 <b>(II)</b> sobre la superficie polimérica p-MBA	115
<b>Figura V.3</b> Isotermas de adsorción obtenidas junto al ajuste Langmuir-Freundlich para las proteínas S8 <b>(I)</b> y S1 <b>(II)</b> sobre las superficies poliméricas analizadas	116
<b>Figura V.4</b> Cantidad máxima de proteína adsorbida, $q_m$ <b>(I)</b> y constante de afinidad, $K_{L-F}$ <b>(II)</b> en función de la combinación polímero/proteína	118
<b>Figura V.5</b> Esquema del sistema polímero/proteína y comparación del diámetro y el espesor de la corona proteica	121
<b>Figura V.6</b> Espectros FTIR <b>(I)</b> y ampliación de la región Amida I <b>(II)</b> , <b>(A)</b> MBA/S8 <b>(B)</b> S8 <b>(C)</b> MBA/S1 <b>(D)</b> S1 <b>(E)</b> p-MBA	122
<b>Figura V.7</b> Espectros FTIR <b>(I)</b> y ampliación de la región Amida I <b>(II)</b> , <b>(A)</b> PU/S8 <b>(B)</b> S8 <b>(C)</b> PU/S1 <b>(D)</b> S1 <b>(E)</b> p-U	123
<b>Figura V.8</b> Banda amida I y su deconvolución para las proteínas de capa-S adsorbidas (trazo continuo negro y discontinuo rojo respectivamente), comparación con dicha banda para las proteínas libres (trazo continuo azul) y espectro diferencia entre los anteriores (trazo discontinuo verde), <b>(A)</b> MBA/S1 <b>(B)</b> PU/S1 <b>(C)</b> MBA/S8 <b>(D)</b> PU/S8	124
<b>Figura V.9</b> <b>(A)</b> Perfiles SAXS y ajuste al modelo (trazo continuo) Core-Shell Sphere para las muestras <b>(C)</b> <b>(B)</b> Gráficos de Guinier para las muestras <b>(C)</b>	128
<b>Figura V.10</b> <b>(A)</b> Perfiles SAXS y ajuste al modelo (trazo continuo) <i>Core-Shell Sphere+Sphere</i> para las muestras <b>(D)</b> <b>(B)</b> Gráficos de Guinier para las muestras <b>(D)</b>	129
<b>Figura VI.1</b> Curvas SAXS para los sistemas obtenidos empleando MBA, soportes y nanocatalizadores <b>(A)</b> MBA/S1 <b>(B)</b> MBA/S1/Pt5 <b>(C)</b> MBA/S1/Pt10 <b>(D)</b> MBA/S8 <b>(E)</b> MBA/S8 Pt/5 <b>(F)</b> MBA/S8/Pt10. Las curvas fueron desplazadas para mayor claridad visual.	149
<b>Figura VI.2</b> Curvas SAXS para los sistemas obtenidos empleando PU, soportes y nanocatalizadores <b>(A)</b> PU/S1 <b>(B)</b> PU/S1/Pt5 <b>(C)</b> PU/S1/Pt10 <b>(D)</b> PU/S8 <b>(E)</b> PU/S8/Pt5 <b>(F)</b> PU/S8 Pt/10. Las curvas fueron desplazadas para mayor claridad visual.	149

**Figura VI.3** Curvas SAXS para los sistemas denominados P/SLP/Pt5 obtenidas por sustracción de la contribución del soporte, ajustes efectuados con el modelo Sphere (trazo continuo) **(A)** MBA/S8/Pt5 **(B)** MBA/S1/Pt5 **(C)** PU/S8/Pt10 **(D)** PU/S1/Pt10. Las curvas fueron desplazadas para mayor claridad visual. 150

**Figura VII.1** Espectro de absorción del *p*-nitrofenol (trazo discontinuo) y del *p*-nitrofenolato (trazo continuo). 160

**Figura VII.2** Evolución del espectro de absorción UV-vis en el tiempo conforme avanza la reacción de reducción del *p*-nitrofenol. En las imágenes insertadas se muestra la coloración de la mezcla reactiva al inicio y al final de la reacción 161

**Figura VII.3** Curvas de conversión y linealización de la conducta para los catalizadores de Platino, MBA/S1/Pt **(A)**, MBA/S8/Pt **(B)**, PU/S1/Pt **(C)**, PU/S8/Pt **(D)**. Se presenta el valor de la media observada de los triplicados omitiendo la barra de error para mayor claridad visual. 164

**Figura VII.4** Curvas de conversión y linealización de la conducta para los catalizadores de Plata, MBA/S1/Ag **(A)**, MBA/S8/Ag **(B)**, PU/S1/Ag **(C)**, PU/S8/Ag **(D)**. Se presenta el valor de la media observada de los triplicados omitiendo la barra de error para mayor claridad visual. 165

**Figura VII.5** Comparación de la velocidad aparente de reacción, colocando 1,2% M/RVO, de los distintos catalizadores desarrollados. Junto a las barras y su error, se presenta el tamaño promedio de nanopartícula y la dispersión metálica del catalizador. 166

**Figura VII.6** Comparación del TOF al colocar 1,2% M/RVO, de los distintos catalizadores desarrollados. Junto a las barras y su error, se presenta el tamaño promedio de nanopartícula y la dispersión metálica del catalizador. 167

**Figura VII.7** Comparación de la velocidad de reacción aparente para la reacción de reducción de *p*-nitrofenol acuosa, catalizada con metales reportadas previamente. Los datos señalados en color gris y rojo corresponden a los valores obtenidos en este trabajo para los catalizadores de platino y plata respectivamente. 168

**Figura VII.8** Reutilización de los catalizadores de Platino, MBA/S1/Pt **(A)**, MBA/S8/Pt **(B)**, PU/S1/Pt **(C)**, y PU/S8/Pt **(D)**. Constante de velocidad aparente frente a la reutilización de los catalizadores de Platino, MBA/SLP/Pt **(E)** y PU/SLP/Pt **(F)**. 170

**Figura VII.9** Reutilización de los catalizadores de plata, MBA/S1/Ag **(A)**, MBA/S8/Ag **(B)**, PU/S1/Ag **(C)**, y PU/S8/Ag **(D)**. Constante de velocidad aparente frente a la reutilización de los catalizadores de Plata, MBA/SLP/Ag **(E)** y PU/SLP/Ag **(F)**. 172

**Figura VII.10** Cambio relativo de tamaño de las nanopartículas luego del empleo de los sistemas como catalizadores en la reacción de reducción de *p*-nitrofenol. Tamaño inicial (relleno continuo), tamaño final (relleno con textura) y cambio relativo porcentual. 176

**Figura VII.11** Espectros FTIR obtenidos para los sistemas MBA/S1 Pt 5%, II. Ampliación en la zona de las bandas características de las proteínas **(A)** MBA/S1/Pt5 luego del empleo en la reacción de reducción, **(B)** MBA/S1/Pt5 **(C)** MBA/S1, soporte empleado como referencia 178

**Figura VII.12** Espectros FTIR obtenidos para los sistemas MBA/S8 Pt5, II. Ampliación en la zona de las bandas características de las proteínas **(A)** MBA/S8/Pt5 luego del empleo en la reacción de reducción, **(B)** MBA/S8/Pt5, **(C)** MBA/S8, soporte empleado como referencia 179

**Figura AIII.1** Reutilización de los catalizadores de platino, MBA/S1/Pt **(A)**, MBA/S8/Pt **(B)**, PU/S1/Pt **(C)**, PU/S8/Pt **(D)** y constante de velocidad aparente frente a la reutilización de MBA/SLP/Pt **(E)** y PU/SLP/Pt **(F)**. 192

**Figura AIII.2** Reutilización de los catalizadores de plata, MBA/S1/Ag **(A)**, MBA/S8/Ag **(B)**, PU/S1/Ag **(C)**, PU/S8/Ag **(D)** y constante de velocidad aparente frente a la reutilización de MBA/SLP/Ag **(E)** y PU/SLP/Ag **(F)**. 193

## IMÁGENES

<b>Imagen I.1</b> Micrografía TEM de <i>L. kefir</i> 8321 en la cual se puede apreciar la capa-S en esta bacteria [Garrote et al., 2004].	25
<b>Imagen I.2</b> Micrografías e ilustración esquemática de la arquitectura supramolecular de las proteínas de capa-S en bacterias Gram negativas <b>(A)</b> y Gram positivas <b>(B)</b> . Abreviaturas: CW, pared celular Gram-positiva; OM, membrana externa; PG, capa de peptidoglicano; PM, membrana plasmática; S, capa-S. [Sleytr & Beveridge, 1999; Sleytr et al., 2014].	26
<b>Imagen I.3</b> Imágenes TEM (barra:100 nm) tomadas de <b>(A)</b> <i>Ly. Sphaericus</i> CCM 2177 (p4), <b>(B)</b> <i>G. stearothermophilus</i> PV72/p2 (p1) y <b>(C)</b> <i>T. thermohydrosulfuricus</i> L111-69 (p6) [Sleytr et al., 2011]	27
<b>Imagen III.1</b> Imagen y esquema del reactor empleado en la síntesis de las dispersiones poliméricos (imagen y esquema)	68
<b>Imagen IV.1</b> Micrografías AFM tomadas con distintos aumentos y diagrama de simetría hexagonal [Gerbino, 2013]	90
<b>Imagen IV.2</b> Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para los extractos obtenidos producto del tratamiento con GuHCl de las cepas de <i>L. kefir</i> S1 y S8. Se indica la masa molecular relativa de los marcadores de peso molecular (KDa).	94
<b>Imagen IV.3</b> Micrografías TEM de las proteínas de capa-S S8 <b>(A)</b> y S1 <b>(B)</b>	100
<b>Imagen IV.4</b> Micrografía TEM de la SLP S8 <b>(A)</b> , imagen aumentada y representación gráfica del arreglo p6, y de SLP S1 <b>(B)</b>	101
<b>Imagen V.1</b> Resuspensión de los pellets (conteniendo los sistemas polímero/proteína) a distintas concentraciones de proteína. <b>(A)</b> MBA/S8 <b>(B)</b> PU/S8 <b>(C)</b> MBA/S1 <b>(D)</b> PU/S1	120
<b>Imagen V.2</b> Micrografías TEM <b>(A)</b> MBA/S1 <b>(B)</b> p-MBA <b>(C)</b> MBA/S8 <b>(D)</b> PU/S1 <b>(E)</b> p-U <b>(F)</b> PU/S8	125
<b>Imagen VI.1 (A)</b> Imagen de los sistemas P/SLP/M5 conteniendo nanopartículas de platino <b>(B)</b> Imagen del sistema MBA/S1/Pt10, <b>(C)</b> Imagen de los sistemas P/SLP/M5 conteniendo nanopartículas de plata, <b>(D)</b> Imagen del sistema MBA/S1/Ag10	138
<b>Imagen VI.2</b> Micrografías TEM de los sistemas conteniendo nanopartículas de Platino <b>(A)</b> MBA/S1/Pt10, <b>(B)</b> MBA/S1/Pt5, <b>(C)</b> MBA/S8/Pt5, <b>(D)</b> PU/S1/Pt5, <b>(E)</b> PU/S8/Pt5	141
<b>Imagen VI.3</b> Micrografías TEM de los sistemas conteniendo nanopartículas de Plata <b>(A)</b> MBA/S1/Ag10, <b>(B)</b> MBA/S1/Ag5, <b>(C)</b> MBA/S8/Ag5, <b>(D)</b> PU/S1/Ag5, <b>(E)</b> PU/S8/Ag5	142
<b>Imagen VI.4</b> Imágenes TEM (izquierda-centro) y/o micrografías STEM-HAADF (medio), histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha)	144

de los sistemas conteniendo nanopartículas de platino: **(A)** MBA/S1/Pt5, **(B)** MBA/S8/Pt5, **(C)** PU/S1/Pt5, **(D)** PU/S8/Pt5

**Imagen VI.5** Imágenes TEM (izquierda), histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de Plata: **(A)** MBA/S1/Ag5, **(B)** MBA/S8/Ag5, **(C)** PU/S1/Ag5, **(D)** PU/S8/Ag5 145

**Imagen VI.6** Imágenes HR-TEM, transformada rápida de Fourier y patrones de difracción de área seleccionada (insertados) de los sistemas conteniendo nanopartículas de Platino: **(A)** MBA/S1/Pt5, **(B)** PU/S1/Pt5, **(C)** MBA/S8/Pt5, **(D)** PU/S8/Pt5 **(E)** Espectro EDS típicamente obtenido para estas muestras. 147

**Imagen VI.7** Imágenes HR-TEM, transformada rápida de Fourier y patrones de difracción de área seleccionada (insertados) de los sistemas conteniendo nanopartículas de Plata: **(A)** PU/S1/Ag5, **(B)** PU/S8/Ag5 **(C)** Espectro EDS típicamente obtenido para estas muestras. 148

**Imagen VII.1** Imágenes TEM (izquierda) e histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de Plata luego de ser utilizados como catalizadores en la reacción de estudio: **(A)** PU/S1/Pt5, **(B)** PU/S8/Ag5 174

**Imagen VII.2** Imágenes TEM (izquierda) e histogramas de distribución de tamaño de las nanopartículas (derecha) de los sistemas conteniendo nanopartículas de Platino luego de ser utilizados como catalizadores en la reacción de estudio: **(A)** MBA/S1/Pt5, **(B)** MBA/S8/Pt5, **(C)** PU/S1/Pt5, **(D)** PU/S8/Pt5 175

