



RIDUNAJ
Repositorio Institucional
Digital UNAJ



Universidad Nacional
ARTURO JAURETCHE

Tesinas de Grado

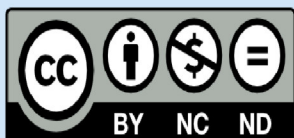
Laserna, Daniela Alejandra

Proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* como template y estabilizante para la obtención de nanopartículas de oro : Aplicación en detección colorimétrica de arsénico en agua

2023

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons.
Atribución – No comercial – Sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Laserna, D. A. (2023). *Proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* como template y estabilizante para la obtención de nanopartículas de oro : Aplicación en detección colorimétrica de arsénico en agua* [Trabajo final de grado, Universidad Nacional Arturo Jauretche]. <https://rid.unaj.edu.ar/handle/123456789/2773>



**Trabajo final de la carrera de Bioquímica.
Instituto de Ciencias de la Salud.
Universidad Nacional Arturo Jauretche.**

“Proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* como *template* y estabilizante para la obtención de nanopartículas de oro. Aplicación en detección colorimétrica de arsénico en agua.”

**Alumna: Daniela Alejandra Laserna.
Directora: Dra. Patricia Araceli Bolla.
Co-directora: Dra. Sofia Huggias.**

Noviembre 2023.

El presente trabajo ha sido realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias Aplicadas (CINDECA) de la Universidad Nacional de La Plata CICPBA CONICET CCT La Plata. Bajo la dirección de la Dra. Patricia Araceli Bolla, Profesora Asociada, de la Cátedra Técnicas Analíticas Instrumentales I y II, Carrera de Bioquímica, ICS, UNAJ; Investigadora Adjunta de CONICET, y la co-dirección de la Dra. Sofía Huggias, Jefa de Trabajos Prácticos de la División Química Analítica FCE-UNLP, Becaria Postdoctoral de CONICET.

Agradecimientos.

Como empezar a escribir el final y el comienzo de algo tan grande que no para de llenarme el corazón de alegría y emoción.

Hay una frase que siempre llevo en mi cabeza, para todo ámbito de la vida, que dice algo así como “no importa la meta, lo que importa es el camino”. Y cuánto de verdad y de realidad hay en esas palabras..

Es muy difícil escribir y hablar de este proceso sin emocionarme, pienso que tan real fue lo que viví, cuantas alegrías transité, cuantos llantos y enojos también participaron de este camino. Cuantas personas conocí y con ellas, cuantas realidades distintas.

Conocer, entender y adentrarse dentro de un mundo de personas diversas, en ideología, edad y estilos de vida. Realmente fué una nutrición completa de miles de factores que viví en el tránsito por mi amada UNAJ. Fui completamente feliz a lo largo de estos años, me llevo conmigo toda la experiencia vivida desde lo más ínfimo hasta lo más infinito.

Y hablando de nuestro predio, como no nombrar al Dessy!.El edificio amigo de todo bioquímico de la UNAJ, con su hermosa pasarela rodeado de los árboles de moras que cuando florecen, dan algo tan rico que cada año disfruté y lo voy a recordar como si fuera el jardín de mi nona.

Así, tan dramático y/o sentimental es como transite el camino de la carrera y como bien sabe la mayoría de mis allegados, cada mañana, cada día, cada noche recorrida fue con la mejor de las alegrías y una sonrisa inmensa para recibir a mis compañeros, hoy colegas, a mis profesores y a todo el personal que trabaja para la UNAJ.

Realmente fue un sueño y hoy no me queda más que agradecer.

Gracias mamá y papá por darme la oportunidad de estudiar, de elegir y de darme las herramientas necesarias, desde lo material hasta cada aliento para seguir y no abandonar. Gracias por bancar tanto, por preguntar, por preocuparse y por festejarme cada logro como si fuera la primera vez de cada uno de ellos, con el entusiasmo y amor que me dieron y me dan. No podría haber sido mejor de lo que fué y sin ustedes nada tendría sentido, mis pilares y mis guerreros de la vida, una eternidad de agradecimientos para ustedes y este “premio” es mérito de ustedes. Chin chin por nuestra hermosa familia.

Gracias Clau por haberme inculcado lo valioso y el poder que comprende el aprender un

nuevo conocimiento, ampliar la diversidad y la significancia de una palabra.. gracias tutor, un maestro de lujo que marcó mi vida para siempre.

Gracias a mi familia, completa, por todos los que siempre estaban a la expectativa y apoyando desde lejos y/o desde cerca. No me alcanzarían las hojas para nombrar a cada uno de ustedes, pero sé quiénes se sienten participe y me siento muy contenta por su compañía. Gracias a los topolinos y en especial a mi madrina Su, por ser incondicional para mí y para mi mamá. El apoyo de los amigos, que más que amigos son familia, es algo tan valorable que merecen una mención especial. Son el aguante de la familia y el soporte que en la vida se necesita.

Gracias tía Nati y tíos, por rearmar una familia que alguna vez fue y hoy es mucho mejor que antes. El abrazo que nos debíamos y que nos unirá si dios quiere, por siempre.

Gracias tía Ana por ser la tía loca que siempre esta, fuiste y sos la unión de la familia y la contención de mi papá. Te mereces la mención especial por supuesto.

Asi como ellos, muchos amigos y familiares más que hicieron de este camino mucho más fácil por tan solo acompañar desde la palabra hasta los abrazos, en el día a día y año trasaño a mi y a mi familia. Mi pequeña familia rodeada de una hermosa contención.

Gracias Cuanmi, por acompañarme y alentarme a seguir en los años más pesados de la carrera y por ser la persona más indiscutible en la transmisión del amor. Siempre digo que las personas buenas se encuentran y para mi fue un placer encontrarte y un orgullo, me enseñaste mucho. Sos de lo que no hay, gracias por ser, siempre.

Gracias a mis amigas, intimas y fieles, por bancar cada lloradita, cada alegría, por decirme “dale que amiga ya estas” o “ un domingo vas a estudiar?!” jajaja si, ustedes fueron y son mis pilares para toda la vida. Soy muy afortunada de tenerlas y sin ustedes nada hubiera salido asi de lindo. Las amo, mi incondicional Ye y mi media naranjita Mel.

Gracias a los facuamigos, esas personas que te bancan en el día a día, en la ansiedad, en la depresión, en la alegría y en la bronca. Esos que festejan con vos y te ayudan 2 minutos antes de rendir para que interpretes ese conocimiento medio flojo que quedaba pendiente. Es un logro en conjunto este título. Gracias.

Gracias a mis fieles y a los que me llenan el corazón de alegría con solo verlos o escucharlos hablar, culito y pachi. Son mi familia, los elijo siempre. Gracias a la UNAJ por permitirme conocerlos.

Gracias al grupito de los nerds, tin, seba, adri y aye, por nuestros días de estudios y nuestras

vacaciones que quedaran para el recuerdo y sé que siempre estaremos el uno para el otro pase lo que pase.

Gracias al grupito de los pulpoamigos, hicieron de la pandemia una maravillosa experiencia y nuestras vacaciones fueron de las mejores. Gracias por ser el aguante y por las ricas comidas, disfrute de ustedes siempre y me hace feliz verlos bien. Los adoro, laju y territa, sin importar la distancia, siempre.

Gracias a vos mi Pi, gracias por ser, por estar, por demostrar, por dar todo. Gracias por llorar y sonreír conmigo, gracias por aguantar el sueño para lograr alcanzar este título conmigo. Gracias por jugártela en cada paso y enseñarme que todo es posible. Gracias por elegirme y por dejar compartir tu vida conmigo. Te amo, aguante nosotros, los bioquímicos de la UNAJ. Orgullosa del equipo que somos.

Gracias a la familia Francioni, por ser incondicionales, por compartir cada momento conmigo, por festejar y llorar juntos! Gracias por hacerme parte de ustedes, somos una gran familia.

Gracias a los que ya no están, pero estuvieron.

Gracias especialmente a mi abuelo, este año hace un año que se fue y quiero decirle: abuelo lo logré, acá estoy, yendo a defender mi título con papá y mamá. Y como vos me dijiste en tus últimos días, “si nena, yo te vi vestida de ambo recibíndote de dentista” jajaja, que importa de qué era, sé que lo viste. Estas lagrimas son de amor, por siempre y para siempre tu negra corajuda.

Por último, pero no menos importante, personalmente gracias a mis pichus. Todos saben que cuatro patitas que te siguen a todos lados nos dan la compañía y la fuerza para seguir adelante, gracias por y panchito, fueron mi amuleto de la suerte, los amo.

Gracias Pato y Sofi por brindarme el lugar y las herramientas para lograr esta gran meta, fue una experiencia inolvidable.

Sin más, gracias a cada profesor y a cada persona que forma parte de la UNAJ. Fueron parte de esta carrera y de este crecimiento y nutrición personal-profesional.

Gracias por el aguante y por la alegría, gracias por cada enseñanza, gracias por su compromiso hacia nosotros y hacia un futuro. Gracias, en serio, siempre.

Esta meta es de todos, porque el camino recorrido me llena de orgullo y por ustedes, gracias de todo corazón. Me siento feliz y afortunada.

Dani.