**Imagen VII.3** Imágenes HR-TEM, transformada rápida de Fourier (insertadas) y patrones de difracción de área seleccionada de los bionanocatalizadores luego de ser empleados en la reacción de estudio: **(A)** PU/S1/Pt5, **(B)** PU/S8/Pt5 **(C)** PU/S1/Ag5, **(D)** PU/S8/Ag5 177

## TABLAS

<b>Tabla III.1.</b> Formulación de las dispersiones poliméricas sintetizadas (cantidades expresadas en gramos)	69
<b>Tabla III.2.</b> Formulación de la dispersión acuosa poliuretánica sintetizada (cantidades expresadas en gramos)	70
<b>Tabla III.3.</b> Tamaño de las partículas, potencial Z y contenido de sólidos de las dispersiones sintetizadas	75
<b>Tabla III.4.</b> Asignación de las principales bandas de absorción en la región infrarroja de los polímeros sintetizados	77
<b>Tabla III.5.</b> Características de las dispersiones poliméricas determinadas por titulaciones conductimétricas.	80
<b>Tabla III.6.</b> Tamaño de partícula	82
<b>Tabla III.7.</b> Parámetros obtenidos para los ajustes de las curvas SAXS empleando el modelo <i>HardSpheres</i>	84
<b>Tabla III.8</b> Resumen de las propiedades de las partículas poliméricas	84
<b>Tabla IV.1</b> Principales parámetros de interés de las proteínas de capa-S empleadas	89
<b>Tabla IV.2</b> Formulación de los distintos buffers empleados	91
<b>Tabla IV.3</b> Asignación de las principales bandas de absorción en la región infrarroja de las proteínas de capa-S [Arrondo et al., 1993].	98
<b>Tabla IV.4</b> Asignación de las principales bandas de absorción en la región Amida I [Torii & Tasumi, 1996]	99
<b>Tabla V.1</b> Construcción de las Isotermas empleando proteínas de capa-S	114
<b>Tabla V.2</b> Parámetros obtenidos a partir del ajuste con el modelo de Langmuir-Freundlich.	117
<b>Tabla V.3</b> Parámetros obtenidos por DLS y potencial Z para las muestras polímero/proteína.	121
<b>Tabla V.4</b> Composición porcentual de la banda amida I, comparación proteínas libres y adsorbidas sobre los distintos sistemas	124
<b>Tabla V.5</b> Sistemas analizados por SAXS. POL representa a las partículas p-MBA y p-U, mientras que SLP representa a las proteínas S1 y S8	126
<b>Tabla V.10</b> Propiedades de los sistemas polímero/proteína obtenidas por modelado de curvas SAXS	130
<b>Tabla VI.1</b> Preparación de los bionanocatalizadores	136

<b>Tabla VI.2</b> Determinación del contenido metálico de los catalizadores.	139
<b>Tabla VI.3</b> Tamaño y dispersión de las nanopartículas metálicas	143
<b>Tabla VI.4</b> Parámetros obtenidos del ajuste de las curvas sin contribución del soporte para los sistemas denominados P/SLP/Pt5	150
<b>Tabla VII.1</b> Cantidades empleadas en los ensayos de desempeño catalítico de los catalizadores.	158
<b>Tabla VII.2</b> Actividad catalítica de los bionanocatalizadores en función de la cantidad de catalizador colocada $R\% = M/RVO$	163
<b>Tabla VII.3</b> Tamaño, dispersión y cambio en el tamaño de las nanopartículas metálicas presentes en los nanocatalizadores utilizados.	176
<b>Tabla VII.4.</b> Asignación de las principales bandas de absorción en la región infrarroja de los catalizadores utilizados en la reacción de reducción del <i>p</i> -nitrofenol	179
<b>Tabla Anexo II.</b> Conducta frente a la centrifugación	187
<b>Tabla Anexo III.1</b> Comparación de la bondad de ajuste de los modelos analizados	188
<b>Tabla Anexo III.2</b> Parámetros obtenidos a partir del ajuste con cada modelo.	190

## ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
AgNP	Nanopartícula de plata
ALB	Albúmina
ARG	Arginina
ASP	Ácido aspártico
BUA	Acrilato de n-butilo
CBB	Coomasie brilliant blue
DBTL	Dibutil dilaurato de estaño
DLS	Dispersión de luz dinámica
DMPA	Ácido dimetilpropiónico
EDL	Doble capa eléctrica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
FG	Fibrinógeno
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GLU	Ácido glutámico
HEMA	Metacrilato de 2-hidroxietilo
IG	Inmunoglobulina G
IPDI	Diisocianato de isoforona
KPS	Persulfato de potasio
LYS	Lisina
M	Metal
MA	Ácido metacrílico
MDEA	Dihidroxi N-alquilamonio
MFFT	Mínima temperatura para formación de films
MMA	Metacrilato de metilo

MNP	Nanopartícula metálica
MNPs	Nanopartícula metálica soportada
MSD	Distribución de la secuencia de monómeros
MWD	Distribución del peso molecular
P	Polímero
<i>p</i> -AP	<i>p</i> -aminofenol
PET	Tereftalato de polietileno
PI	Punto isoeléctrico
PLMA	Poli (laurilmetacrilato)
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
POL	Polímero
PPG	Polipropilenglicol
PtNP	Nanopartícula de platino
PU	Poliuretanos
PUD	Poliuretanos dispersables en agua
SAXS	Dispersión de rayos X a bajo ángulo
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SLD	Scattering length density
SLGP	Glicoproteínas de capa-S
SLP	Proteínas de capa-S
SSA	Área superficial específica
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TG	Temperatura de transición vítrea
TOF	Turnover Frequency

# IX

---

*Capítulo IX*

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### A

Abu-Reziq, R., Wang, D., Post, M., Alper, H. (2007) Platinum Nanoparticles Supported on Ionic Liquid-Modified Magnetic Nanoparticles: Selective Hydrogenation Catalysts. *Adv. Synth. Catal.* 349, 2145-2150

Adams, C.D., Cozzens, R.A. & Kim, B.J. (1997) Effects of ozonation on the biodegradability of substituted phenols. *Water Res.* 31,2655

Agut, W., Taton, D. & Lecommandoux, S. (2007) A versatile synthetic approach to polypeptide based rod-coil block copolymers by click chemistry. *Macromolecules.* 40, 5653

Aiken III, J.D. & Finke, R.G. (1999) A review of modern transition-metal nanoclusters: their synthesis, characterization, and applications in catalysis. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 145, 1-44

Akindoyo, J.O., Beg, M.D.H., Ghazali, S., Islam, M.R., Jeyaratnama, N., & Yuvarajc, A. R. (2016) Polyurethane types, synthesis and applications – a review. *RSC Adv.*, 6, 114453-114482

Albers, S.V. & Meyer, B.H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol.* 9, 414-426

Allen, S. J., Gan Q., Matthews R. & Johnson P.A. (2002) Comparison of optimised isotherm models for basic dye adsorption by kudzu. *Bioresour Technol.* 88(2):143-52.

Allievi, M.C., Sabbione F., Prado-Acosta M., Palomino M.M., Ruzal S.M. & Sanchez-Rivas, C.J. (2011) Metal Biosorption by Surface-Layer Proteins from Bacillus Species *Microbiol. Biotechnol.* 21, 147-153

Alshammari, A., Narayana Kalevaru, V. & Martin, A. (2016) Metal Nanoparticles as Emerging Green Catalysts, Chapter 1, En: Green Nanotechnology: Overview and Further Prospects. BoD-Books on Demand, M. Larramendy, S. Soloneski (Eds.) DOI, 10(63314)

American Chemical Society Report, Technology Vision (2020) the Chemical Industry, December 1996. [http://www/chemicalvision2020.com/pdfs/chem\\_vision.pdf](http://www/chemicalvision2020.com/pdfs/chem_vision.pdf).

Ami, D., Mereghetti, P. & Doglia, S.M. (2013) Chapter 10. Multivariate Analysis for Fourier Transform Infrared Spectra of Complex Biological Systems and Processes, in Multivariate Analysis in Management, Engineering and the Sciences, Leandro Valim de Freitas and Ana Paula Barbosa Rodrigues de Freitas, IntechOpen.

Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A., Longo, G. & Tufano, V.J. (2000) Photocatalytic oxidation of 4-nitrophenol in aqueous TiO<sub>2</sub> slurries: an experimental validation of literature kinetic models. *Chem. Technol. Biotechnol.* 75, 131

Arcangeli, J. P. & Arvin, E. (1995) Biodegradation rates of aromatic contaminants in biofilm reactors. *Water Sci. Technol.* 31, 117.

Ariga, K., & Azzaroni, O. (2022) What is Nanoarchitectonics: Origin and Task. In Concepts and Design of Materials Nanoarchitectonics (1-28). ISBN: 978-1-78801-961-3

Arrondo, J.L.R., Muga, A., Castresana, J. & Goñi, F.M. (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 59, 23-56.

Arun Kumar, K. V., John, J., Sooraj, T.R., Anu Raj, S., Unnikrishnan, N.V. & Selvaraj, N.B. (2017) Surface plasmon response of silver nanoparticles doped silica synthesised via sol-gel route. *Applied Surface Science*. 472, 40-45

Aono, M. & Ariga, K. (2016) The Way to Nanoarchitectonics and the Way of Nanoarchitectonics. *Adv. Mater.* 28, 989-992

Astruc, D. (2008) Nanoparticles and catalysis. Wiley, New York. ISBN: 978-3-527-31572-7

Asua, J.M. (2002) Miniemulsion Polymerization. *Prog. Polym. Sci.* 27, 1283-1346.

Asua, J.M. (2007) Chapter 6: Emulsion Polymerization in Polymer Reaction Engineering, Ed. Barandiaran, M.J. de la Cal, J.C. Asua, J.M. Blackwell

Åvall-Jääskeläinen, S. & Palva, A. (2005) Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 511-529

Avall-Jaaskelainen, S., Hynonen, U., Ilk, N., Pum, D., Sleytr, U.B. & Palva, A. (2008) Identification and characterization of domains responsible for self-assembly and cell wall binding of the surface layer protein of Lactobacillus brevis ATCC 8287. *BMC Microbiol* 8,165

## B

Bai, L., Zhang, S., Chen, Q. & Gao, C. (2017) Synthesis of Ultrasmall Platinum Nanoparticles on Polymer Nanoshells for Size-Dependent Catalytic Oxidation Reactions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 9710-9717.

Bagheri, S., Muhd Julkapli, N. & Bee Abd Hamid, S. (2014) Titanium dioxide as a catalyst support in heterogeneous catalysis. *Sci World J.* 1-21.

Ballauff, M. (2011) Analysis of Polymer Colloids by Small-Angle X-Ray and Neutron Scattering: Contrast Variation. *Advanced Engineering Materials*. 13, 793-802.

Barandiaran, M.J., De La Cal, J.C., Asua, J.M. (2007) Chapter 6: Emulsion Polymerization, in J.M. Asua, Ed., Polymer Reaction Engineering, Blackwell.

Barth, A. (2007) Infrared Spectroscopy of Proteins. *Biochim. et Biophys. Acta*,1767,1073-1101.

Bekale, L., Agudelo, D., Tajmir-Riahi, H.A. (2015) The Role of Polymer Size and Hydrophobic End-Group in PEG-Proteininteraction. *Colloids Surf., B* 130, 141-148.

Beller, M., Fischer, H., Kuehlein, K., Reisinger, C.P., Herrmann, W.A.J. (1996) First palladium-catalyzed Heck reactions with efficient colloidal catalyst systems. *Organomet. Chem.* 520, 257

Bergeret, G. & Gallezot, P. (2008) *Handbook of Heterogeneous Catalysis*

Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351

Bianchi, C., Porta, F., Prati, L. & Rossi, M. (2000) Selective liquid phase oxidation using gold catalysts. *Top. Catal.* 13, 231–236

Biella S., Porta F., Prati L. & Rossi M. (2003) Surfactant-Protected Gold Particles: New Challenge for Gold-on-Carbon Catalysts. *Catalysis Letters.* 90, 23-29

Bingwa, N., Ndolomingo, M.J., Noh, J.H., Antonels, N., Haumann, M., Meijboom, R. (n. f.) Synergistic effect of mesoporous transition metal oxides and Pt nanoparticles in aerobic oxidation of ethanol and ionic liquid induced selectivity.

Bingwa, N. & Meijboom, R. (2015) Evaluation of catalytic activity of Ag and Au dendrimer-encapsulated nanoparticles in the reduction of 4-nitrophenol. *J. Mol. Catal. A. Chem.* 396, 1-7

Blaser, H.U., Indolese, A., Schnyder, A., Steiner, H. & Studer, M.J. (2001) Supported palladium catalysts for fine chemicals synthesis. *Mol. Catal. A: Chem.* 173, 3

Bloch, K., Pardesi, K., Satriano, C., & Ghosh, S. (2021) Bacteriogenic platinum nanoparticles for application in nanomedicine. *Frontiers in Chemistry*, 9, 32.

Bradley, J.S. (1994) *Clusters and colloids*, ed. G. Schmid, VCH, Weinheim. 459

Bolla, P.A.; Huggias, S., Serradell, M.A.; Ruggera, J.F.; Casella, M.L. (2020)a Synthesis and Catalytic Application of Silver Nanoparticles Supported on Lactobacillus kefirii S-Layer Proteins. *Nanomaterials.* 10, 2322

Bolla, P.A.; Sanz, A.; Huggias, S.; Ruggera, J.F.; Serradell, M.A.; Casella, M.L. (2020)b Regular Arrangement of Pt Nanoparticles on S-Layer Proteins Isolated from Lactobacillus kefirii: Synthesis and Catalytic Application. *Mol. Catal.* 481, 110262

Bonini, M., Bardi, U., Berti, D., Neto, C. & Baglioni, P. (2002) A New Way to Prepare Nanostructured Materials: Flame Spraying of Microemulsions. *J. Phys. Chem. B.* 106, 6178–6183

Bonnemann, H., Braun, G., Brijoux, W., Brinkmann, R., Schulze Tilling, A. Seevogel, K. & Siepen, K. (1996) Nanoscale colloidal metals and alloys stabilized by solvents and surfactants Preparation and use as catalyst precursors. *J. Organomet. Chem.* 520, 143–162.

Boot, H.J., Kolen, C.P., Andreadaki, F.J., Leer, R.J. & Pouwels, P.H. (1996) The Lactobacillus acidophilus S-layer protein gene expression site comprises two consensus promoter sequences, one of which directs transcription of stable mRNA. *J. Bacteriol.* 178, 5388–94

Boudart, M. (1995) Turnover Rates in Heterogeneous Catalysis. *Chem. Rev.* 95, 661-666

Boyer, C., Bulmus V., & Davis, T.P. (2009) Efficient usage of thiocarbonates for both the production and the biofunctionalization of polymers. *Macromol. Rapid Commun.* 30, 493-497

Boyer, C., Huang, X., Whittaker, M.R., Bulmus, V. & Davis, T.P. (2011) An overview of protein-polymer particles. *Soft Matter.* 7, 1599-1614

Boyer, C., Liu, J., Bulmus, V., Davis T.P., Barner-Kowollik, C., & Stenzel, M.H. (2008) Direct Synthesis of Well-Defined Heterotelechelic Polymers for Bioconjugations. *Macromolecules.* 41, 5641-5650

Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.

Bravo-Suárez, J.J., Chaudhari, R.V. & Subramaniam, B. (2013) Design of Heterogeneous Catalysts for Fuels and Chemicals Processing: An Overview, in Novel Materials for Catalysis and Fuels Processing (3-68) ACS Symposium Series; American Chemical Society: Washington, DC

Budarin, V., Clark, J.H., Luque, R., Macquarrie, D.J. & White, R. J. (2008) Palladium nanoparticles on polysaccharide-derived mesoporous materials and their catalytic performance in C-C coupling reactions. *Green Chem.* 10, 382-387

Buceta, D., Piñeiro, Y., Vazquez-Vazquez, C., Rivas, J., Lopez-Quintela, M. (2014) Metallic Clusters: Theoretical Background, Properties and Synthesis in Microemulsions. *Catalysts.* 4, 356-374.

Byler, D.M. & Susi H. (1986) Examination of the Secondary Structure of Proteins by Deconvolved FTIR Spectra. *Biopolymers.* 25, 469-487

## C

Cai, K., Bossert, J. & Jandt, K.D. (2006) Does the nanometer scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation? *Coll. Surf. B.* 49, 136-144

Campelo, J.M., Conesa, T.D., Gracia, M.J., Jurado, M.J., Luque, R. Marinas J.M. & Romero A.A. (2008) Microwave facile preparation of highly active and dispersed SBA-12 supported metal nanoparticles. *Green Chem.* 10, 853-858

Campelo, J.M., Lee, A.F., Luna, D., Luque, R., Marinas, J.M. & Romero, A.A. (2008) Preparation of Highly Active and Dispersed Platinum Nanoparticles on Mesoporous Al-MCM-48 and Their Activity in the Hydroisomerisation of n- Octane. *Chem.-Eur. J.* 14, 5988-5995

Carmona-Ribeiro, A.M. (2003) Bilayer-Forming Synthetic Lipids: Drugs or Carriers? *Curr. Med. Chem.* 10, 2425-2446.

Castells, V. & van Tassel, P.R. (2005) Conformational transition free energy profiles of an adsorbed, lattice model protein by multicanonical Monte Carlo simulation. *J. Chem. Phys.* 122, 4707-47

Casu, B., & Gennaro, U. (1975) A conductimetric method for the determination of sulphate and carboxyl groups in heparin and other mucopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, 39, 168-176

Catalyst Business, Chem. Week (2004)

Catlow, C.R., Davidson, M., Hardacre, C. & Hutchings, G.J. (2016) Catalysis making the world a better place. *Phil. Trans. R. Soc. A* 374, 20150089

Cavallero, G.J., Malamud, M., Casabuono, A.C., Serradell, M.A. & Couto, A.S. (2017) A glycoproteomic approach reveals that the S-layer glycoprotein of *Lactobacillus kefir* CIDCA 83111 is O- and N-glycosylated. *Journal of Proteomics*. 162, 20–29

Castells, V. & van Tassel, P.R. (2005) Conformational transition free energy profiles of an adsorbed, lattice model protein by multicanonical Monte Carlo simulation. *J. Chem. Phys.* 122, 4707-4716

Chaki, N.K., Tsunoyama, H., Negishi, Y., Sakurai, H. & Tsukuda, T. (2007) Effect of Ag-doping on the catalytic activity of polymer-stabilized Au clusters in aerobic oxidation of alcohol. *J Phys Chem C*. 111, 4885–4888

Charlon, M., Heinrich, B., Matter, Y., Couzigne, E., Donnio, B. & Averous, L. (2014) Synthesis, structure and properties of fully biobased thermoplastic polyurethanes, obtained from a diisocyanate based on modified dimer fatty acids, and different renewable diols. *Eur. Polym. J.* 61, 197-205

Che, M. & Bennett, C.O. (1989) The Influence of Particle Size on the Catalytic Properties of Supported Metals. *Adv. Catal.* 36, 55–172

Chen, A. & Holt-Hindle, P. (2010) Platinum-Based Nanostructured Materials: Synthesis, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* 110, 3767-3804

Chen, G., Sciortino, F. & Ariga, K. (2020) Atomic Nanoarchitectonics for Catalysis. *Adv. Mater. Interfaces*. 2001395

Chen, J.H. & Seeman, N.C. (1991) Synthesis from DNA of a molecule with the connectivity of a cube. *Nature* 350, 631-3

Chen, D.; & Ray, A.K. (1998) Photodegradation kinetics of 4-nitrophenol in TiO<sub>2</sub> suspension. *Water Res.* 32, 3223

Cheng, D., Jin, W., Zhan, X. & Chen, F. (2016) Alumina membrane coated activated carbon: a novel strategy to enhance the mechanical properties of a solid catalyst. *RSC Adv.* 6, 10229-10232

Chern, J.M. & Chien, Y.W. (2002) Adsorption of nitrophenol onto activated carbon: isotherms and breakthrough curves. *Water Res.* 36, 647-655

Choi, H., Al-Abed, S.R., Agarwal, S. & Dionysiou, D.D. (2008) Synthesis of Reactive Nano-Fe/Pd Bimetallic System-Impregnated Activated Carbon for the Simultaneous Adsorption and Dechlorination of PCBs. *Chem. Mater.* 20, 3649-3655

Choudary, B.M., Roy, M., Roy, S., Kantam, L. M., Jyothi, K. & Sreedhar, B. (2005) Layered Double Hydroxide Supported Nanoplatinum and Nanopalladium Catalyzed Allylation of Aldehydes: A Mechanistic Study. *Adv. Synth. Catal.* 347, 2009–2014.

Chun-Jiang, J. & Schuth, F. (2011) Colloidal metal nanoparticles as a component of designed catalyst. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 2457-2487

Corma A. & Serna, P. (2006) Chemoselective hydrogenation of nitro compounds with supported gold catalysts. *Science.* 313,332-334

Cornils, B. & Herrmann, W.A. (2003) Concepts in homogeneous catalysis: the industrial view. *Journal of Catalysis.* 216,23–31

Cushing, B.L. Kolesnichenko, V.L. & O'Connor, C. J. (2004) Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chem. Rev.* 104, 3893–3946.

## D

de Moraes, M.C., Cardoso, C.L., & Cass, Q.B. (2019) Solid-supported proteins in the liquid chromatography domain to probe ligand-target interactions. *Frontiers in Chemistry*, 752

de Oliveira, P.F.M., Torresi, R.M., Emmerling & Camargo, P.H.C. (2020) Challenges and opportunities in the bottom-up mechanochemical synthesis of noble metal nanoparticles. *J. Mater. Chem. A.* 8, 16114-16141

de Poel, W., Mühninghoff, J. A., Elemans, J. A., Van Enkevort, W. J., Rowan, A. E., & Vlieg, E. (2018) Surfaces with Controllable Topography and Chemistry Used as a Template for Protein Crystallization. *Crystal growth & design*, 18, 763-769.

Delcea, M., Krastev, R., Gutberlet, T., Pum, D., Sleytr U.B. & Toca-Herrera J.L. (2008) Thermal stability, mechanical properties and water content of bacterial protein layers recrystallized on polyelectrolyte multilayers. *Soft Matter.* 4, 1414–1421

Delpech, M.C. (1996) “Síntese e caracterização de poliuretanos obtidos como dispersões acuosas”. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dieluweit, S., Pum, D. & Sleytr, U.B. (1998) Formation of a gold superlattice on an S-layer with square lattice symmetry. *Supramol Sci.* 5,15–24

Dieluweit, S., Pum, D. Sleytr, U.B. & Kautek, W. (2005) Monodisperse gold nanoparticles formed on bacterial crystalline surface layers (S-layers) by electroless deposition. *Materials Science and Engineering C.* 25, 727

Díez, I. & Ras, R.H.A. (2011) Fluorescent silver nanoclusters. *Nanoscale.* 3,1963-70

Dimitratos, N., Lopez-Sanchez, J.A., Anthonykutti, J.M., Brett, G., Carley, A.F., Tiruvalam, R.C., Herzing, A.A., Kiely, C.J., Knight, D.W. & Hutchings, G.J. (2009) Oxidation of glycerol using gold–palladium alloy-supported nanocrystals. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 4952–4961

Droumaguet, B.L. & Velonia, K. (2008) In Situ ATRP-Mediated Hierarchical Formation of Giant Amphiphile Bionanoreactors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47, 6263-6266

Dominguez-Dominguez, S., Arias-Pardilla, J., Berenguer-Murcia, A., Morallon, E. & Cazorla-Amoros, D.J. (2008) Electrochemical deposition of platinum nanoparticles on different carbon supports and conducting polymers. *Appl. Electrochem.* 38, 259–268.

Dong, X.Y., Gao, Z.W., Yang, K.F., Zhang, W.Q. & Xu, L.W. (2015) Nanosilver as a new generation of silver catalysts in organic transformations for efficient synthesis of fine chemicals. *Catal. Sci. Technol.* 5, 2554–2574.

Doucet, M., Cho, J.H., Alina, G., Attala, Z., Bakker, J., Bouwman, W., ... (2021) Washington, Adam. SasView version 5.0.4. Zenodo.

Downing, R.S., Kunkeler, P.J. & van Bekkum, H. (1997) Catalytic syntheses of aromatic amines. *Catalysis Today.* 37, 121-136

Du, Y., Chen, H., Chen, R. & Xu, N. (2004) Synthesis of p-aminophenol from p-nitrophenol over nanosized nickel catalysts. *Applied Catalysis A: General.* 277, 259–264

## E

Elemike, E.E., Onwudiwe, D.C., Nundkumar, N., Singh, M., & Iyekowa, O. (2019) Green synthesis of Ag, Au and Ag-Au bimetallic nanoparticles using Stigmaphyllon ovatum leaf extract and their in vitro anticancer potential. *Materials Letters.* 243, 148-152

Esumi K., Isono R., & Yoshimura T. (2004) Preparation of PAMAM– and PPI–Metal (Silver, Platinum, and Palladium) Nanocomposites and Their Catalytic Activities for Reduction of 4-Nitrophenol. *Langmuir.* 20, 237-243

Exaly- <https://exaly.com/trends/?q=nanomaterial>

## F

Fournier, R.L. (1999) Solute transport in biological systems. In Basic Transport Phenomena in Biomedical Engineering; Taylor & Francis: Washington, DC, USA. ISBN: 9781315120478

Freeman, A. (2017) Protein-mediated biotemplating on the nanoscale. *Biomimetics*, 2, 14

Freundlich, H. (1906) Adsorption in solution. *Phys. Chemie.* 57, 384–410

Frieden, C. (2007) Protein aggregation processes: In search of the mechanism *Protein Science.* 16, 2334–2344

Fu, Y. & Viraraghavan, T. (2001) Fungal Decolorization of dye Wastewaters: a Review. *Bioresour. Technol.* 79, 251-262

## G

Galli, C., Coen, M.C., Hauert, R., Katanaev, V.L., Gröning, P. & Schlapbach, L. (2002) Creation of nanostructures to study the topographical dependency of protein adsorption. *Coll. Surf. B.* 26, 255–267

Gamucci, O., Bertero, A., Gagliardi, M. & Bardi, G. (2014) Biomedical nanoparticles: overview of their surface immunocompatibility. *Coatings.* 4, 139-159.

Ganesan, M., Freemantle, R.G. & Obare, S.O. (2007) Monodisperse Thioether-Stabilized Palladium Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Reactivity. *Chem. Mater.* 19, 3464-3471

Gangoiti, M.V., & Peruzzo, P.J. (2020) Cellulose nanocrystal reinforced acylglycerol-based polyurethane foams. *Polymer Letters.* 14, 638-650.