Índice

INTRODUCCIÓN	1
El arsénico, un contaminante silencioso	1
Bionanobiotecnología.	5
Extracción o aislamiento de las proteínas de capa-S.	7
El oro como metal de elección.	7
OBJETIVOS	10
Objetivo general.....	10
Objetivos específicos	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Obtención de proteínas de capa-S (SLP) de <i>L. kefir</i>	11
Reactivos y Buffers utilizados	11
Descripción de buffers utilizados.....	11
Cultivo de <i>Lentilactobacillus kefir</i>	11
Extracción de proteínas de capa-S (S8)	12
Cuantificación de SLP	12
Caracterización analítica de la SLP	13
Obtención de nanobiosistemas: proteína de capa S (S8) / nanopartículas de oro (AuNPs).	13
Reactivos utilizados	13
Síntesis de AuNPs soportadas sobre S8 utilizando diferentes métodos de reducción	13
1. Au/S8 reducción con H ₂	14
2. Au/S8 reducción con H ₂ seguida de NaBH ₄	14
3. Au/S8 _{sb} reducción con NaBH ₄	14
Obtención de nanopartículas de oro coloidales estabilizadas	15
1. Síntesis de nanopartículas de oro coloidal (AuNP _{scol}).....	15
2. Estabilización de las nanopartículas de oro coloidal con S8.....	15
Caracterización de los sistemas.....	16
Evaluación de la estabilidad de los sistemas.....	16

Caracterización analítica de los sistemas	17
Espectroscopía UV-Vis.....	17
Detección colorimétrica de Arsénico.....	18
Reactivo utilizado	18
Interacción del bionanosistema con otros analitos.....	19
Reactivos utilizados:	19
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
Cultivo de <i>Lentilactobacillus kefir</i> y extracción de proteínas de capa-S (S8)	20
Cuantificación de SLP	22
Caracterización analítica de la SLP	23
Obtención de nanobiosistemas: proteína de S8 / AuNPs	24
Síntesis de AuNPs soportadas sobre S8 utilizando diferentes métodos de reducción	24
1. Au/S8 reducción con H ₂	24
2. Au/S8 reducción con H ₂ seguida de NaBH ₄	24
3. Au/S8 _{sb} reducción con NaBH ₄	26
Obtención de nanopartículas de oro coloidales estabilizadas	28
1. Síntesis de nanopartículas de oro coloidal (AuNPs _{col}).....	28
2. Estabilización de las nanopartículas de oro coloidal con S8.....	29
Test de sal con NaCl	31
Evaluación de los sistemas obtenidos frente al arsénico.....	34
Ensayo de la respuesta colorimétrica del sistema Au/S8 _{sb} -NaBH ₄	35
Ensayo de la respuesta colorimétrica del sistema AuNPs _{col} -S8 ₄	36
Interferencias con distintos analitos.....	43
Conclusiones.....	51

Proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* como matrices para la obtención de nanopartículas de oro. Aplicación en la detección colorimétrica de arsénico en agua.

INTRODUCCIÓN

El arsénico, un contaminante silencioso

La demanda de agua subterránea de buena calidad ha aumentado conforme lo ha hecho la población mundial, por lo que proporcionar agua potable a los habitantes del mundo es uno de los mayores desafíos de este siglo. A principios del siglo XX, los problemas de calidad del agua subterránea eran mínimos y los sólidos disueltos totales y el pH eran los únicos parámetros de preocupación. Sin embargo, durante el siglo XXI, ha habido una mayor atención global en la resolución de problemas vinculados a la calidad del agua. La calidad química del agua subterránea varía significativamente según el tipo de acuífero, la duración de la interacción roca-agua y los aportes de diversas fuentes naturales y no naturales. Durante los últimos diez años, se ha informado de la contaminación de las aguas subterráneas por diversos componentes químicos procedentes de acuíferos que superan los límites prescritos por la OMS que conducen a aguas no potables. Los procesos geoquímicos de los acuíferos pueden provocar un deterioro de la calidad del agua [Maliva, 2020]. En los últimos años, la contaminación por arsénico (As) se ha convertido en un tema de grave preocupación en vista de su toxicidad para los humanos [Polya et al., 2019].

El arsénico es un elemento de la corteza terrestre con una abundancia de 1,8 ppm en peso, se puede combinar con oxígeno, cloro y azufre dando lugar a compuestos inorgánicos de arsénico. Este analito es de gran interés en términos de cuestiones ambientales dada su elevada toxicidad. Las interacciones entre las rocas y el agua en los sistemas acuíferos son la principal fuente de arsénico y provocan el deterioro de la calidad del agua subterránea. El arsénico es el duodécimo elemento más común en la naturaleza y suele aparecer en tres formas alotrópicas, que incluyen negro, amarillo y gris. Si se calienta, se oxida rápidamente a trióxido de arsénico (As_2O_3) [Fendorf et al., 2010]. El arsénico es un elemento altamente tóxico que ocupa el primer lugar en la lista de prioridades de sustancias peligrosas y registro de enfermedades de 2001 definida por la OMS. Desde 1993, el valor permitido de concentración de arsénico en el agua potable se ha fijado en 10 $\mu\text{g/L}$. Está clasificado como carcinógeno, mutágeno y teratógeno. La

IARC (Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer) ha clasificado el As como un carcinógeno humano de clase 1. En los cuerpos de agua naturales, el arsénico se encuentra principalmente en dos estados: arsénico trivalente (As^{3+} , arsenito) y arsénico pentavalente (As^{5+}), ambas formas son especies inorgánicas altamente tóxicas [Fendorf et al., 2010]. La toxicidad del arsenito es mucho mayor que la del arseniato. El arsénico en agua también puede encontrarse hidrolizado formando ácidos que pueden convertirse en otras especies disociadas, con posibilidad de adsorberse o desorberse de las sustancias o partículas, cambiando su estado de oxidación, por reacciones con diversas moléculas, factores del ambiente o por acción de los microorganismos [Mandal et al., 2002; Smedley et al. 2002].

En general, en las aguas subterráneas, se notificaron casos naturales de altos niveles de arsénico en los acuíferos, especialmente en los acuíferos de sedimentos no consolidados en todo el mundo, y se han relacionado con varios efectos adversos para la salud [Smedley y Kinniburgh, 2013; Mozumder, 2019]. La contaminación por arsénico de aguas de consumo afecta a más de 500 millones de personas en todo el mundo. Las vías de exposición humana al arsénico más importantes son a través de los alimentos y el agua potable, incluidas las bebidas y comidas elaboradas a partir de agua potable. Según la guía de la Organización Mundial de la Salud [OMS 2022 pp. 343] se describe que “... *en vista de las dificultades prácticas para eliminar el arsénico del agua potable, así como del límite práctico de cuantificación en la región de 1 a 10 $\mu\text{g/L}$, se mantiene el valor de referencia de 10 $\mu\text{g/L}$ y se designa como provisional.*” limitando la concentración máxima en aguas de red y de consumo poblacional.

La exposición continua al agua con alto contenido de arsénico provoca pigmentación, hiperqueratosis, ulceración, cáncer de piel y también afecta el hígado, los riñones, el corazón y los pulmones [Litter M. 2010; Bulletin of the World Health Organization, 2000 pp. 78]. La toxicidad aguda de los compuestos de arsénico en los seres humanos está también relacionada con la velocidad de eliminación por el organismo afectado. En este sentido, la arsina se considera la forma más tóxica, seguida por los arsenitos, los arseniatos y los compuestos orgánicos de arsénico. Los compuestos solubles de arsénico tanto pentavalente como trivalente se absorben rápida y ampliamente en el tracto gastrointestinal. El metabolismo del mismo se caracteriza por su reducción y su metilación oxidativa, formando productos mono-, di- y trimetilados que serán excretados por orina.

Dentro de los países más afectados por aguas contaminadas con arsénico se encuentra la Argentina en conjunto con Chile y México, con un indicador estimativo de población crítica a exposición de aproximadamente 14 millones de personas [Bundschu et al. 2008; Nonna Silva, 2006]. Se han realizado varios estudios exhaustivos en distintas regiones de la Argentina para

conocer la distribución regional de arsénico siendo las provincias más afectadas Santiago del estero, Chaco, Santa Fe, Salta, Tucumán y La Pampa [Nonna Silva, 2006]. Investigaciones realizadas entre los años 2016 y 2017, financiadas por el Ministerio de Salud Nacional de Argentina, informó niveles de arsénico en agua del 32,5% del país. Siendo que el 29,2% de los departamentos evaluados del país presentaban valores hasta 10 µg/L de arsénico. Por su parte, la contaminación de los acuíferos por arsénico en la provincia de Buenos Aires de debe principalmente a contaminaciones provenientes del acuífero Pampeano y del acuífero Puelche principalmente [Litter et al., 2019].

En el año 2007 el código alimentario Argentino (CAA), en los artículos 982-983, adoptó el límite recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo que la máxima concentración tolerable de As en el agua es de 10 µg/L. Llegado el año 2012, el CAA comunicó la prórroga por cinco años más de la implementación del nuevo valor guía de As en agua para consumo humano, reportando falta de sustento científico a treves de la Resolución Conjunta 34/2012 y 50/2012 con fecha de sanción 16 de febrero del año 2012 y publicada en el Boletín Nacional el 02 de marzo del mismo año. Actualmente, a través del Artículo 982 y 983 (Resolución Conjunta SCS y SAByDR N° 22/2021) el CAA a partir del 18 de agosto de 2021, dictamino un plazo de trescientos sesenta y cinco días corridos para la adecuación de la concentración de arsénico con un límite de tolerancia de 0,01mg/L (10 µg/L) indicado por la OMS. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen nuevas resoluciones [Recuperado el 29 de noviembre de 2023 de <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>].