Gangula, A.; Podila, R., Ramakrishna, M., Karanam, L., Janardhana, C. & Rao, A.M. (2011) Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol Using Biogenic Gold and Silver Nanoparticles Derived From *Breynia Rhamnoides*. *Langmuir.* 27, 15268–15274

Garrote, G.L., Delfederico, L., Bibiloni, R., Abraham, A.G., Perez P.F., Semorile, L., & De Antoni, G.L. (2004) Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer proteins. *Journal of Dairy Research* 71, 222–230

Gawande, M.B., Guo, H., Rathi, A.K., Branco, P.S., Chen, Y., Varma, R.S. & Peng, D.L. (2013) First application of core-shell Ag@Ni magnetic nanocatalyst for transfer hydrogenation reactions of aromatic nitro and carbonyl compounds. *RSC Adv.* 3, 1050–1054

Gazit, E. (2007) Use of biomolecular templates for the fabrication of metal nanowires. *The FEBS journal.* 274, 317-322

Ge, J., Yan, M., Lu, M., Zhang, M. & Liu, Z. (2007) Hyperbranched polymer conjugated lipase with enhanced activity and stability. *Biochem. Eng. J.* 36, 93-99

Gedanken, A. (2004) Using sonochemistry for the fabrication of nanomaterials. *Ultrasonics Sonochemistry.* 11, 47-55

Gerbino, O.E. (2013) Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, níquel y zinc: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular. Trabajo De Tesis Doctoral

Glaspell, G., Fuoco, L. & El-Shall, M.S. (2005) Microwave Synthesis of Supported Au and Pd Nanoparticle Catalysts for CO Oxidation. *J. Phys. Chem. B.* 109, 17350-17355

Glaspell, G. Hassan, H.M.A., Elzatahry, A., Abdalsayed, V. & El-Shall, M.S. (2008) Nanocatalysis on Supported Oxides for CO Oxidation. *Top. Catal.* 47, 22–31

Glatter, O. & Kratky, O. Eds. (1983) "Small Angle X-ray Scattering". Second print. Academic Press Inc. Londres

Glassford, S.E., Byrne, B. & Kazarian, S.G. (2013) Recent Applications of ATR FTIR Spectroscopy and Imaging to Proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1834, 2849–2858.

Groot, I.M.N. (2021) Investigation of Active Catalysts at Work. *Acc. Chem. Res.* 23, 4334–434

Gruian, C., Vanea, E., Simon, S. & Simon, V. (2012) FTIR and XPS studies of protein adsorption onto functionalized bioactive glass. *Biochimica et Biophysica Acta* 1824, 873–881

Goi, A. & Trapido, M. (2002) Hydrogen peroxide photolysis, Fenton reagent and photo-Fenton for the degradation of nitrophenols: a comparative study. *Chemosphere*. 46, 913

Gomes, H.T., Samant, P.V., Serp, P., Kalck, P., Figueiredo, J.L. & Faria, J.L. (2004) Carbon nanotubes and xerogels as supports of well-dispersed Pt catalysts for environmental applications. *Appl. Catal. B. Environ.* 54,175–182

Gomez, C.G., Pastrana, G., Serrano, D., Zuzek, E., Villar, M.A. & Strumia, M.C. (2012) Macroporous poly (EGDMA-co-HEMA) networks: Morphological characterization from their behavior in the swelling process. *Polymer*. 53, 2949

González L., Asua J.M., & Leiza, J.R. (2007) The role of methyl methacrylate on branching and gel formation in the emulsion copolymerization of BAmMA. *Polymer*. 48, 2542-2547

Gonzalez, V.D.G., Gugliotta, L.M. & Meira, G.R. (2008). Latex of immunodiagnosis for detecting the Chagas disease I. Synthesis of the base carboxylated latex. *J Mater Sci: Mater. Med.* 19, 777–788.

Goswami, N., Saha, R., & Pal, S.K. (2011) Protein-assisted synthesis route of metal nanoparticles: exploration of key chemistry of the biomolecule. *Journal of Nanoparticle Research*. 13, 5485-5495.

Gu, A., Wunder, S., Lu, Y. & Ballauff (2014) Kinetic Analysis of the Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by metallic Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* 118, 18618–18625

Guella, G., Patton, B. & Miotello, A. (2007) Kinetic Features of the Platinum Catalyzed Hydrolysis of Sodium Borohydride from <sup>11</sup>B NMR Measurements. *The Journal of Physical Chemistry C*. 111, 18744-18750

Guinier, A. F. & Fournet, G. (1955) Small Angle Scattering of X rays. Wiley: New York

Gurav, J.L., Jung, I.K., Park, H.H., Kang, E.S. & Nadargi, D.Y. (2010) Silica aerogel: synthesis and applications. *J. Nanomater.* 1,11

Gyorvary, E., Schroedter, A., Talapin, D.V., Weller, H., Pum, D., & Sleytr, U.B. (2004) Formation of nanoparticle arrays on S-layer protein lattices. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 4,115–20

## H

Haber, J., Block, J.H. & Delmon, B. (1995) Manual of methods and procedures for catalyst characterization (Technical Report). *Pure Appl Chem.* 67,1257-1306

Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010) Cellulose nanocrystals: chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical reviews.* 110, 3479-3500

Habibullah, G., Viktorova, J., & Ruml, T. (2021) Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. *Nanoscale Research Letters.* 16, 1-12.

Hagen, K.E., Guan L.L., Tannock, G.W., Korver, D.R. & Allison, G.E. (2005) Detection, characterization, and in vitro and in vivo expression of genes encoding S-proteins in *Lactobacillus gallinarum* strains isolated from chicken crops. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6633-43

Haghsereht, F. & Lu, G. Q. (1998) Adsorption Characteristics of Phenolic Compounds onto Coal-Reject-Derived Adsorbents. *Energy Fuels.* 6, 1100-1107

Hall, S.R., Shenton, S., Engelhardt, H., Mann, S. (2001) Site-Specific Organization of Gold Nanoparticles by Biomolecular Templating. *Chem. Phys. Chem.* 2, 184-186

Han, M., Sethuraman, A., Kane, R.S. & Belfort, G. (2003) Nanometer-scale roughness having little effect on the amount or structure of adsorbed protein. *Langmuir.* 19, 9868–9872

Hartvig, R.A., van der Weert, M., Østergaard, J., Jorgensen, L. & Jensen, H. (2011) Protein adsorption at charged surfaces: The role of electrostatic interactions and interfacial charge regulation. *Langmuir.* 27, 2634–2643

Haruta, M., Tsubota, S., Kobayashi, T., Kageyama, T., & Genet, M.J. (1993) Low-Temperature Oxidation of CO over Gold Supported on TiO<sub>2</sub>, α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. *J. Catal.* 144, 175-192

Harvey, A.G., Hill, E.W. & Bayat, A. (2013) Designing implant surface topography for improved biocompatibility. *Expert review of medical devices.* 10, 257-267.

Hasan, K.M.F., Wang, H., Mahmud, S., Jahid, M.A., Islam, M., Jin, W. & Genyang, C. (2020) Colorful and antibacterial nylon fabric via in-situ biosynthesis of chitosan mediated nanosilver. *J. Mater. Res. Technol.* 9,16135–16145

Hayakawa K., Yoshimura T., & Esumi K. (2003) Preparation of Gold–Dendrimer Nanocomposites by Laser Irradiation and Their Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol. *Langmuir.* 19, 5517-5521

Haynes, C.A. & Norde, W. (1994)a Globular proteins at solid/liquid interfaces. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 2, 517

- Haynes, C.A., Sliwinsky, E., Norde, W. (1994)<sup>b</sup> Structural and electrostatic properties of globular proteins at a polystyrene-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* 164, 394
- He, L., Lin, Q., Liu, Y. & Huang, Y. (2014) Unique catalysis of Ni–Al hydrotalcite derived catalyst in CO<sub>2</sub> methanation: cooperative effect between Ni nanoparticles and a basic support. *J Energy Chem.* 23,587-592
- He, D., Sun, W., Schrader, T. & Ulrich, M. (2009) Protein adsorbers from surface-grafted copolymers with selective binding sites. *J. Mater. Chem.* 19, 253-260
- Hemalatha, K., Madhumitha, G., Kajbafvala, A., Anupama, N., Sompalle, R. & Roopan, S.M. (2013) "Function of nanocatalyst in chemistry of organic compounds revolution: An overview," *Journal of Nanomaterials.* 4,4
- Herrera-Melián, J.A., Martín-Rodríguez, A.J., Ortega-Méndez, A., Araña, J., Doña-Rodríguez, J.M. & Pérez-Peña, J. (2012) Degradation and detoxification of 4-nitrophenol by advanced oxidation technologies and bench-scale constructed wetlands. *Journal of Environmental Management.* 105, 53-60
- Hervés, P., Pérez-Lorenzo, M., Liz-Marzán, L.M., Dzubiella, J., Lu, Y. & Ballauff, M. (2012) Catalysis by metallic nanoparticles in aqueous solution: model reactions. *Chem. Soc. Rev.* 41, 5577–5587
- Ho, Y.S. (2006) Isotherms for the Sorption of Lead onto Peat: Comparison of Linear and Non-Linear Methods. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 81–86
- Holbrook, K., & Twist, P. (1971) Hydrolysis of the borohydride ion catalysed by metal–boron alloys. *J. Chem. Soc. A: Inorg. Phys. Theor.* 890–894.
- Honarkar, H. (2017) Waterborne Polyurethanes: A Review. *Journal of Dispersion Science and Technolog.* 39, 507-516
- Hood, M.A., Mari, M. & Muñoz-Espí, R. (2014) Synthetic Strategies in the Preparation of Polymer/Inorganic Hybrid Nanoparticles. *Materials.* 7, 4057-4087
- Horbett, T.A. & Brash, J.L. (1987) Proteins at interfaces: Current issues and future prospects. *ACS Symp. Ser.* 343, 1-33
- Hori, K., Matsune, H., Takenaka, S. & Kishida, M. (2006) Preparation of silica-coated Pt metal nanoparticles using microemulsion and their catalytic performance. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 7,678-684
- Hoseini, S.J., Rashidib, M. & Bahrami, M. (2011) Platinum nanostructures at the liquid–liquid interface: catalytic reduction of p-nitrophenol to p-aminophenol. *J. Mater. Chem.* 21, 16170
- Hoshino, Y., Lee, H. & Miura Y. (2014) Interaction Between Synthetic Particles and Biomacromolecules: Fundamental Study of Nonspecific Interaction and Design of Nanoparticles that Recognize Target Molecules. *Polym. J.* 46, 537-545

Hu, X., Zhang, Y., Ding, T., Liu, J., & Zhao, H. (2020) Multifunctional gold nanoparticles: a novel nanomaterial for various medical applications and biological activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 990.

Hutchings, G.J. (2008) Nanocrystalline gold and gold palladium alloy catalysts for chemical synthesis. *Chem. Commun.* 1148-1164

## I

Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S.V. & Zolfaghari, B. (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods, *Res. Pharm. Sci.* 9, 385

Irusta, L. & Fernández-Berridi, M.J. (1999) “Aplicación de la espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier al estudio de recubrimientos de poliuretano”. *Rev. Plást. Mod.* 78, 245-251.

Irvine, W.M. (2011) Langmuir-Hinshelwood Mechanism. In: *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Ismail, E.A., Motawie, A. & Sadek, E. (2011) Synthesis and characterization of polyurethane coatings based on soybean oil–polyester polyols. *Egypt. J. Pet.* 20, 1-8

Iturri, J., Vianna, A.C., Moreno-Cencerrado, A., Pum, D., Sleytr, U.B. & Toca-Herrera, J.L. (2017) Impact of surface wettability on S-layer recrystallization: a real-time characterization by QCM-D *Beilstein J. Nanotechnol.* 8, 91–98.

Iwasaki, Y., Nakabayashi, N. & Ishihara, K. (2006) Nonbiofouling surfaces generated from phosphorylcholine-bearing polymers. In *Proteins at Solid-Liquid Interfaces*; Springer-Verlag: Berlin, Germany. 229–326

## J

Jackson, M. & Mantsch, H.H. (1995) The Use and Misuse of FTIR Spectroscopy in the Determination of Protein Structure, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 2, 95-120

Jeyaraj, A., Gurunathan, S., Qasim, M., Kang, M. H., & Kim, J. H. (2019) A Comprehensive Review on the Synthesis, Characterization, and Biomedical Application of Platinum Nanoparticles, *Nanomaterials.* 9.

Jiang, Z.J., Liu, C.Y. & Sun, L.W (2005) Catalytic properties of silver nanoparticles supported on silica spheres. *J Phys Chem B.* 109,1730–1735

## K

Kaminski, A. & Urban, M. (1997) “Interfacial studies of crosslinked urethanes: part II. The effect of humidity on waterborne polyurethanes; an spectroscopy study”. *J Coat Technol.* 69, 113-121.

Kant, R., Paulin, L., Alatalo, E., de Vos, W.M. & Palva, A. (2011) Genome sequence of *Lactobacillus amylovorus* GRL1112. *J Bacteriol.* 193, 789–90

Kantam, M.L., Chakravarti, R., Pal, U., Sreedhar, B. & Bhargava, S. (2008) nanocrystalline magnesium oxide-stabilized palladium (0): an efficient and reusable catalyst for selective reduction of nitro compounds. *Adv Synth Catal.* 350,822-827

Kappe, C.O. (2008) Microwave dielectric heating in synthetic organic chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 37,1127-1139

Kapoor, A. & Yang, R.T. (1989) Correlation of equilibrium adsorption data of condensable vapours on porous adsorbents. *Gas Sep. Purif.* 3, 187-192.