Respecto a las características organolépticas, los productos y/o aguas contaminadas con arsénico no presentan color, olor o gusto por lo que generalmente los individuos no son conscientes de ello ni de sus consecuencias. La ingesta prolongada de dicho metaloide por aguas y/o alimentos contaminados puede provocar distintas patologías, entre ellas el hidroarsenismo crónico endémico, HACRE que se manifiesta con alteraciones en la piel a nivel palmo-plantar. Comienza con una hiperhidrosis, es decir, sudoración excesiva de pies y manos. Sigue con una hiperqueratosis con aparición de callosidades que se agrietan y se tornan dolorosas volviéndose invalidantes para las personas afectadas. Conlleva a melanodermia (manchas oscuras) o leucodermia (zonas decoloradas) en forma de gotas de lluvia que, posteriormente, pueden malignizarse a cáncer de piel [“The International Programme on Chemical Safety (IPCS)” OMS, 2004. Http: who.int/publications/i]. Dicha enfermedad se manifiesta después del consumo prolongado de arsénico y puede evolucionar a la muerte por

cáncer [Biagni et al., 1966]. En este contexto, la IARC “Agencia Internacional de Investigación del Cancer” clasifica al arsénico dentro del grupo 1, debido a sus acciones tóxicas y carcinogénicas [IARC 2008-2012].

Además, el arsénico ingerido en bajas dosis, puede provocar otros tipos de cánceres, como el de pulmón, vejiga, hígado y riñón. También, puede producir afecciones cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes [Litter, 2010]. En la siguiente imagen (imagen 1) se ejemplifica una de las alteraciones dérmicas provocada por el consumo crónico de arsénico.



Imagen 1. Fotografía ilustrativa de las alteraciones dérmicas recuperada del artículo “Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh” de los autores Allan H. Smith, Elena O. Lingas & Mahfuzar Rahman (2000).

Los signos y síntomas que desarrolla el HACRE, suelen aparecer luego de los siete años de exposición en promedio [OMS, 2002; Trelles et al., 1970]. Siendo la peor de las consecuencias la muerte, con un 30% de muerte asociadas a diversas neoplasias malignas debido al HACRE [Litter, 2010].

Dada la elevada implicancia en la salud humana ha sido necesario desarrollar sistemas de detección de arsénico en agua con adecuado límite de detección y cuantificación. En este sentido, la OMS es clara respecto a los métodos actualmente utilizados para dicho fin y a partir del año 2022 describe que “Se dispone de un método espectrofotométrico de dietilditiocarbamato de plata (ISO 6595:1982) para la determinación de arsénico; el límite de detección es de aproximadamente 1 µg/L. El AAS de horno de grafito, el AAS de generación

de hidruros y el ICP-MS son más sensibles. HPLC en combinación con ICP-MS también se puede utilizar para determinar diversas especies de arsénico. Es técnicamente factible lograr concentraciones de arsénico de 5 µg/L o menos utilizando cualquiera de los varios métodos de tratamiento posibles. Sin embargo, esto requiere una cuidadosa optimización y control del proceso, y una expectativa más razonable es que se puedan alcanzar 10 µg/L mediante el tratamiento convencional (por ejemplo, coagulación)” [Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda, OMS 2022 pp. 343]. Dentro de este marco, es esencial encontrar un sistema efectivo que permita la determinación y/o monitoreo para la contaminación de aguas con metales o metaloides, como el arsénico. Siendo un desafío, incluso en la actualidad, ya que los métodos convencionalmente utilizados son costosos y requieren de personal capacitado. En lo que respecta a los mecanismos de detección económicos, las técnicas colorimétricas se pueden considerar fáciles de aplicar y rentables para la detección sensible de iones metálicos en soluciones acuosas [Boruah et al., 2019]. En este sentido, la agregación de nanopartículas metálicas (NPMs) debido a la adición de iones metálicos genera cambios en el color original de la suspensión, apreciables a simple vista, siendo el principio básico en la detección colorimétrica de iones metálicos en solución [Priyadarshini et al., 2017; Wang et al. 2013].

Por lo mencionado anteriormente, la presencia de arsénico en agua es un problema a nivel mundial ya que afecta la salud humana por consumo de agua y alimentos contaminados. Considerando al arsénico como una amenaza importante para la salud pública, este trabajo plantea el desarrollo y la utilización de un sistema-biosensor con capacidad de detección cualitativa, colorimétrica, de arsénico con el objeto de propiciar la prevención frente al uso de aguas contaminadas. Además, se espera que, a futuro, pueda emplearse para detectar más de un metaloide contaminante, constituyendo una técnica fácil y efectiva para el reconocimiento de otras sustancias en distintas matrices, ya sean orgánicas o inorgánicas, para uso dentro del área de la salud así también como para el medioambiente, bionanotecnología o cualquier otro ámbito requerido.

Bionanobiotecnología.

La bionanotecnología involucra frecuentemente el uso de bacterias como productos biosustentables ya que permiten desarrollar una amplia gama de aplicaciones, desde la biorremediación del suelo o de aguas [Canals et al. 2005; Randy et al. 1999], hasta la reproducción in vitro para purificación de proteínas recombinantes o la generación de biofármacos [Sanchez, 2020].

Las proteínas de capa-S (SLP) se encuentran presentes en especies de los dominios *Archaea* y *Bacteria* tanto Gram positivas como Gram negativas. Son parte de una envoltura de proteínas monomoleculares rígida con capacidad autoagregante [Claus et al., 2005]. Las SLP se encuentran dentro de la capa más externa de la estructura celular y tienen un rol importante en la supervivencia de los organismos [Messner et al., 2009].

Una de las propiedades más destacables de las SLP es su capacidad de autoensamblaje, aspecto que se ha estudiado y aplicado en diversos campos. Las SLP forman un arreglo ordenado regular, una estructura bidimensional cuasi cristalina, que puede tener simetrías, oblicuas (p1, p2), cuadradas (p4) o hexagonales (p3, p6) [Sleytr et al., 2014]. Dependiendo del tipo de geometría, la unidad morfológica consiste en una, dos, cuatro, tres o seis subunidades proteicas o glicoproteicas respectivamente, que tienen una separación entre núcleos de un rango entre 4 y 35 nanómetros. Las redes de SLP son altamente porosas, con poros que pueden ocupar desde un 30% hasta un 70% de la superficie bacteriana [Sleytr et al., 2014]. Las subunidades de SLP se unen entre sí por enlaces no covalentes y por esta razón, pueden ser liberadas fácilmente por tratamiento sencillos con variaciones en el entorno circundante [Sára et al., 2000]. El autoensamblaje de las subunidades de SLP, como se mencionó anteriormente, ha sido estudiado exhaustivamente dilucidando que el ensamblaje de las mismas comienza con una rápida formación de precursores oligoméricos y sigue con un lento reordenamiento, que conduce a redes extendidas [Jaenicke et al., 1985]. Las subunidades se mantienen juntas y se unen a la superficie celular subyacente mediante interacciones no covalentes [Hynönen et al., 2013; Pum et al., 2013]. Asimismo, las subunidades proteicas suelen poseer pocos o ningún aminoácido que contengan azufre, pero son ricas en aminoácidos hidrofóbicos. Por esta razón, se considera que la unión no covalente durante el autoensamblado proteico se rige a través de interacciones hidrofóbicas que, a su vez, se encuentra impulsada por un proceso entrópico. Consecuentemente, se considera que la unión entre las subunidades se encuentra determinada por la secuencia aminoacídica y por la estructura terciaria que se adquiere en la conformación de menor energía [Sleytr et al., 1975].

Los microorganismos del género *Lentilactobacillus kefir*, fueron estudiados por su capacidad para interactuar con metales demostrando la facultad que promueven las SLP para captar cationes bivalentes como plomo, cadmio, níquel y zinc a través de la coordinación con los grupos carboxilo de los residuos de Asp y Glu que involucran, a su vez, coordinaciones adicionales de los grupos aminos del péptido [Mobili et al., 2013]. Este hecho ha demostrado que la interacción del metal con la bacteria es un proceso de superficie, conocido como biosorción [Mobili et al., 2013]. En este contexto, en los últimos años se han estudiado diversas

aplicaciones para las proteínas de capa-S extraídas del género *Lentilactobacillus*, debido a sus propiedades fisicoquímicas, que las convierten en una estructura con un alto grado organizativo y alto potencial de aplicación en el campo de las biociencias y nanobiotecnología.

Debido a la afinidad por distintos metales y su capacidad de autoensamble en solución, in vitro se han reportado numerosos trabajos en los que se emplearon diferentes SLP para obtener arreglos metálicos nanométricos. Por ejemplo, se reportó la obtención de nanopartículas de paladio y platino sobre SLP a través de la síntesis por reducción [Mertig, 1999], y la obtención de bionanocatalizadores de plata y platino sobre SLP [Huggias et al., 2020; Huggias et al., 2021], entre otros.

Extracción o aislamiento de las proteínas de capa-S.

Las técnicas de aislamiento y purificación de proteínas de capa-S implican el uso distintos agentes disruptivos de enlaces puentes de hidrógeno, como los agentes caotrópicos (urea, clorhidrato de guanidina o cloruro de litio), los detergentes (Triton X100 o SDS dodecilsulfato de sodio), agentes quelantes como el EDTA y recientemente se ha comprobado la extracción con soluciones salinas con el NaCl en alta concentración como sustitución de cationes [Campostagno, 2022; Huggias et al., 2021; Pum et al., 2013, Schuster, et al., 2013]. Luego de la extracción, se ha reportado in vitro que las proteínas de capa-S tienen la capacidad intrínseca de formar productos autoensamblados en solución en distinta disposición como vesículas, cintas, láminas planas y tubos [Sleytr, 2014]. Además, pueden reensamblarse en monocapas o bicapas sobre soportes sólidos como materiales plásticos, siliconas, láminas de oro; en la interfase aire-agua y en películas lipídicas; también, pueden recubrir liposomas, nanocápsulas y nanopartículas por completo [Pum et al., 2013; Schuster et al., 2004]. Esta propiedad, es una de las características explotadas en el desarrollo de bionanocatalizadores, carriers para biomoléculas, soportes, biosensores, dispositivos diagnósticos, entre otros [Ulman, 1996; Sleytr et al., 2014; Ilk et al., 2011; Pum et al., 2013; Wang et al., 2015].

El oro como metal de elección.

Como se mencionó previamente, la nanotecnología ha avanzado rápidamente en las últimas décadas de la historia implicando su avance en la obtención de arreglos nanométricos con la idea de mejorar propiedades y aplicaciones de distintos materiales a partir de las propiedades fisicoquímicas y/o biológicas de los mismos [Puy, 2016]. Asimismo, las nanopartículas son utilizadas como sensores para la detección de distintos metabolitos y/o elementos debido a su alta sensibilidad [Kim et al., 2009; Byrne et al., 2008]. Las

nanopartículas de metales como el oro o la plata, presentan el fenómeno de resonancia de plasmon superficial localizada o LSPR por sus siglas en inglés “*Localized Surface Plamon Resonance*”. Este fenómeno se produce por la oscilación colectiva de los electrones de las superficies de las nanopartículas, que es inducido dentro de un campo magnético. La interacción electrostática entre el núcleo y los electrones, genera una fuerza que produce la oscilación de la nube electrónica relativa al núcleo. Siendo un efecto físico el motivo por el cual, cuando en la banda de conducción de una nanopartícula incide una fuerza electromagnética, provoca la resonancia de los electrones dentro de la misma [Anker et al., 2008; Wei et al., 2018]. En esta línea, a partir de la incidencia de las ondas sobre las partículas se puede dilucidar la morfología y tamaño de las mismas, así también como sus espectros visibles [Herves et al., 2012; Priyardarshini et al., 2017]. La coloración de la suspensión de nanopartículas metálicas dependerá del entorno local inmediato de la nanopartícula lo que significa que la naturaleza y composición de la capa eléctrica alrededor de las NPMs o el índice de refracción de medio líquido, pueden tener una gran influencia, así también como la naturaleza del metal [Murray et al., 2007].

Las nanopartículas de oro, AuNPs, se sintetizan a partir de iones en solución mediante reducción química o biológica. Por lo general, el proceso ocurre en dos pasos, uno de nucleación y uno siguiente de crecimiento sucesivo. El crecimiento isotrópico espontáneo genera AuNPs esencialmente esféricas y el crecimiento anisotrópico, generalmente forzado, generará nanopartículas de una variedad de formas [Parab et al., 2010]. Por lo general, una sal de oro (fuente de iones metálicos) se reduce mediante la adición de un agente que conduce a la nucleación de Au(III) en nanopartículas. En tal proceso, los compuestos orgánicos se usan como agentes estabilizadores, como el citrato de sodio, que en algunos casos también pueden actuar como agentes reductores [Zhao et al., 2008; Turkevich et al., 1951]. Se ha dilucidado que durante su formación, las nanopartículas de oro son sensibles a las variaciones en el proceso, como la temperatura y la velocidad de agitación, pH, entre otras [Cruz et al., 2012].

Retomando con la característica óptica principal que presentan las nanopartículas, el LSPR para el oro se produce a longitudes de onda en torno a 520 nm, mientras que, por ejemplo, para la plata está en torno a 420 nm [Murray et al., 2007]. Se ha reportado previamente que el acoplamiento de la resonancia de plasmon produce desplazamientos en la longitud de onda de absorción producto del acercamiento entre las nanopartículas metálicas. Siendo que la proximidad entre ellas genera el acoplamiento plasmónico, induciendo un pico máximo alrededor de los 600 y 650 nm, desplazando su posición original de 520 nm [Huang et al., 2010]. Este cambio en la absorción UV-Vis induce un cambio en la coloración de la suspensión

de las nanopartículas virando del rojo o color burdeos inicial, hacia el azul o púrpura dependiendo de su intensidad. Además, este cambio en la longitud de absorción se puede visualizar a simple vista de manera macroscópica en la suspensión conteniendo las nanopartículas [Cruz et al., 2012]. Este fenómeno, es el que se utiliza en la era moderna, para el diseño de ensayos colorimétricos basados en el control de la agregación de las nanopartículas metálicas en solución y funcionalización de las mismas, como se mencionó anteriormente.

A su vez, una particularidad que presentan las AuNPs es que poseen una relación superficie/volumen que pueden ser controlada y biocompatibilizada utilizando distintos ligandos que varíen su tamaño, forma y superficie química. [Cruz et al., 2012] Las AuNPs esféricas exhiben una gama de colores en solución acuosa a medida que el tamaño en la nucleación aumenta de 1 a 100 nm, mostrando una banda de absorción entre los 500 a 550 nm en el espectro del UV-Vis. Sin embargo, esta banda de absorción no se encuentra en nanopartículas cuyo diámetro es menor a 2 nm [Godoy, 2017].

En estudios previos se ha reportado la síntesis y funcionalización de nanopartículas metálicas con distintos metabolitos para la detección de varios tipos de sustancias, utilizando el fenómeno plasmónico. Algunos ejemplos de ellos son la funcionalización con tioles [Lin et al., 2004], con restos de cisteína [Gonzalez et al., 2021], nanopartículas recubiertas con citrato [Gong et al., 2017], funcionalizadas con glucosa [Boruah et al., 2019] o utilizadas como plantillas para nanopartículas electromagnéticas de oro [Selenska-Pobell et al., 2011]. A su vez, se han detectado por este método, distintos iones metálicos [Chen et al., 2014; Harisha et al., 2021], proteínas [Thanh et al., 2002] así también se han desarrollado AuNps funcionalizadas con tioglucosa para detectar aniones fluoruro en agua [Wanatabe et al., 2005], entre otras. En lo que respecta al presente trabajo de investigación se realizó la síntesis de nanopartículas de oro por reducción de su precursor metálico desarrollándose sistemas tanto estabilizados como soportados utilizando proteínas de capa-S de *Lentilactobacillus kefir* cepa CIDCA 8348.

OBJETIVOS

Objetivo general

Como objetivo general este trabajo se plantea la preparación y caracterización de nanobiosistemas obtenidos a partir de proteínas de capa-S, aislada de *Lentilactobacillus kefiri*, utilizadas como plantillas para la formación de arreglos regulares de nanopartículas de oro. Una de las aplicaciones propuestas del sistema nanoestructurado es su utilización en la detección de arsénico en aguas lo que tiene un impacto notorio en la salud humana y el medio ambiente.

Objetivos específicos

- Extraer y purificar proteínas de capa-S (SLP) de una cepa de *Lentilactobacillus kefiri* CIDCA 8348
- Sintetizar nanopartículas de oro soportadas sobre las proteínas de capa-S aisladas utilizando diferentes reductores.
- Obtener nanopartículas de oro coloidales que serán estabilizadas con las proteínas de capa-S aisladas.
- Caracterizar los nanobiosistemas preparados para evaluar sus propiedades de superficie (plasmón de resonancia superficial).
- Evaluar la aplicación de los nanobiosistemas como sensores (nanosondas) para la detección colorimétrica de arsénico en agua

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de proteínas de capa-S (SLP) de *L. kefir*.

Reactivos y Buffers utilizados

- Albúmina de Suero Bovino, grado de hidrólisis 5 (BSA, Sigma Aldrich >98%).
- 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, Biorad).

Tinción de Gram

- Cristal violeta: 10 g/l en agua destilada.
- Safranina (solución madre): 25 g/l en etanol.
- Safranina (solución de trabajo): solución madre diluida 1/10.
- Lugol: 10 g I₂ + 20 g KI en 1 litro de agua destilada.

Descripción de buffers utilizados

Buffer A: buffer tris(5×10^{-2} M)/cloruro de guanidinio (5 M); 7,878 g Tris-Cl y 477,65 g cloruro de guanidinio, ajuste a pH final de 7,2; en un volumen de 1000mL.

Buffer B: buffer tris (5×10^{-2} M)/EDTA (1×10^{-3} M); 7,878 g de Tris-Cl y 0,2922 g de EDTA, ajuste a pH final de 7,8 con NaOH 1M, en un volumen de 1000mL.

Buffer PBS: NaCl 8,02 g; NaH₂PO₄ 1,17g; K₂HPO₄ 0,2g; pH 7.2 en un volumen final de 1000mL.

Todos los buffers y soluciones se prepararon en agua Milli-Q obtenida empleando un equipo Heal Force SMART SERIES.

Cultivo de *Lentilactobacillus kefir*

Se utilizó una suspensión bacteriana de *L. kefir* CIDCA 8348, conservada a -80°C en leche descremada estéril.