Karlsson, L.M., Schubert, M., Ashkenov, N. & Arwin, H. (2004) Protein adsorption in porous silicon gradients monitored by spatially-resolved spectroscopic ellipsometry. *Thin Solid Films.* 726, 455-456

Kato, K., Sano, S. & Ikada, Y. (1995) Protein adsorption onto ionic surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 221-230

Kawata, T., Masuda, K., Yoshino, K. & Fujimoto M. (1974) Regular array in cell wall of *Lactobacillus fermenti* as revealed by freeze-etching and negative staining. *Jpn J Microbiol.* 18, 469–76

Kauppinen, J. K., Moffatt, D. J. Mantsch, H. H. & Cameron, D. G. (1981) Noise in Fourier self-deconvolution. *Appl. Spectrosc.* 35, 271 -276

Kaur, B., Pandiyanb, T., Satpati, B., Srivastava, R. (2013) Simultaneous and sensitive determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid, and tryptophan with silver nanoparticles-decorated reduced graphene oxide modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 111, 97–106

Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry.* 12, 908-931

Kim, J.H. & Yoon, J.Y. (2002) Protein Adsorption on Polymer Particles *Encyclopedia of Surface and Colloid Science.* 4373-4381

Kim, B.C., Nair, S., Kim, J., Kwak, J.H., W., Grate, J. Kim, S.H., & Gu, M.B. (2005) Preparation of biocatalytic nanofibres with high activity and stability via enzyme aggregate coating on polymer nanofibres. *Nanotechnology.* 16, S382–S388

Kozuch, S. & Martin, J.M. L. (2012) “Turning Over” Definitions in Catalytic Cycles. *ACS Catal.* 2, 2787–2794

Králik, M., Corain, B. & Zecca, M. (2000) Catalysis by Metal Nanoparticles Supported on Functionalized Polymers. *Chem. Papers.* 4, 254-264.

Król, P. & Król, B. (2020) Structures, properties and applications of the polyurethane ionomers. *J Mater Sci.* 55, 73-87

Kumar, N., & Kumbhat, S. (2016) Carbon-based nanomaterials. Essentials in nanoscience and nanotechnology. John Wiley & Sons.

Kumar, N.A., Santhosh, C., Sudakaran, S.V., Deb, A., Raghavan, V., Venugopal, V., Bhatnagar, A., Bhat, S. & Andrews N.G. (2018) Electrospun polyurethane and soy protein nanofibres for wound dressing applications. *IET Nanobiotechnol.*12, 94-98

Kushwaha, A. K., Gupta, N., & Chattopadhyaya, M. C. (2017) Dynamics of adsorption of Ni (II), Co (II) and Cu (II) from aqueous solution onto newly synthesized poly [N-(4-[4-(aminophenyl) methylphenylmethacrylamide])]. *Arabian Journal of Chemistry.* 10, 1645-S1653

## L

Laemmli, K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685

Lai T. L., Yong K.F., Yu J.W., Chen J.H., Shu Y.Y. & Wang C.B. (2011) High efficiency degradation of 4-nitrophenol by microwave-enhanced catalytic method. *J Hazard Mater.* 185, 366-372

Lakatos, M., Matys, S., Raff, J. & Pompe, W. (2015) Colorimetric As (V) detection based on S-layer functionalized gold nanoparticles. *Talanta.*144, 241–246

Lange, J., Price, R., Ayoub, P.M., Louis, J., Petrus, L., Clarke, L., Gosselink, H. (2010) Valeric biofuels: a platform of cellulosic transportation fuels. *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 4479–4483

Langmuir, I. (1918) Adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* 40, 1361–1403

Lee, I., Morales, R., Albiter, M. A. & Zaera, F. (2008) Synthesis of heterogeneous catalysts with well shaped platinum particles to control reaction selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 15241–15246

Lee, W.K., McGuire, J. & Bothwell, M.K. (2004) Competitive adsorption of bacteriophage T4 lysozyme stability variants at hydrophilic glass surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 269, 251–25439

Lewis, S.P., Lewis, A.T. & Lewis, P.D. (2013) FTIR Prediction of Glycoprotein Secondary Structure using ATR-FTIR. *Vib. Spectrosc.* 69, 21-29.

Li, Y. & El-Sayed, M.A. (2001) The Effect of Stabilizers on the Catalytic Activity and Stability of Pd Colloidal Nanoparticles in the Suzuki Reactions in Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B.* 105, 8938–8943

Li, Y., Hong, X.M., Collard, D.M. & El-Sayed, M.A. (2000) Suzuki cross-coupling reactions catalyzed by palladium nanoparticles in aqueous solution. *Org. Lett.* 2, 2385

Li, G., Liu, L., Sun, Y. & Liu, H. (2018) Ecofriendly synthesis of silver–Carboxy methyl cellulose nanocomposites and their antibacterial activity. *J. Clust. Sci.* 29,1193-1199

Liao, G., Zhao, W., Li, Q., Pang, Q. & Xu, Z. (2017) Novel Poly(acrylic acid)-modified Tourmaline/Silver Composites for Adsorption Removal of Cu(II) ions and Catalytic Reduction of Methylene Blue in Water. *Chem. Lett.* 46, 1631–1634.

Lin, H.X., Chen, L., Liu, D. Y., Lei, Z. C., Wang, Y., Zheng, X. S., ... & Tian, Z.Q. (2015) Constructing two-dimensional nanoparticle arrays on layered materials inspired by atomic epitaxial growth. *Journal of the American Chemical Society.* 137, 2828-2831

Liu, B.H. & Li, Z.P. (2009) A review: Hydrogen generation from borohydride hydrolysis reaction. *Journal of Power Sources.* 187, 527-534

Liu, L., Pippel, E., Scholz, R. & Go, U. (2009) Nanoporous Pt– Co alloy nanowires: fabrication, characterization, and electrocatalytic properties. *Nano Lett.* 9, 4352

Liu, X., Guo, Y., Xu, W., Wang, Y., Gong, X., Guo, Y., Guo, Y. & Lu, G. (2011) Catalytic properties of Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts in the aqueous-phase reforming of ethylene glycol: effect of the alumina support. *Kinet. Catal.* 52,817-822

Liu, J., Falke, S., Drobot, B., Oberthuer, D., Kikhney, A., Guenther, T., Fahmy, K., Svergun, D., Betzel, C., Raff, J. (2016) Analysis of self-assembly of S-layer protein slp-B53 from *Lysinibacillus sphaericus*, *Eur. Biophys. J.* 46,77-89

Liu, X., Zhao, X., Zhu, L., Liu, N., Tian, T. (2018) Palladium nanoparticles covered on amine-functionalized mesoporous hollow SiO<sub>2</sub> spheres for the reduction of 4-nitrophenol. *Catal. Lett.* 148,173-180

López, A.E., Pum, D., Sleytr, U.B. & Toca-Herrera, J.L. (2011) Influence of surface chemistry and protein concentration on the adsorption rate and S-layer crystal formation. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 11905–11913

Lord, M.S., Foss, M. & Besenbacher, F. (2010) Influence of nanoscale surface topography on protein adsorption and cellular response: A review. *Nano Today.* 5, 66-78

Lortal, S., Vanheijenoort, J., Gruber, K. & Sleytr, U.B. (1992) S-Layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithiumchloride. *J. Gen. Microbiol.* 138,611–8

Lovell, P.A. & Schork F.J. (2020) Fundamentals of Emulsion Polymerization. *Biomacromolecules.* 21, 4396-4441

Lundström, I. (1985) Models of protein adsorption on solid surfaces. *Prog. Coll. Polym. Sci.* 70, 76-82

## M

MacDonald, D., Deo, N. Markovic, B. Stranick, M., & Somasundarana, P. (2002) Adsorption and dissolution behavior of human plasma fibronectin on thermally and chemically modified titanium dioxide particles. *Biomaterials.* 23, 1269-1279.

Madhurantakam, C., Howorka, S., & Remaut, H. (2014) Chapter 2: S-layer Structure in Bacteria and Archaea in *Nanomicrobiology* L.L. Barton et al. (eds.) (11-37)

Makshina, E.V., Canadell, J., van Krieken, J., Peeters, E., Dusselier, M. & Sels B. F. (2019) Bio-Acrylates Production: Recent Catalytic Advances and Perspectives of the Use of Lactic Acid and Their Derivates. *Chem. Cat. Chem.* 11, 180–201

Malamud, M., Carasi, P., Bronsoms, S., Trejo, S. A., Serradell, M. (2017) Lactobacillus kefir shows inter-strain variations in the amino acid sequence of the S-layer proteins. *Antonie van Leeuwenhoek.* 110, 515–530

Malamud, M. (2019). Proteínas superficiales de bacterias lácticas con potencialidad biotecnológica: estudios estructurales y funcionales de las proteínas de capa S de Lactobacillus kefir. Trabajo De Tesis Doctoral

Malamud, M., Cavallero, G., Casabuono, A.C., Lepenies, B., Serradell, M.A. & Couto, A.S. (2020) Immunostimulation by Lactobacillus kefir S-layer proteins with distinct glycosylation patterns requires different lectins partners. *Journal of Biological Chemistry.* 295,14430-14444

Malek, A. & Farooq, S. (1996) Comparison of Isotherm Models for Hydrocarbon Adsorption on Activated Carbon. *AIChE Journal.* 42, 3191-3201

Malemsten, M. (1998) Formation of adsorbed protein layers. *J. Colloid Interface Sci.* 207, 186-199

Malhotra, S.P.K., & Alghuthaymi, M.A. (2022) Biomolecule-assisted biogenic synthesis of metallic nanoparticles. *Agri-Waste and Microbes for Production of Sustainable Nanomaterials.* 139-163

Mallat, T., Brönnimann, C. & Baiker, A. (1997) Oxidation of l-sorbose with molecular oxygen on platinum modified by metals, amines and phosphines, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical.* 117,425-438

Mangold, M.A., Holleitner, A.W., Agustsson, J.S., & Calame, M. (2016) Nanoparticle arrays. *Journal: Handbook of Nanoparticles.* 565-601

Manthiram, A., Murugan, A.V., Sarkar, A. & Muraliganth, T. (2008) Nanostructured electrode materials for electrochemical energy storage and conversion. *Energy Environ. Sci.* 1, 621

Manzer, L.E. (2004) Catalytic synthesis of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -valerolactone: a biomass-derived acrylic monomer. *Appl. Catal. A. Gen* 272, 249-256

Jacinto, M.J., Kiyohara, P.K., Masunaga, S.H., Jardim, R.F. & Rossi, L.M. (2008) Recoverable rhodium nanoparticles: Synthesis, characterization and catalytic performance in hydrogenation reactions. *Applied Catalysis A: General.* 338, 52-57

Marchesini, F.A., Aghemo, V., Moreno, I., Navascués, N., Irusta, S., Gutierrez, L. (2020) Pd and Pd<sub>2</sub>In nanoparticles supported on polymer fibres as catalysts for the nitrate and nitrite reduction in aqueous media. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8,103651.

Martinez, A. & Prieto, G. (2007) The key role of support surface tuning during the preparation of catalysts from reverse micellar-synthesized metal nanoparticles. *Catal. Commun.* 8,1479–1486

Masala, O. & Seshadri, R. (2004) Synthesis routes for large volumes of nanoparticles. *Annu. Rev. Mater. Res.* 34, 41

Mastalir, A., Kiraly, Z., Szollosi, G., & Bartok, M. (2001) Stereoselective hydrogenation of 1-phenyl-1-pentyne over low-loaded Pd-montmorillonite catalysts. *Appl. Catal., A* 213, 133–140

Mastalir, A. & Kiraly, Z. (2003) Pd nanoparticles in hydrotalcite: mild and highly selective catalysts for alkyne semihydrogenation. *J. Catal.* 220, 273–381

Masuda, K. (1992) Heterogeneity of S-layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Microbiol Immunol.* 36, 297–301

Masuda, K. & Kawata T. (1979) Ultrastructure and partial characterization of a regular array in the cell wall of *Lactobacillus brevis*. *Microbiol. Immunol.* 23, 941–53

Masuda, K. & Kawata, T. (1980) Reassembly of the regularly arranged subunits in the cell-wall of *Lactobacillus brevis* and their reattachment to cell-walls. *Microbiol. Immunol.* 24, 299–308

Masuda, K. & Kawata, T. (1981) Characterization of a regular array in the wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to the other wall components. *J. Gen. Microbiol.* 124,81–90.

Masuda, K. & Kawata, T. (1985) Reassembly of a regularly arranged protein in the cell wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to cell walls: chemical modification studies. *Microbiol. Immunol.* 29,927-38.

Mei, Y., Sharma., Lu, Y., Ballauff, M., Dreshsler, M., Irrgang, T. & Kempe, R. (2005) High Catalytic Activity of Platinum Nanoparticles Immobilized on Spherical Polyelectrolyte Brushes. *Langmuir.* 21,12229-12234.

Melke, J., Peter, B., Habereeder, A., Ziegler, J., Fasel, C., Nefedov, A., Sezen, K., Woll, C., Ehrenber, H. & Roth, C. (2016) Metal–Support Interactions of Platinum Nanoparticles Decorated N-Doped Carbon Nanofibers for the Oxygen Reduction Reaction. *ACS Appl. Mater. Interface.* 8, 82–90.

Mennucci, B. & Martinez, J.M. (2005) How to model solvation of peptides? Insights from a quantum-mechanical and molecular dynamics study of N-methylacetamide. I. Geometries, infrared, and ultraviolet spectra in water. *J. Phys. Chem.* 109, 9818–9829.

Merroun, M., Rossberg, A., Hennig, C., Scheinost, A.C. & Selenska-Pobell, S. (2007) Spectroscopic characterization of gold nanoparticles formed by cells and S-layer protein of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Materials Science and Engineering C.* 27, 188

Mertig, M., Kirsch, R., Pompe, W. & Engelhardt, H. (1999) Fabrication of highly oriented nanocluster arrays by biomolecular templating. *Eur. Phys. J. D.* 9,45–48.

Mertig, M., Wahl, R., Lehmann, M., Simon, P. & Pompe, W. (2001) Formation and manipulation of regular metallic nanoparticle arrays on bacterial surface layers: an advanced TEM study. *Eur. Phys. J. D.* 16, 317–320.

Messner, P., Egelseer, E.M., Sleytr, U.B. & Schäffer, C. (2009) 7. Bacterial surface layer glycoproteins and “non-classical” secondary cell wall polymers. In microbial glycolipids, glycoproteins and glycopolymers. (109-128)

Minelli, C., Garcia-Diez, R., Sikora, A. E., Gollwitzer, C., Krumrey, M. & Sharda, A.G. (2014) Characterization of IgG-protein-coated polymeric nanoparticles using complementary particle sizing techniques. *Surf. Interface. Anal.* 46, 663-667

Miyazawa, K., Yoshitake, M. & Tanaka, Y. (2017) HRTEM analyses of the platinum nanoparticles prepared on graphite particles using coaxial arc plasma. *J. Nanopart. Res.* 19,191

Mobili, P. (2008) Caracterización de las proteínas de superficie (capa-S) de *Lactobacillus kefir*. Tesis doctoral

Mobili, P., Londero, A., Maria, T.M.R., Eusébio, M.E.S., De Antoni, G.L., Fausto, R. & Gómez-Zavaglia, A. (2009) Characterization of S-Layer Proteins of *Lactobacillus* by FTIR Spectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. *Vib. Spectrosc.* 50, 68-77

Mobili, P., Serradell, M.A., Mayer, C., Arluison, V. & Gomez-Zavaglia, A. (2013) Biophysical Methods for the Elucidation of the S-Layer Proteins/Metal Interaction. *International Journal of Biochemistry Research & Review.* 3, 39-62

Moll, D., Huber, C., Schlegel, B., Pum, D., Sleytr, U.B. & Sára, M. (2002) S-layer-streptavidin fusion proteins as template for nanopatterned molecular arrays. *PNAS.* 99, 14646–14651

Moreno-Cencerrado, A., Iturri, J., Pum, S., Sleytr, U.B. & Toca-Herrera, J.L. (2016) Influencing bacterial S-layer protein recrystallization on polymer brushes through surface charge and accessible volume: A combined AFM and QCMD analysis. *Polymer.* 1-7

Mori, K., Hara, T., Mizugaki, T., Ebitani, K. & Kaneda, K. (2004) Hydroxyapatite-supported palladium nanoclusters: a highly active heterogeneous catalyst for selective oxidation of alcohols by use of molecular oxygen. *J. Am. Chem. Soc.* 126,10657-10666

Mudassir, M.A., Hussain, S.Z., Rehman, A., Zaheer, W., Asma, S.T., Jilani, A., Aslam, M., Zhang, H., Ansari, T.M. & Hussain, I. (2017) Development of Silver-Nanoparticle-Decorated Emulsion-Templated Hierarchically Porous Poly(1-vinylimidazole) Beads for Water Treatment. *ACS Appl. Mater. Inter.* 9, 24190–24197.

Muller, R.H., Jacobs, C. & Kayser, O. (2001) Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 47, 3–19

Murayama, K. & Tomida, M. (2004) Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry.* 43, 11526-11532

## N

Nagamune, T. (2017) Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. *Nano convergence*. 4, 1-56.

Nakanishi, K., Sakiyama, T. & Imamura, K. (2001) On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon: A review. *J. Biosci. Bioeng.* 91, 233-244.

Natsuki, J., Natsuki, T. & Hashimoto, Y. (2015) A review of silver nanoparticles: synthesis methods, properties and applications. *Int. J. Mater. Sci. Appl.* 4,325-332

Nemanashi-Maumela, M., Nongwe, I., Motene, R.C., Davids, B.L. & Meijboom, R. (2017) Au and Ag nanoparticles encapsulated within silica nanospheres using dendrimers as dual templating agent and their catalytic activity. *Mol. Catal.* 438,184-196

Ndolomingo, M.J., Bingwa, N. & Meijboom, R. (2020) Review of supported metal nanoparticles: synthesis methodologies, advantages and application as catalysts. *Journal of Materials Science.* 55, 6195–6241

Nobs, L., Buchegger, F., Gurny, R. & Allemann, E. (2004) Current methods for attaching targeting ligands to liposomes and nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 93, 1980-1992

Norde, W. & Haynes, C.A. (1995) Proteins at interfaces II: Reversibility and the mechanism of protein adsorption. *ACS Symp. Ser.* 602, 26-4016

Ntais, S., Isaifan, R.J. & Baranova, E.A. (2014) An X-ray photoelectron spectroscopy study of platinum nanoparticles on yttria-stabilized zirconia ionic support: insight into metal support interaction. *Mater. Chem. Phys.* 148,673–679

## O

O'dea, R.M., Willie, J. A. & Epps, T. H. (2020) 100th Anniversary of Macromolecular Science Viewpoint: Polymers from Lignocellulosic Biomass. Current Challenges and Future Opportunities. *ACS Macro. Lett.* 9, 476–493

Odian, G. (2004) Principles Of Polymerization (Fourth Edition). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. ISBN: 0-471-27400-3

Oueslati, M.H., Tahar, L.B. & Halim Harrath, A. (2020) Synthesis of ultra-small gold nanoparticles by polyphenol extracted from *Salvia officinalis* and efficiency for catalytic reduction of p-nitrophenol and methylene blue. *Green Chemistry Letters and Reviews.* 13, 18-26

Ovejero, G., Rodriguez, A., Vallet, A. & Garcia, J (2011) Studies in catalytic wet air oxidation as a process to destroy CI Basic Yellow 11 in aqueous stream over platinum catalyst. *Color. Technol.* 127,10–17

Owoseni-Fagbenro, K.A., Saifullah, S., Imran, M., Perveen, S., Rao, K., Fasina, T.M., Olasupo, I.A., Adams, L.A., Ali, I. & Raza Shah, M. (2019) Egg proteins stabilized green

silver nanoparticles as delivery system for hesperidin enhanced bactericidal potential against resistant *S. aureus*. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 50, 347-354

## P

Pandey, S. & Mishra, S.B. (2014) Catalytic reduction of p-nitrophenol by using platinum nanoparticles stabilised by guar gum. *Carbohydrate Polymers*. 113, 525–531

Panziera, N., Pertici, P. Barazzone, L., Caporusso, A. M., Vitulli, G., Salvadori, P., Borsacchi, S., Geppi, M., Veracini, C. A., Martra, G. & Bertinetti, L. (2007) MVS-derived palladium nanoparticles deposited on polydimethylphosphazene as recyclable catalysts for Heck-type reactions: Preparation, structural study, and catalytic activity. *J. Catal.* 246,351–361

Parandhamana, T., Dey, M.D. & Das, S.K. (2019) Biofabrication of Supported Metal Nanoparticles: Exploring the Bioinspiration Strategy to Mitigate the Environmental Challenges. *Green Chem.* 21, 5469-5500

Pardini, O.R. & Amalvy, J.I. (2008) FTIR, <sup>1</sup>H-NMR spectra, and thermal characterization of water-based polyurethane/acrylic hybrids". *J Appl Polym Sci*, 107,1207-1214

Patel, A.J., Varilly, P., Jamadagni, S.N., Hagan, M., Chandler, D. & Garde, S. (2012) Sitting at the edge: How biomolecules use hydrophobicity to tune their interactions and function. *J. Phys. Chem. B*.116, 2498-2503.

Pavkov-Keller, T., Howorka, S. & Keller, W. (2011) The structure of bacterial S-layer proteins. *Molecular Assembly in Natural and Engineered Systems*, Vol. 103 (Howorka S, ed.) Elsevier Academic Press Inc., Burlington. (73–130)

Pauzi, N.N.P.N., Majid, R.A., Dzulki, M.H. & Yahya, M.Y. (2014) Development of rigid bio-based polyurethane foam reinforced with nanoclay. *Composites, Part B*. 67, 521-526

Peng, X., Cheng, K., Kang, J., Gu, B., Yu, X., Zhang, Q., Wang, Y. (2015) Impact of hydrogenolysis on the selectivity of the Fischer–Tropsch synthesis: diesel fuel production over mesoporous Zeolite-Y-supported cobalt nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 54,4553-4556

Peng, Z.M. & Yang, H. (2009) Designer platinum nanoparticles: Control of shape, composition in alloy, nanostructure and electrocatalytic property. *Nano Today*. 4, 143

Pérez-Mayoral, E., Calvino-Casilda, V. & Soriano, E. (2016) Metal-supported carbon-based materials: opportunities and challenges in the synthesis of valuable products. *Catal. Sci. Technol.* 6,1265–1291

Peruzzo, P.J. (2009). Síntesis, Caracterización y aplicaciones de híbridos acrílico-poliuretánicos y nanocompuestos poliméricos coloidales, Trabajo De Tesis Doctoral.

Peruzzo P.J., Anbinder P.S., Pardini O.R., Costa C.A., Leite C.A., Galembeck F., & Amalvy J.I. (2010) "Polyurethane/acrylate hybrids: effects of acrylic content and thermal treatment on polymer properties". *Journal of Applied Polymer Science*. 116, 2694-2705.

Peruzzo P.J., Anbinder P.S., Pardini, O.R., Vega J., & Amalvy J. (2012) Influence of diisocyanate structure on the morphology and properties of waterborne polyurethane-acrylates. *Polymer Journal*, 44, 232-239.

Phoenix, D.A. & Ahmed, W. (2014) Nanobiotechnology- Manchester, UK: One Central Press

Plank, H., Gspan, C., Dienstleder, M., Kothleitner, G. & Hofer, F. (2008) The influence of beam defocus on volume growth rates for electron beam induced platinum deposition. *Nanotechnology*.19, 485302

Pocurull, E., Marc, R.M. & Borrull, F. (1996) Determination of phenolic compounds in natural waters by liquid chromatography with ultraviolet and electrochemical detection after on-line trace enrichment. *Journal of Chromatography A*, 738,1-9

Poncin-Epaillard, F., Vrlinic, T., Debarnot, D., Mozetic, M., Coudreuse, A., Legeay, G., El Moualij, B. & Zorzi, W. (2012) WillySurface Treatment of Polymeric Materials Controlling the Adhesion of Biomolecules. *Journal of Functional Biomaterials*. 3,3 ,528-543

Poupart, R., Grande, D., Carbonnier, B., Le Droumaguet, B. (2019) Porous polymers and metallic nanoparticles: A hybrid wedding as a robust method toward efficient supported catalytic systems. *Progress in Polymer Science*. 96, 21-42

Pradeep, T., Anshup (2009) Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. *Thin Solid Films*. 517, 6441-6478

Pum, D. & Sleytr, U.B. (1995) Anisotropic crystal growth of the S-layer of *Bacillus sphaericus* CCM 2177 at the air/water interface. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects* 102, 99–104.

Pum, D.& Sleytr, U.B. (2014) Reassembly of S-layer proteins. *Nanotechnology*. 25 312001-312016

Puranik, S.S., Joshi, H.M., Ogale, S.B., Paknikar & K.M. (2008) Hydrazine Based Facile Synthesis and Ordered Assembly of Metal Nanoparticles (Au, Ag) on a Bacterial Surface Layer Protein Template. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 8, 3565-3569.

Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L. & Tainer, J.A. (2007) X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 40, 191–285.

Q

R

Rad, B., Haxton, T.K., Shon, A., Shin, S.H., Whitlam, S. & Ajo-Franklin, C.M. (2014) Ion-Specific Control of the Self-Assembly Dynamics of a Nanostructured Protein Lattice. *ACS Nano*. 9, 180-190

Rakap, M., & Özkar, S. (2012) Hydroxyapatite-supported cobalt(0) nanoclusters as efficient and cost-effective catalyst for hydrogen generation from the hydrolysis of both sodium borohydride and ammonia-borane. *Catalysis Today*. 183,17-25.

Ramachandra Rao, C.N., Kulkarni, G.U., Thomasa, P.J. & Edwards, P.P (2000) Metal nanoparticles and their assemblies. *Chem. Soc. Rev.* 29, 27-35

Rao, J.P & Geckeler, K.E. (2011) Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. *Prog. Polym. Sci.* 36, 887-913

Raybaud, P., Chizallet, C., Mager-Maury, C., Digne, M., Toulhoat, H., Sautet, P. (2013) From  $\gamma$ -alumina to supported platinum nanoclusters in reforming conditions: 10 years of DFT modeling and beyond. *J. Catal.* 308,328–340

Reetz M.T. & Helbig, W. (1994) Size-Selective Synthesis of Nanostructured Transition Metal Clusters. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7401–7402

Reetz, M.T., Breinbauer, R. & Wanninger, K. (1996) Suzuki and Heck reactions catalyzed by preformed palladium clusters and palladiumnickel bimetallic clusters. *Tetrahedron Lett.* 37, 4499

Rideau, E., Dimova, R., Schwille, P., Wurm, F. R., & Landfester, K. (2018) Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. *Chemical society reviews*. 47, 8572-8610

Rioux, R.M., Song, H., Hoefelmeyer, J.D., Yang, V. & Somorjai, G. A. (2005) High-Surface-Area Catalyst Design: Synthesis, Characterization, and Reaction Studies of Platinum Nanoparticles in Mesoporous SBA-15 Silica. *J. Phys. Chem. B.* 109, 2192–2202

Roach, P., Farrar, D. & Perry, C.C. (2005) Interpretation of protein adsorption: surface-induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society*. 127, 8168-8173.