Se tomaron 50,00 µL de la suspensión y se inocularon en 10,00 mL de caldo MRS estéril y se incubaron en estufa a 32°C durante 48 hs. Luego se realizó un repique, llevando el

cultivo inicial de 10,00 mL a 500,0 mL de caldo MRS. Finalmente, esta suspensión se incubó a 32°C por 48 hs.

Con el propósito de verificar la pureza y características sencillas del cultivo se realizaron extendidos empleando la coloración de Gram.

Tinción de Gram:

Se toma un anada del cultivo bacteriano y se la coloca en un portaobjeto. Se fija la muestra mediante calor. Se cubre la muestra con cristal violeta durante 2 minutos, se descarta el exceso y se agrega lugol, incubando 30 segundos. Luego se lava con alcohol-acetona. Se lava con agua bidestilada y por último se adiciona safranina y se deja 2 minutos. Se lava con agua y se reserva para observación al microscopio óptico.

Extracción de proteínas de capa-S (S8)

El cultivo bacteriano obtenido se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. El *pellet* resultante se resuspendió en 10,00 mL de buffer PBS estéril a fin de realizar el lavado de las bacterias. Se realizaron 3 lavados consecutivos centrifugación/resuspensión con buffer PBS.

El *pellet* obtenido luego de los lavados, finalmente, se resuspendió en 5,00 mL de buffer A y se llevó a 37°C durante 20 minutos en agitación a fin de extraer la proteína S8. El buffer A contiene cloruro de guanidinio que es un disruptor proteico que permite la extracción de la S8 de la superficie del *L. kefiri* dejando la fracción proteica en solución. La suspensión se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos y, luego, el sobrenadante que contenía las proteínas de capa-S (S8) se dializó empleando una membrana de celulosa (Sigma Aldrich) contra buffer B en agitación por 48 hs, a temperatura ambiente. El dializado obtenido se transfirió a un tubo y se reservó en heladera 4°C hasta su utilización.

La SLP aislada se dividió en dos fracciones, la primera denominada S8 y la segunda denominada S8_{sb}. Esta segunda fracción corresponde al sobrenadante obtenido luego de centrifugar la S8 aislada a 3500 rpm durante 2 min obteniéndose una suspensión translúcida de S8.

Cuantificación de SLP

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo según el método de Bradford [Bradford, 1976]. Este método, se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente

de extinción mayor que el colorante libre y un máximo de absorbancia en 620 nm. Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido y con pocas sustancias interfieren en su determinación. La curva de calibración se preparó utilizando un stock de seroalbúmina bovina de 10,00 mg/mL. Las muestras se prepararon tomando 10,00 μl de suspensión de proteína y adicionando 200,00 μl del reactivo de Bradford. De igual manera, se preparó cada punto de la curva de calibración, la cual se construyó con concentraciones que van desde 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 1 mg/mL. Previo a su determinación la muestra de S8 sufrió una dilución 1/5.

La absorbancia fue medida a 620 nm en un lector de microplacas Multiskan Go microplate spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific).

Caracterización analítica de la SLP

Se obtuvo el espectro de absorción Uv-vis del extracto de SLP (S8) empleando un espectrofotómetro de doble haz (CINTRA 20, GBC Scientific Equipment) en el rango de longitudes de onda de 200 a 700 nm. Para la obtención de las medidas de absorbancia se emplearon cubetas de cuarzo de 1,00 cm de camino óptico y 4,00 mL de capacidad volumétrica. El blanco espectrofotométrico se realizó empleando agua milli-Q.

Para la caracterización de la muestra se realizó una dilución de la suspensión proteica inicial con agua milliQ, en un factor de 1/3, llevando a un volumen total en cubeta de 1,20 mL.

Obtención de nanobiosistemas: proteína de capa S (S8) / nanopartículas de oro (AuNPs).

Reactivos utilizados

- Ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Biopack).
- Borohidruro de Sodio (NaBH_4 , Panreac).
- Citrato de Sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba).
- Cloruro de Sodio (NaCl , Anedra).
- Hidrogeno gaseoso (H_2 , N50, 99,999%, Air Liquide).

Síntesis de AuNPs soportadas sobre S8 utilizando diferentes métodos de reducción

Se sintetizaron nanopartículas de oro soportadas sobre proteína S8 mediante impregnación de la sal metálica sobre S8 y posterior reducción del metal. A fin de evaluar el efecto de diferentes reductores se obtuvieron tres sistemas uno obtenido a partir de la reducción

con hidrogeno y otro sistema reducido inicialmente con hidrógeno seguido del agregado de borhidruro de sodio en dos concentraciones. EL BH_4Na es un reductor más fuerte que el hidrogeno

1. Au/S8 reducción con H_2

En un primer experimento se colocaron 3,00 mL de una suspensión de S8 1,76 mg/mL, en contacto con 400 uL de una solución de ácido cloroáurico 0,025 M durante 24 hs. a temperatura ambiente en oscuridad. Luego del período de incubación, se procedió a realizar una reducción en corriente de H_2 (caudal: 30 mL/min) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sistema se reservó a temperatura ambiente durante 24 hs. no observándose cambios macroscópicos luego de ese periodo. Este primer sistema fue denominado **Au/S8- H_2** .

Cabe destacar que el sistema Au/S8- H_2 no se utilizó como tal por no presentar la coloración característica de las suspensiones de AuNPs (roja) necesaria para una caracterización mediante espectroscopía UV-Vis.

2. Au/S8 reducción con H_2 seguida de NaBH_4

Se obtuvieron nanopartículas de oro soportadas sobre S8 utilizando NaBH_4 como reductor fuerte en dos concentraciones 0.02 M y 0.002 M.

Para ello se tomaron dos alícuotas de 1,50 mL de la suspensión conteniendo Au/S8- H_2 y se les agregó, a una primer fracción, 20,00 μL de NaBH_4 0,02 M y a la segunda fracción 20,00 μL de concentración 0,002 M. En ambos casos se observó una coloración rojo vinoso/burdeos de la solución inmediatamente después del agregado del reductor, característica de la formación de NPs de oro. Debido a que los sistemas no presentaron diferencias observables a simple vista, ambos se denominaron **Au/S8- NaBH_4** .

3. Au/S8_{sb} reducción con NaBH_4

La suspensión de proteínas de capa-S de 1,76 mg/mL (S8) fue centrifugada a 10.000 rpm durante 2 minutos. Se tomó 1,00 mL del sobrenadante y se lo contactó con 0,15 mL de ácido cloroáurico 0,025 M. La mezcla se incubó por 24 hs. a temperatura y presión ambiente. Luego se adicionaron 20,00 μL de NaBH_4 0.02 M observándose una coloración rojo vinoso/burdeos inmediatamente luego del agregado. Este tercer sistema fue denominado **Au/S8_{sb}- NaBH_4** .

Obtención de nanopartículas de oro coloidales estabilizadas

La síntesis de nanopartículas de oro coloidales se realiza típicamente a partir de la sal metálica mediante una reducción rápida a temperatura de ebullición del solvente en presencia de reductores como el ácido cítrico, citrato de sodio o borohidruro de sodio. Sin embargo, uno de los mayores problemas de las AuNPs coloidales suele ser su estabilidad, las AuNPs suelen sinterizarse con el tiempo y desestabilizarse por lo cual se propuso estabilizarlas utilizando la proteína de capa S (S8). En este sentido la síntesis se llevó cabo en dos etapas: una primera etapa se síntesis de NPs de oro coloidales, seguida del proceso de estabilización con S8.

1. Síntesis de nanopartículas de oro coloidal (AuNPs_{col})

En un vaso de precipitados, se colocaron 50,00 mL de una solución 5×10^{-4} M de ácido cloroáurico, la solución se llevó a ebullición en agitación constante. Alcanzada la ebullición se agregó 1,00 mL de ácido cítrico $3,4 \times 10^{-2}$ M. La solución se mantuvo en ebullición y agitación durante el período de una hora. Con el propósito de evitar la aglomeración de las nanopartículas debido a la evaporación del solvente se mantuvo el volumen constante mediante el agregado de agua Milli-Q. Concluida la síntesis, el sistema se llevó a temperatura ambiente y luego se conservó refrigerado y en ausencia de luz. Las nanopartículas de oro coloidales obtenidas se denominaron **AuNPs_{col}**.

2. Estabilización de las nanopartículas de oro coloidal con S8

La estabilización de las AuNPs_{col} con S8 se realizó mediante la adsorción física de las proteínas de capa-S por simple combinación de ambas suspensiones.

En una primera instancia, se evaluó la cantidad de SLP necesaria para estabilizar las AuNPs_{col} sintetizadas previamente. En estos ensayos se contactaron distintos volúmenes de una suspensión de S8 de concentración 0,58 mg/mL, con una cantidad constante de 100,00 µl de suspensión de nanopartículas de oro coloidales (AuNPs_{col}) según se indica en la tabla 1, todos los sistemas fueron llevados a un volumen final de 150,00 µl utilizando agua milli-Q. Los sistemas de AuNPs_{col} estabilizados con las S8 fueron denominados **AuNPs_{col}-S8**.

Tabla 1. Condiciones experimentales para la obtención de AuNP_{Scol} estabilizadas con S8.

AuNP _{Scol} -S8 _i	Volumen S8 (μL)	Masa S8 (mg)	AuNP _{Scol} (μL)	[S8] _{final} (mg/mL)
AuNP _{Scol} -S8 ₁	10,00	0,006	100,00	0,04
AuNP _{Scol} -S8 ₂	20,00	0,012	100,00	0,08
AuNP _{Scol} -S8 ₃	30,00	0,018	100,00	0,12
AuNP _{Scol} -S8 ₄	40,00	0,023	100,00	0,16
AuNP _{Scol} -S8 ₅	50,00	0,029	100,00	0,19

Previo a continuar se presenta en el siguiente esquema un resumen del proceso de obtención de todos los sistemas obtenidos (tanto AuNPs soportadas sobre S8, como AuNP_{Scol} estabilizadas con S8)

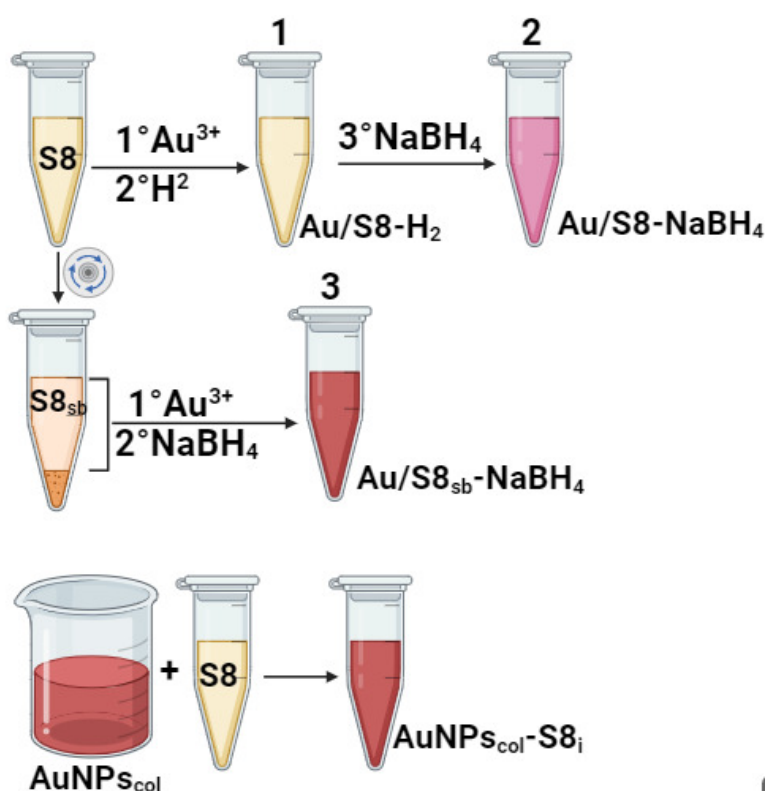


Imagen 2. Esquema de la obtención de las nanopartículas de oro soportadas en S8 y obtención de nanopartículas de oro coloidales estabilizadas con S8.

Caracterización de los sistemas

Evaluación de la estabilidad de los sistemas

Test de sal

Frente al agregado de NaCl 10% p/v, las nanopartículas cuya estabilización es

insuficiente, tienden a aglomerarse producto de la elevada fuerza iónica a la que son sometidas. Esta agregación se evidencia a través de un cambio de color de la suspensión pasando de un tono rojo vinoso original a uno azul-violáceo dentro de los 5 a 10 minutos luego del agregado el cloruro de sodio.

Para llevar a cabo el test de sal, se pusieron en contacto 150,00 μL de los nanobiosistemas conteniendo nanopartículas de oro estabilizadas con distintas cantidades de S8 ($\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$) con 10,00 μl de una solución de NaCl 10% p/v, para comprobar la estabilidad de las nanopartículas. Se observó el cambio de color de las suspensiones de $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$ luego de 5 a 10 minutos de iniciado el test. Por otro lado, con la finalidad de analizar los resultados obtenidos en períodos de tiempo mayores, los sistemas se mantuvieron en reposo durante 1,5 hs a temperatura ambiente, luego de lo cual fueron evaluados (por observación) nuevamente.

A fin de comparar los resultados se realizaron los controles correspondientes: para ello las $\text{AuNP}_{\text{Scol}}$ (nanopartículas de oro coloidales sin estabilizante) se sometieron al mismo tratamiento, mientras que otra fracción de las mismas no fueron tratadas.

Caracterización analítica de los sistemas

Espectroscopía UV-Vis

Una de las formas de caracterizar estos sistemas nanoestructurados es la determinación del plasmón superficial mediante medida espectrofotométrica UV-Visible. Por ello se obtuvieron los espectros de absorción UV-Vis de todos los sistemas obtenidos empleando un espectrofotómetro de doble haz (CINTRA 20, GBC Scientific Equipment) en el rango de longitudes de onda de 200 a 700 nm. Para la obtención de las medidas de absorbancia se emplearon cubetas de cuarzo de 1,00 cm de camino óptico y 4,00 mL de capacidad volumétrica. En todos los casos se realizaron medidas del blanco espectrofotométrico empleando agua milli-Q.

Todos los espectros UV-visibles que se presentan en este trabajo fueron normalizados para mayor claridad visual en las comparaciones entre sistemas [Jung et al., 2019]. La normalización matemática se realizó dividiendo los valores de absorbancia (A_{λ_i}) por el valor máximo de absorbancia presentado en cada espectro ($A_{\lambda_{\text{max}}}$) según:

$$A_{\text{normalizada}} = \frac{A_{\lambda_i}}{A_{\lambda_{\text{max}}}}$$

Detección colorimétrica de Arsénico

A fin de evaluar la aplicación del nanobiosistema desarrollado se estudió la capacidad de estos sistemas de interactuar con arsénico (V), lo que indicaría si es posible su utilización como biosensores de As(V).

Reactivo utilizado

- HNa_2AsO_4 (Carlo Erba).

El análisis de la respuesta del sistema frente a la presencia de Arsénico (V) se llevó a cabo poniendo en contacto 1,00 mL de $\text{Au/S8}_{\text{sb}}\text{-NaBH}_4$ y $\text{AuNPs}_{\text{col}}\text{S8}_4$ con distintos volúmenes de una solución de HNa_2AsO_4 de concentración variable, llevando en todos los casos a un volumen final de 1,2 mL según se puede observar en la tabla 2.

Tabla 2. Obtención de diferentes soluciones de As(V)

[As] M	Volumen (mL)	[As] _{final} M
0,00025	5	1×10^{-6}
0,00025	10	2×10^{-6}
0,00025	48	1×10^{-5}
0,0025	10	2×10^{-5}
0,0025	19	4×10^{-5}
0,0025	48	1×10^{-4}
0,25	2,4	5×10^{-4}
0,25	4,8	1×10^{-3}
0,25	24	5×10^{-3}
0,25	48	1×10^{-2}
1	60	5×10^{-2}

La detección se llevó a cabo mediante la observación del cambio de coloración del sistema luego de 5 minutos de contacto con el As(V). Adicionalmente, se midieron los espectros UV-Vis de cada suspensión como fue descrito en la sección “Caracterización analítica de los sistemas”. La presencia de un cambio en el color es indicativa de la agregación de las nanopartículas de oro soportadas sobre S8 o estabilizadas con S8 en presencia de arsénico.

Interacción del bionanosistema con otros analitos

Reactivos utilizados:

- Acetato de cobalto tetrahidratado ($\text{Co}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, Mallinck rodt).
- Acetato de Zinc dihidratado ($\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, Mallinck rodt).
- Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Biopack).
- Cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Cicarelli).
- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mallinck rodt).
- Cloruro de níquel hexahidratado ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Hopkin & Williams).
- Dióxido de manganeso (MnO_2 , Biopack).
- Nitrato de aluminio nano-hidratado ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Riedel-de Haen).
- Nitrato cúprico trihidratado ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Mallinck rodt).
- Nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, Biopack).

Con el objetivo de evaluar la capacidad de los bionanosistemas como sensores colorimétricos frente a distintos metales, se evaluó la respuesta visual de cambio de color y plasmónica cuando se ponen en contacto con diferentes sales metálicas llevando adelante el protocolo que fue mencionado en el apartado anterior.

La respuesta ante distintos metales se evaluó mediante espectrofotometría UV-Vis poniendo en contacto los sistemas Au/S8-NaBH₄, Au/S8_{sb}-NaBH₄ y AuNPs_{col}S8₄ con sales Al⁺³, Ca⁺², Co⁺², Cu⁺², Fe⁺³, Mg⁺², Mn⁺⁴, Ni⁺², Pb⁺², Zn⁺². En todos los casos 1,00 mL del nanobiosistema se puso en contacto con distintos volúmenes de una solución 0,25 M de cada metal, logrando cuatro concentraciones finales de cada uno de ellos de $2,5 \times 10^{-4}$, 5×10^{-4} , 2×10^{-3} y 1×10^{-2} .

Luego de 5 min de realizado el contacto entre el nanobiosistemas y la solución metálica se observó a ojo desnudo el color y se midieron los espectros UV-Vis de cada suspensión como fue descrito en la sección “Caracterización analítica de los sistemas”.

Lo mencionado fue realizado tanto empleando los sistemas descriptos, como utilizando el control positivo AuNPs_{col}. En todos los casos antes de cada medida se realizó un blanco reactivo empleando agua milli-Q.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cultivo de *Lentilactobacillus kefir* y extracción de proteínas de capa-S (S8)

De las observación macroscópica del cultivo de *Lentilactobacillus kefir* CIDCA 8348 en 10,00 mL de caldo MRS se observó un crecimiento típico de este lactobacillus luego de 48 hs. de incubación, donde se puede ver en la imagen 3 la turbidez del medio y un depósito sobre la base y las paredes del tubo.



Imagen 3. Inóculo bacteriano en caldo de cultivo MRS.

Con el objetivo de describir en mayor profundidad el cultivo bacteriano obtenido se llevó a cabo una tinción de Gram de un extendido del cultivo obtenido. La coloración de Gram es una técnica de coloración diferencial muy utilizada en bacteriología, llamada así en honor al investigador que la desarrolló Gram 1884. Esta coloración permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos, Gram positivas y Gram negativas, además constituye un test sencillo pero grosero de determinación de posibles contaminaciones de los cultivos. En este sentido, la imagen 4 muestra una distribución homogénea de bacilos largos de color violeta típicos de *L. kefir*. Por lo cual puede concluirse que hay presencia de bacilos Gram positivos sin contaminación evidente.

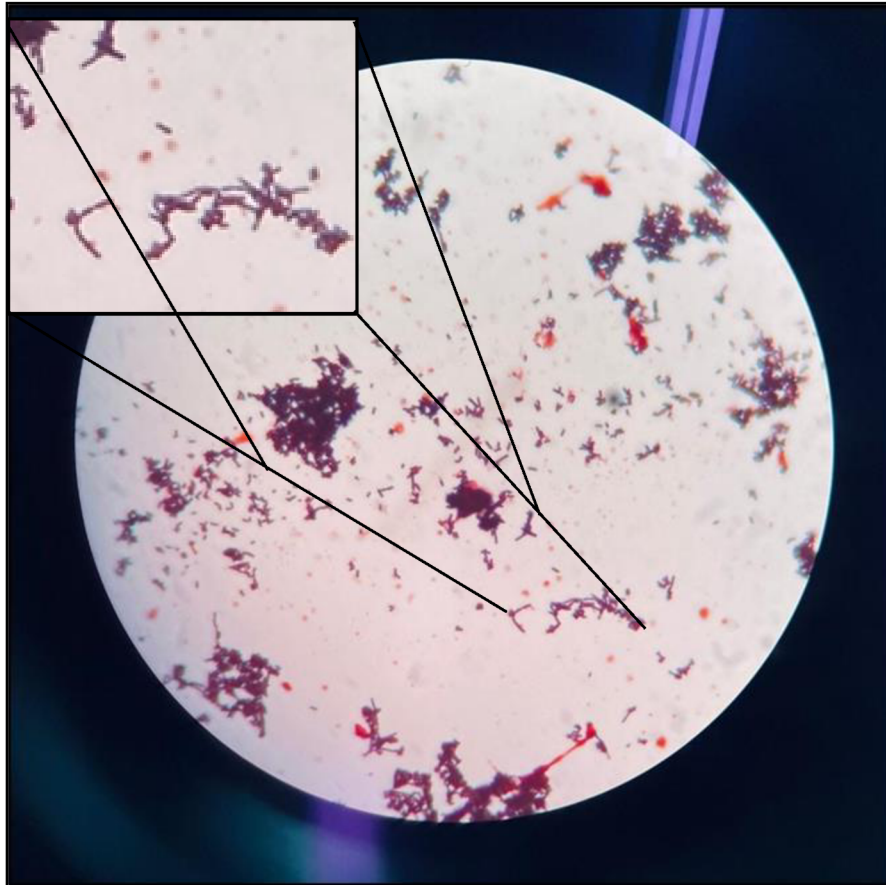


Imagen 4. Tinción de Gram del cultivo de *L. kefir* CIDCA 8348.

Como último paso de la extracción de la proteína S8 se procedió a dializar la proteína extraída para eliminar el agente caotrópico y suspenderla en buffer adecuado para los ensayos posteriores. En la imagen 5 se muestra la suspensión proteica extraída, S8, mientras se dializa (A) y luego de la diálisis (B). La suspensión obtenida mostró una coloración amarillo-opaco translúcida característica de las SLP extraídas en presencia de cloruro de guanidinio (caotrópico) (imagen 5, A). Luego del proceso de diálisis, la suspensión adquirió un aspecto más turbio y con una coloración blanquecina final, lo cual se asocia al estado de agregación de las SLP en el buffer B (imagen 5, B). Este aspecto macroscópico es típico de las suspensiones de SLP de distintas cepas de *L. kefir*.

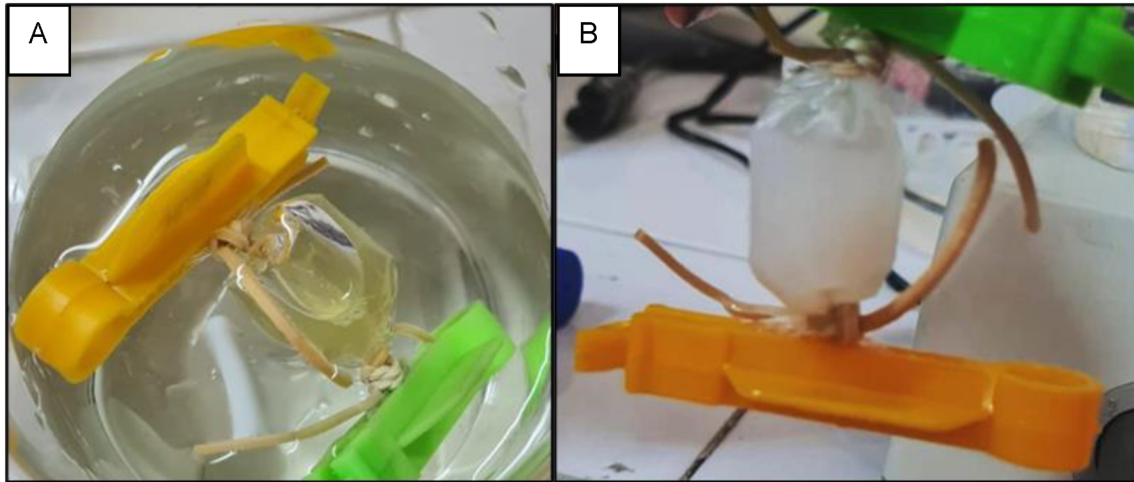


Imagen 5. Suspensión de las SLP extraídas, previo a la diálisis (A). Suspensión de las SLP extraídas, luego de la diálisis (B).

Cuantificación de SLP

El método de cuantificación utilizado para conocer la concentración de proteínas en el extracto inicial fue el método colorimétrico de Bradford, para el cual se construyó una curva de calibración con BSA que se presenta en el gráfico 1.

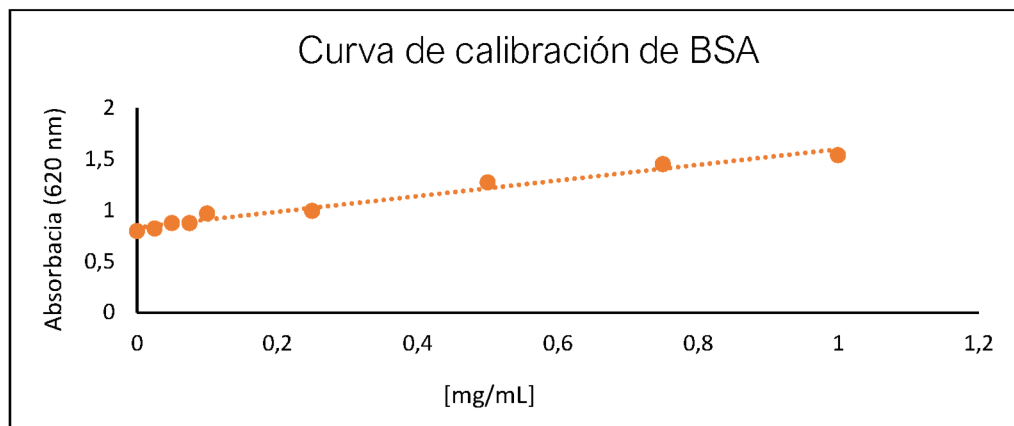


Gráfico 1. Curva de calibración de BSA, utilizada para la cuantificación proteica.

Del análisis de cuadrados mínimos de la curva de calibración empleando BSA se obtuvo la siguiente ecuación: $y = 0,7662x + 0,8313$. Utilizando la curva presentada, se obtuvo la concentración de proteínas en el extracto purificado (S8), la cual resultó ser de 1,76 mg/mL.

De la misma forma, se obtuvo la concentración de S8_{sb} (obtenida luego del proceso de centrifugación descrito en la sección "Extracción de proteínas de capa-S (S8)" la cual resultó ser de 0,205 mg/mL.

Caracterización analítica de la SLP

Con el propósito de describir el aporte espectroscópico de las proteínas de capa-S se llevaron a cabo medidas espectrofotométricas en la región UV-Visible entre los 200 y 700 nm. En el gráfico 2 se muestra el espectro obtenido para el extracto de las S8 luego de ser dializada. Como puede observarse, la suspensión de S8 presenta dos bandas de absorción ubicadas en la región ultravioleta del espectro con máximos en 221 y 263 nm. Estas bandas son típicas de uniones peptídicas y de estructuras proteicas con aminoácidos que presenta grupos aromáticos en su estructura. El pico observado a los 263 nm podría corresponderse a la absorción por parte de residuos de fenilalanina. A su vez, el pico correspondiente a 221nm se atribuye a la absorción por parte de los enlaces peptídicos de la proteína [Beaven & Holiday, 1952]. Además, el espectro visualizado en el gráfico resulta coincidente con los reportados en bibliografía para SLP de *Lactobacillus acidophilus* [Eslami et al., 2013].

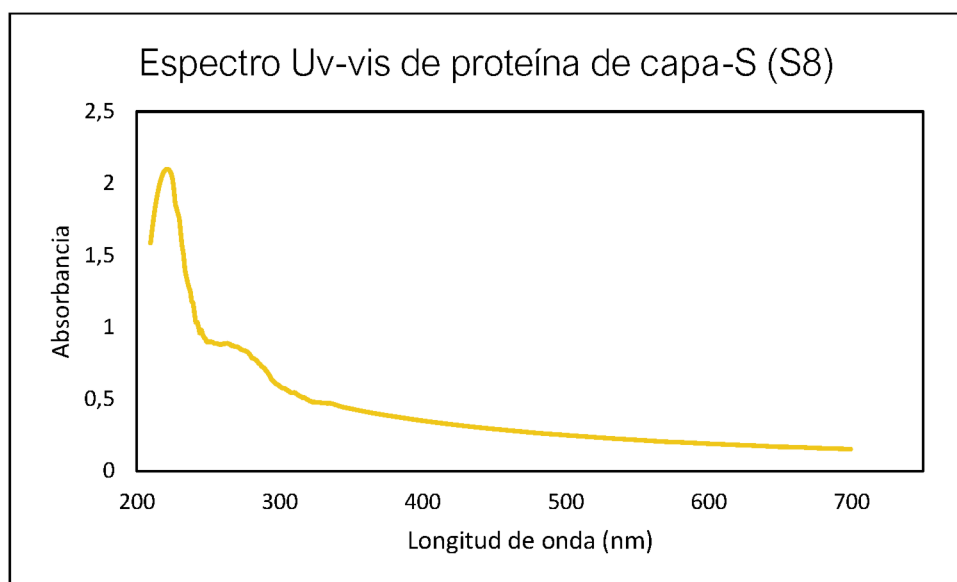


Gráfico 2. Espectro Uv-visible en la región 200-700 nm de las suspensiones de S8.

No se observaron picos de absorbancia de la proteína S8 en la región visible. Esta información resulta relevante considerando que, la banda de resonancia de plasmon superficial de las nanopartículas de oro se encuentra alrededor de los 520 y 550 nm, según lo reportado en a [Boruah et al., 2019; Murray et al., 2007; Priyardarshini et al., 2016], con posibles desplazamientos por agregación de las AuNPs hacia longitudes de onda mayores cercanas a los 650-700 nm aproximadamente [Huang et al., 2010]. Considerando que las proteínas de capa-S serán utilizadas para estabilizar o soportar nanopartículas de oro, el hecho de que su absorbancia no interfiera en la región plasmónica del metal permite descartar la contribución de las S8 en los espectros Uv-visibles analizados de aquí en adelante.

Obtención de nanobiosistemas: proteína de S8 / AuNPs. Síntesis de AuNPs soportadas sobre S8 utilizando diferentes métodos de reducción

1. Au/S8 reducción con H₂

El proceso de reducción con corriente de hidrogeno gaseoso tiene la ventaja de ser fácil, eficiente y ocurre de manera rápida. En los últimos años se han reportado investigaciones en los cuales el H₂ es utilizado como agente reductor dando buenos resultados para la obtención de bionanocatalizadores y nanopartículas de oro obtenidas empleando bacterias enteras y proteínas de capa-S como soporte [Merroun et al., 2007; Bolla et al., 2020a,b]. En este trabajo se propuso en primera instancia obtener AuNPs soportadas sobre SLP y reducidas con H₂ gaseoso. Luego del tratamiento de reducción en corriente de hidrógeno no se observaron cambios macroscópicamente visibles, por lo que se procedió a reservar la muestra al resguardado de la luz envolviendo al recipiente con papel aluminio y en heladera durante 24 hs. El nanobiosistema obtenido mediante este mecanismo de reducción fue denominado Au/S8-H₂.

Terminado el periodo de reposo, no se observaron cambios en la suspensión de Au/S8-H₂ y se decidió realizar un segundo tratamiento de reducción más drástico empleando un agente reductor más fuerte como el borohidruro de sodio (NaBH₄).

2. Au/S8 reducción con H₂ seguida de NaBH₄

El agente reductor, NaBH₄, fue utilizado en dos concentraciones 0.02 M y 0.002 M y aplicado directamente sobre la suspensión conteniendo el sistema Au/S8-H₂. Mediante el empleo del agente reductor en cada una de las concentraciones mencionadas, se observó un rápido cambio de color del blanquecino original hacia una coloración anaranjado-rojiza debido a la turbidez de la suspensión, el color rojizo es típico de la formación de AuNPs, como se puede observar en la imagen 6. La utilización de las distintas concentraciones de reductor no mostró diferencias macroscópicas del sistema con lo cual se concluyó que la concentración del reductor no afecta sus propiedades macroscópicas (en término de su coloración y estabilidad coloidal), por lo que se utilizó preferentemente el sistema obtenido empleando NaBH₄ 0.02 M.

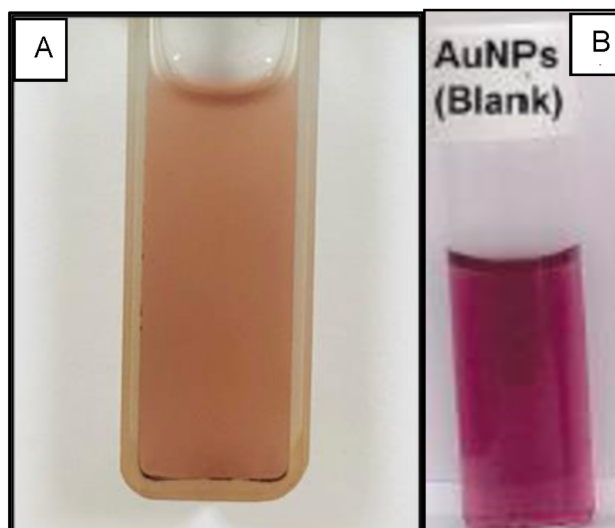


Imagen 6. A: Suspensión del sistema Au/S8-NaBH₄, B: AuNPs extraídas de la investigación “Highly selective and sensitive colorimetric detection of arsenic (III) in aqueous solution using green synthesized unmodified gold nanoparticles.” De los autores Harisha K.S, Narayana B., Sangappa Y. (2021).

Luego de su obtención, se procedió a analizar espectroscópicamente el sistema Au/S8-NaBH₄, como resultado del mismo no se logró evidenciar con claridad el plasmon superficial característico de las nanopartículas de oro esperado como se puede apreciar en e

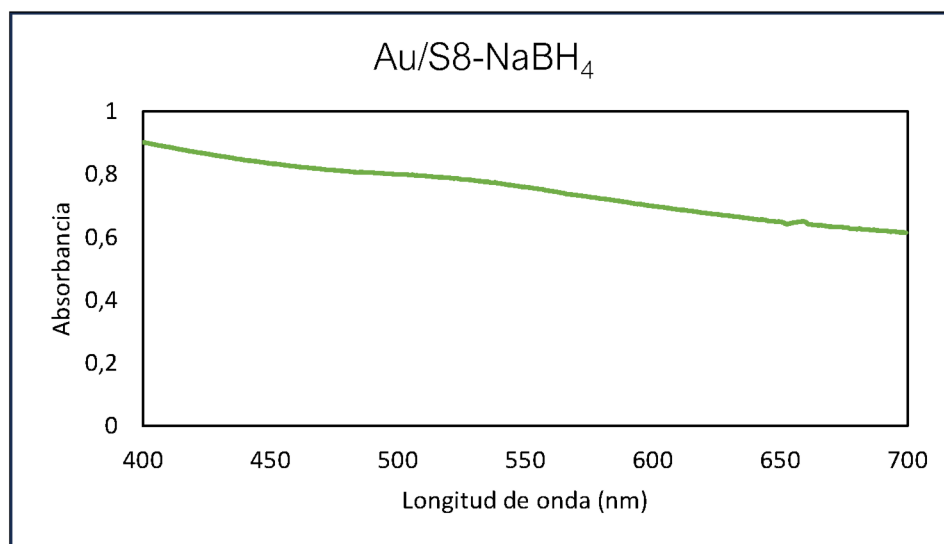


Gráfico 3. Espectro del sistema Au/S8-NaBH₄.

Este hecho, se vinculó con el estado de agregación de las S8 utilizadas, producto del cual la suspensión presentó elevada turbidez, resultando en la dispersión del haz de luz durante la medición, con la consecuente interferencia sobre la absorción de las nanopartículas de oro presentes en el sistema. Esta explicación se puede visualizar a partir de la observación de la

solución, la cual presentaba un aspecto turbio y pálido (imagen 6 A) respecto del color rojizo intenso translúcido reportado en trabajos revisados bibliográficamente, como puede observarse en la imagen 6 (B) [Jung et al., 2019; Lakatos et al., 2015].

Producto de la ausencia de una señal plasmónica detectable para el sistema Au/S8-NaBH₄ el mismo no fue tenido a cuenta posteriormente para el análisis de la respuesta frente a arsénico.

Dada la relevancia de la señal plasmónica y de su nitidez se procedió a modificar el protocolo con el propósito de obtener sistemas con menor turbidez.

Como se describe en la sección “Extracción de proteínas de capa-S (S8)” se centrifugó el extracto de S8 