Roach, P., Farrar, D. & Perry, C.C. (2006) Surface tailoring for controlled protein adsorption: effect of topography at the nanometer scale and chemistry. *Journal of the American Chemical Society*. 128, 3939-3945.

Roach, P., Eglin, D., Rohde, K. & Perry, C.C. (2007) Modern biomaterials: Bulk properties and implications of surface modifications: A review. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 18, 1263-1277

Rost, B. & Sander, C. (1993) Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70% Accuracy. *J. Mol. Biol.* 232, 584-599 (<http://www.predictprotein.org>).

Rothemund, P.W.K (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns *Nature* 440,297-302

Ruppert, A.M., Grams, J., Jeźdrzejczyk, M., Matras-Michalska, J., Keller, N., Ostojka, K., Sautet, P. (2015) Titania-supported catalysts for levulinic acid hydrogenation: influence of support and its impact on *c*-valerolactone yield. *Chemsuschem.* 8,1538-1547

Ruta, M., Semagina, N. & Kiwi-Minsker, L. (2008) Monodispersed Pd Nanoparticles for Acetylene Selective Hydrogenation: Particle Size and Support Effects. *J. Phys. Chem. C.* 112, 13635–13641

## S

Sandanaraj, B.S., Vutukuri, D.R., Simard, J.M., Klaikherd, A., Hong, R., Rotello V.M. & Thayumanavan, S. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* 127, 10693–10698.

Sandoval, A., Gomez-Cortes, A., Zanella, R., Diaz, G. & Saniger, J.M. (2007) Gold nanoparticles: Support effects for the WGS reaction. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 278, 200-208

Sardar, M., & Mazumder, J.A. (2019) Biomolecules assisted synthesis of metal nanoparticles. In *Environmental Nanotechnology* (1-23). Springer, Cham. ISBN: 978-3-319-98708-8

Sardon, H., Pascual, A., Mecerreyes, D., Taton, D., Cramail H., & Hedrick, J.L. (2015) Synthesis of Polyurethanes Using Organocatalysis: A Perspective. *Macromolecules* 48, 3153–3165

Sarkar, S., Sinha, A. K., Pradhan, M., Basu, M., Negishi, Y. & Pal, T. (2011) 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

Satzer, P., Svec, F., Sekot, G., Jungbauer, A. (2016) Protein adsorption onto nanoparticles induces conformational changes: Particle size dependency, kinetics, and mechanisms. *Engineering in life sciences.* 16, 238-246.

Schmidt, V., Giacomelli, C., Lecolley, F., Lai-Kee-Him J., Brisson A.R. & Borsali, R. (2006) Diblock Copolymer Micellar Nanoparticles Decorated with Annexin-A5 Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 9010–9011.

Schubert, U.J. (1996) New materials by sol–gel processing: design at the molecular level. *Chem. Soc., Dalton Trans.* 16, 3343

Schuster, B. & Sleytr, U.B. (2013) Chapter 9: Nanotechnology with S-Layer Proteins en *Protein Nanotechnology*. Juliet A. Gerrard (ed.) New York (153-175) ISBN: 978-1-62703-354-1

Schuster, B. & Sleytr, U.B. (2015) Relevance of glycosylation of S-layer proteins for cell surface properties. *Acta Biomaterialia.* 19,149–157

Scotchford, C.A., Gilmore, C.P., Cooper, E., Leggett, G.J. & Downes, S. (2002) Protein adsorption and human osteoblast-like cell attachment and growth on alkylthiol on gold self-assembled monolayers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A.* 59, 84-99

Sellin, R., Grolleau, C., Arrii-Clacens, S., Pronier, S., Clacens, J.M., Coutanceau, C. & Leger, J.M. (2009) Effects of Temperature and Atmosphere on Carbon-Supported Platinum Fuel Cell Catalysts. *J. Phys. Chem. C.* 113, 21735–21744.

Semagina, N., Renken, A. & Kiwi-Minsker L. (2007) Monodispersed Pd-nanoparticles on carbon fiber fabrics as structured catalyst for selective hydrogenation *Chem. Eng. Sci.* 62, 5344–5348.

Senkan, S., Kahn, M., Duan, S., Ly, A., & Leidholm, C. (2006) High-throughput metal nanoparticle catalysis by pulsed laser ablation. *Catal. Today.* 117, 291–296.

Sharma, S. & Agarwal, G. P. (2001) Interactions of Proteins with Immobilized Metal Ions: A Comparative Analysis Using Various Isotherm Models. *Analytical Biochemistry.* 288, 126–140

Shenton, W., Pum, D., Sleytr, U.B. & Mann, S. (1997) Biocrystal templating of CdS superlattices using selfassembled bacterial S-layers. *Nature.* 389, 585–592.

Shervani, Z. & Yamamoto, Y. (2011) Carbohydrate-directed synthesis of silver and gold nanoparticles: effect of the structure of carbohydrates and reducing agents on the size and morphology of the composites. *Carbohydr. Res.* 346, 651-658

Siddiqi, K. S., & Husen, A. (2016) Green synthesis, characterization and uses of palladium/platinum nanoparticles. *Nanoscale research letters.* 11, 1-13

Silva, R.A., Urz, M.D., Petri, D.F. & Dubin, P.L. (2010) Protein adsorption onto polyelectrolyte layers: Effects of protein hydrophobicity and charge anisotropy. *Langmuir.* 26, 14032–14038

Singh, J., Dutta, T., Kim, K.H. et al. (2018) 'Green' synthesis of metals and their oxide nanoparticles: applications for environmental remediation. *J. Nanobiotechnol.* 16, 84

Sleytr U.B. (1978) Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls: structure, chemistry, assembly, and function. *Int. Rev. Cytol.* 53, 1–62.

Sleytr, U.B. & Beveridge, T.J. (1999) Bacterial S-layers. *Trends In Microbiology.* 7, 253-260

Sleytr, U.B., Messner, P., Pum, D. & Sara, M. (1999) Crystalline bacterial cell surface layers (S-layers): from supramolecular cell structure to biomimetics and nanotechnology. *Angew Chem Int Ed.* 38,1034-1054

Sleytr, U.B., Sára, M., Pum, D., Schuster, B., Messner, P. & Schaffer, C. (2002) Self-assembly protein systems: microbial S-layers. In *Biopolymers. 1st Ed. Polyamides and complex proteinaceous materials I* Vol. 7. Weinheim: Wiley-VCH Steinbuchel, A., Fahnestock, S.R., Eds.

Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E.M., Pum, D., Horejs, C.M., Tscheliessnig, R., & Ilk, N. (2011) Nanobiotechnology with S-Layer Proteins as Building Blocks. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 103, 277-352

Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E.M. & Pum, D. (2014) S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 1-42

Smit, E., Oling, F., Demel, R., Martinez, B. & Pouwels, P.H. (2001) The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: identification and characterisation of domains responsible for S-protein assembly and cell wall binding. *J Mol Biol.* 305, 245–57

Song, C., Wang, Y. & Rosi, N.L. (2013) Peptide-Directed Synthesis and Assembly of Hollow Spherical CoPt Nanoparticle Superstructures. *Angew. Chem., Int. Ed.* 52, 3993

Song, Y., Garcia, R.M., Dorin, R.M., Wang, H., Qiu, Y., Coker, E.N., Steen, W. A., Miller, J. E. & Shelnett, J.A. (2007) Synthesis of Platinum Nanowire Networks Using a Soft Template. *Nano Lett.* 7, 3650.

Spadaro, D., Barletta, E., Barreca, F., Curro, G. & Neri F., (2010) Synthesis of PMA stabilized silver nanoparticles by chemical reduction process under a two-step UV irradiation. *Appl. Surf. Sci.* 256,3812-3816

Sridaeng, D., Sukkaneewat, B., Chueasakol, N. & Chantarasiri, N. (2015) Copper-amine complex solution as a lowemission catalyst for exible polyurethane foam preparation, *e-Polym.* 15,119–126

Stanislaus, A., Marafi, A. & Rana, M.S. (2010) Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catal. Today.* 153,1–68

Subramanyam, B. & Das, A. (2009) Linearized and non-linearized isotherm models comparative study on adsorption of aqueous phenol solution in soil. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 6, 633-640

Sugimoto, N., Igarashi, K., Wada, M. & Samejima, M. (2012) Adsorption Characteristics of Fungal Family 1 Cellulose-Binding Domain from *Trichoderma reesei* Cellobiohydrolase I on Crystalline Cellulose: Negative Cooperative Adsorption via a Steric Exclusion Effect. *Langmuir.* 28, 14323–14329

Surewicz, W.K., Leddy, J.J. & Mantsch, H.H. (1990) Structure, stability and receptor interaction of cholera toxin as studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 29, 8106–8111.

Szleifer, I. (1997) Polymers and proteins: interactions at interfaces. *Biomaterials.* 337-344

## T

Taguchi, A., Inoue, M., Hiromi, C., Tanizawa, M., Kitami, T. & Abe, T. (2008) Study of the surface morphology of platinum thin films on powdery substrates prepared by the barrel sputtering system. *Vacuum.* 83, 575

Taheri, N. & Sayyahi, S. (2016) Effect of clay loading on the structural and mechanical properties of organoclay/HDIbased thermoplastic polyurethane nanocomposites. *e-Polym.* 16, 65-73

Tang, L., Thevenot, P. & Hu, W. (2008) Surface chemistry influences implant biocompatibility. *Current topics in medicinal chemistry*. 8, 270-280

Thangaraj, V., Mahmud, S., Li, W., Yang, F. & Liu, H. (2017) Greenly synthesised silveralginate nanocomposites for degrading dyes and bacteria. *IET Nanobiotechnol.* 12,47-51

Thathagar, M.B., Beckers, J. & Rothenberg, G. (2002) Copper-catalyzed Suzuki cross-coupling using mixed nanocluster catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 11858

Tao, F.F., Nguyen, L. & Zhang, S. (2014) Chapter 1: Introduction: synthesis and catalysis on metal nanoparticles, En: *Metal Nanoparticles for Catalysis: Advances and Applications*, Royal Society of Chemistry, 1–5. Catalysis Series 17. Tao, F.F. (Ed.)

Teixeira, L.M., Strickland, A., Mark, S.S., Bergkvist, M., Sierra-Sastre, Y., & Batt, C.A. (2010) Entropically Driven Self-Assembly of *Lysinibacillus sphaericus* S-Layer Proteins Analyzed Under Various Environmental Conditions. *Macromol. Biosci.* 10, 147–155

Thomas, C., Kumar, S., Mishra, P. & Talegaonkar, S. (2015) Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. *Current pharmaceutical design*, 21, 6165-6188

Treat, N. D., Ayres, N., Boyes, S. G., & Brittain, W. J. (2006) A facile route to poly (acrylic acid) brushes using atom transfer radical polymerization. *Macromolecules*. 39, 26-29

Toca-Herrera, J.L., Krastev, R., Bosio, V., Kupcu, S., Pum, D., Fery, A., Sára, M. & Sleytr, U.B. (2005) Recrystallization of Bacterial S-Layers on Flat Polyelectrolyte Surfaces and Hollow Polyelectrolyte Capsules. *Small*. 1, 339–348

Torii, H. & Tasumi, M. (1996) in: H. Mantsch, D. Chapman (Eds.), *Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, Wiley-Liss Inc., MA, USA, 1–18, Chapter 1. (131-134)

Torii, H., Tatsumi, T. & Tasumi, M. (1998) Effects of hydration on the structure, vibrational wavenumbers, vibrational force field and resonance Raman intensities of N-methylacetamide. *J. Raman Spectrosc.* 29, 537–546.

Toshima, N., Shiraishi, Y., Teranishi, T., Miyake, M., Tominaga, T., Watanabe, H., Brijoux, W., Bonnemann, H. & Schmid, G. (2001) Various ligand-stabilized metal nanoclusters as homogeneous and heterogeneous catalysts in the liquid phase. *Appl. Organomet. Chem.* 15, 178–196.

Turkevich, J., Stevenson, P.C. & Hillier, J. (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* 11, 55–75

## U

Ulman, A. (1996) Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem Rev* 96,1533-54

## V

van Ryneveld, E., Mahomed, A.S., van Heerden, P.S., Green, M.J., Friedrich, H.B. (2011) A catalytic route to lower alcohols from glycerol using Ni-supported catalysts. *Green Chem* 13,1819-1827

Van Tassel, P.R. (2003) Biomolecules at Interfaces, in Encyclopaedia of Polymer Science and Technology, 3rd ed.; Wiley Interscience: New York, NY, USA (285–305) <https://doi.org/10.3390/jfb3030528>

Varga, M. (2010) Self-Assembly Of The S-Layer Protein Of Sporosarcina Ureae Atcc 13881. Dissertation

Vauthier, C. & Bouchemal, K. (2009) Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* 5, 1025-1058

Veith, C., Diot-Néant, F., Miller, S.A., & Allais, F. (2012) Synthesis and polymerization of bio-based acrylates: a review. *Polymer Chemistry.* 2-16

Ventura, M., Jankovic, I., Walker, D.C., Pridmore, R.D. & Zink, R. (2002) Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. *Appl Environ Microbiol.* 68,6172–81

Vincent, T. & Guibal, E. (2003) Chitosan-Supported Palladium Catalyst. 3. Influence of Experimental Parameters on Nitrophenol Degradation. *Langmuir* 19, 8475-8483

Vogel, N., Ziener, U., Manzke, A., Plettl, A., Ziemann, P., Biskupek, J., Weiss, C.K. & Landfester, K. (2011) Platinum Nanoparticles from Size Adjusted Functional Colloidal Particles Generated by a Seeded Emulsion Polymerization Process. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2, 459–472.

Vogler, E.A. (2012) Protein adsorption in three dimensions. *Biomaterials.* 33, 1201-1237

## W

Wahl, R. (2003) PhD thesis, University of Technology, Dresden (Germany).

Wahl, R., Mertig, M., Raff, J., Selenska-Pobell, S. & Pompe, W. (2001) Electron-beam induced formation of highly ordered palladium and platinum nanoparticle arrays on the S-layer of *Bacillus sphaericus* NCTC 9602. *Adv. Mater. Sci. Technol.* 13, 736–740.

Wahl, R., Engelhardt, H., Pompe, W. & Mertig, M. (2005) Multivariate statistical analysis of two-dimensional metal cluster arrays grown in vitro on a bacterial surface layer. *Chem. Mater.* 17,1887–1894.

Walkowiak, J., Gradzielski, M., Zauscher, S., & Ballauff, M. (2020) Interaction of Proteins with a Planar Poly (acrylic acid) Brush: Analysis by Quartz Crystal Microbalance with Dissipation Monitoring (QCM-D). *Polymers.* 13, 122

Wan Mat Khalir, W.K.A., Shameli, K., Jazayeri, S.D., Othman, N.A., Che Jusoh, N.W., Mohd Hassan, N. (2020) In-situ biofabrication of silver nanoparticles in Ceiba pentandra natural Fiber Using Entada spiralis extract with their antibacterial and catalytic dye reduction properties. *Nanomaterials.* 10, 1104

Wang, Q., Fu, S. & Yu, T. (1994) Emulsion polymerization. *Progress in Polymer Science*.19, 703-753

Wang, J.S., Pan, H.B. & Wai, C.M. (2006) Deposition of Metal Nanoparticles on Carbon Nanotubes via Hexane Modified Water-in-CO<sub>2</sub> Microemulsion at Room Temperature. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6, 2025-2030.

Wang, C., Daimon, H., Onodera, T., Koda, T. & Sun, S. (2008)a A general approach to the size-and shape-controlled synthesis of platinum nanoparticles and their catalytic reduction of oxygen. *Angew Chem Int. Ed* 47,3588-3591

Wang, L.C., Liu, Y.M., Chen, M., Cao, Y., He, H.Y., Fan, K.N. (2008) MnO<sub>2</sub> nanorod supported gold nanoparticles with enhanced activity for solvent-free aerobic alcohol oxidation. *J. Phys. Chem. C.* 112,6981-6987

Weil, E.D. (1993) Reaction polymers, ed. W. F. Gum, H. Ulrich and W. Riese, Hanser Publishers, Oxford University Press, New York, 838.

Weinberg, W.H. (1996) Eley–Rideal surface chemistry: direct reactivity of gas phase atomic hydrogen with adsorbed species. *Acc. Chem. Res.* 29, 479-487.

Wertz, C.F. & Santore, M.M. (2001) Effect of surface hydrophobicity on adsorption and relaxation kinetics of albumin and fibrinogen: Single-species and competitive behavior. *Langmuir.* 17, 3006–301621

White, R.J., Luque, R., Budarin, V.L., Clark, J.H., & Macquarrie, D.J. (2009) Supported metal nanoparticles on porous materials. Methods and applications. *Chem. Soc. Rev.* 38, 481–494

Whitesides, G.M., Mathias, J.P. & Seto, C.T. (1991) Molecular self-assembly and nanochemistry—a chemical strategy for the synthesis of nanostructures. *Science.* 254, 1312–1319

Wilson, O.M., Knecht, M.R., Garcia-Martinez, J.C. & Crooks, R.M. (2006) Effect of Pd Nanoparticle Size on the Catalytic Hydrogenation of Allyl Alcohol. *J. Am. Chem. Soc.*128, 4510–4511

Winzen, S., Schoettler, S., Baier, G., Rosenauer, C., Mailaender, V., Landfester, K. & Mohr, K. (2015) Complementary analysis of the hard and soft protein corona: sample preparation critically effects corona composition. *Nanoscale.* 7, 2992-3001

Wittemann, A. & Ballauff, M. (2004) Secondary structure analysis of proteins embedded in spherical polyelectrolyte brushes by FT-IR spectroscopy. *Anal. Chem.* 76, 2813-2819.

Wittemann, A. & Ballauff, M. (2006) Interaction of proteins with linear polyelectrolytes and spherical polyelectrolyte brushes in aqueous solution. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8, 5269-5275.

Wu, H., Wang, L., Zhang, J., Shen, Z. & Zhao, J. (2011) Catalytic oxidation of benzene, toluene and p-xylene over colloidal gold supported on zinc oxide catalyst. *Catal. Commun.* 12,859-865

Wunder, S., Polzer, F., Lu, Y., Mei, Y. & Ballauff, M. (2010) Kinetic Analysis of Catalytic Reduction of 4-Nitrophenol by Metallic Nanoparticles Immobilized in Spherical Polyelectrolyte Brushes. *J. Phys. Chem. C* 114, 8814-8820.

## X

Xu J.W., Bulter I. & Gilson D. (2004) "Vibrational Spectroscopic Investigation of 2-Hydroxyethyl Methacrylate (HEMA) and Poly-2-hydroxyethylmethacrylate (P-HEMA)". The 5th Annual Meeting of the IADR Chinese Division, *Dental Materials: V-Polymer Materials-Chemistry*

Xu, Y. & Zhang, B. (2014) Recent advances in porous Pt-based nanostructures: synthesis and electrochemical applications. *Chem. Soc. Rev.* 43, 2439

## Y

Yamada, Y., Yano, K., Xu, Q. & Fukuzumi, S. (2010) Cu/Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as catalysts for hydrogen evolution from ammonia borane by hydrolysis. *J. Phys. Chem. C* 114, 16456-16462

Yan, M. (2014) Nanoporous gold catalyst for highly selective semihydrogenation of alkynes: Remarkable effect of amine additives. In *Development of New Catalytic Performance of Nanoporous Metals for Organic Reactions (55-91)*. Springer, Tokyo. ISBN: 978-4-431-54931-4

Yasui, T., Yoda, K. & Kamiya, T. (1995) Analysis of S-layer proteins of *Lactobacillus brevis*. *FEMS Microbiol Lett.* 133, 181-6

Ye, X.R., Lin, Y. & Wai, C.M. (2003) Decorating catalytic palladium nanoparticles on carbon nanotubes in supercritical carbon dioxide. *Chem. Commun.* 5, 642-643

Ye, X.R., Lin, Y., Wang, C., Engelhard, M., Wang, Y. & Wai, M. (2004) Supercritical fluid synthesis and characterization of catalytic metal nanoparticles on carbon nanotubes. *J. Mater. Chem.* 14, 908-913.

Ye, R., Peng, A., Wang, T., Xu, Y., Zhang, J., Li, Y., Nilewski, L.G., Lin, J. & Tour, J.M. (2015) In Situ Formation of Metal Oxide Nanocrystals Embedded in Laser-Induced Graphene. *ACS Nano* 9, 9244-9251.

Yeap, S.P., Lim, J., Ooi, B.S. et al. (2017) Agglomeration, colloidal stability, and magnetic separation of magnetic nanoparticles: collective influences on environmental engineering applications. *J. Nanopart. Res.* 19, 368

Yeh, Y. C., Creran, B., & Rotello, V. M. (2012) Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* 4, 1871-1880

Yin, B.S., Ma, H.Y. Wang, S.Y. & Chen, S.H. (2003) Electrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles under Protection of Poly(N-vinylpyrrolidone). *J. Phys. Chem. B* 107, 8898-8904.

Yoon, J. Y., Park, H. Y., Kim, J. H. & Kim, W. S. (1996) Adsorption of BSA on Highly Carboxylated Microspheres—Quantitative Effects of Surface Functional Groups and Interaction Forces 1. *Journal Of Colloid And Interface Science*. 177, 613–620

Young, B. R., Pitt, W. G. & Cooper, S. L. (1988) Protein Adsorption on Polymeric Biomaterials I. Adsorption Isotherms. *Journal of Colloid and Interface Science*. 124, 28-43

Yuan, C., Xu, Y., Luo, W., Zeng, B., Qiu, W., Liu, J., Huang, H. & Dai, L. (2012) Platinum-Nanoparticle-Supported Core–Shell Polymer Nanospheres with Unexpected Water Stability and Facile Further Modification. *Nanotechnology*. 23, 175301.

Yuan, J., Wunder, S., Warmuth, F. & Lu, Y. (2012) Spherical polymer brushes with vinylimidazolium-type poly(ionic liquid) chains as support for metallic nanoparticles. *Polymer*. 53, 43-49

## Z

Zanella, R. (2012) Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. Mundo nano. *Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología*, 5, 69-81

Zelikin, A. N.; Price, A. D. & Stadler, B. (2010) Poly(Methacrylic Acid) Polymer Hydrogel Capsules: Drug Carriers, Subcompartmentalized Microreactors, Artificial Organelles. *Small*. 6, 2201–2207.

Zeng, F.Q., Lee, H. & Allen, C. (2006) Epidermal Growth Factor-Conjugated Poly(ethylene glycol)-block- Poly( $\delta$ -valerolactone) Copolymer Micelles for Targeted Delivery of Chemotherapeutics. *Bioconjugate Chem*.17, 399–409

Zeng, J., Zhang, Q., Chen, J. & Xia, Y. (2010) A comparison study of the catalytic properties of Au-based nanocages, nanoboxes, and nanoparticles. *Nano Lett*. 10, 30–35

Zhang, F., Roosen-Runge, F., Skoda, M.W.A., Jacobs, R.M.J., Wolf, M., Callow, P., Frielinghaus, H., Pipich, V., Pre'vostf, S., & Schreiber, F. (2012)a Hydration and Interactions in Protein Solutions Containing Concentrated Electrolytes Studied by Small-Angle Scattering. *Phys. Chem. Chem. Phys*. 14, 2483–2493.

Zhang, H., Wang, H., Xu, Y., Zhuo, S., Yu, Y. & Zhang, B. (2012)b Conversion of Sb<sub>2</sub>Te<sub>3</sub> Hexagonal Nanoplates into Three-Dimensional Porous Single-Crystal-Like Network-Structured Te Plates Using Oxygen and Tartaric Acid. *Angew. Chem., Int. Ed*. 51, 1459

Zhang, W., Tan, F., Wang, W., Qiu, X., Qiao, X. & Chen, J. (2012)c Facile, template-free synthesis of silver nanodendrites with high catalytic activity for the reduction of p-nitrophenol. *Journal of Hazardous Materials*. 217,36– 42

Zhang, X.F., Zhi-Guo L., Wei S., & Sangiliyandi G. (2016) SilverNanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. 17, 1534

Zhang, Y., Kang, D., Saquing, C., Aindow, M. & Erkey, C. (2005) Supported Platinum Nanoparticles by Supercritical Deposition. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 4161-4164

Zhang, Z., Chen, S. & Jiang, S. (2006) Dual-functional biomimetic materials: nonfouling poly(carboxybetaine) with active functional groups for protein immobilization. *Biomacromolecules.* 7, 3311-3315

Zhang, Z. & Wang, Z. (2006) Diatomite-Supported Pd Nanoparticles: An Efficient Catalyst for Heck and Suzuki Reactions. *J. Org. Chem.* 71, 7485-7487.

Zhang, Z., Li, G., Yan, F., Zheng, X., & Li, X. (2012) Towards understanding of protein adsorption behavior on plasma polymerized pyrrole film. *Open Chemistry.* 10, 1157-1164.

Zhao, M. & Crooks, R.M. (1999) Homogeneous Hydrogenation Catalysis with Monodisperse, Dendrimer-Encapsulated Pd and Pt Nanoparticles. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 364

Zhao, X., Zhou, L., Riaz Rajoka, M.S., Yan, L., Jiang, C., Shao, D., Zhu, J., Shi, J., Huang, Q. & Yang, H. (2018) Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 817-835

Zhao, P., Feng, X., Huang, D., Yang, G. & Astruc, D. (2015). Basic Concepts and Recent Advances in Nitrophenol Reduction by Gold- and other Transition Metal Nanoparticles. *Coord. Chem. Rev.*, 287, 114-136

Zhong, Y., Xu, C.L., Kong, L.B. & Li, H.L. (2008) Synthesis and high catalytic properties of mesoporous Pt nanowire array by novel conjunct template method. *Appl. Surf. Sci.* 255, 33

Zhou, X., Fang, C., Chen, J., Li, S., Li, Y. & Lei, W. (2016) Correlation of raw materials and waterborne polyurethane properties by sequence similarity analysis. *J Mater Sci Technol.* 32,687-694



**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA**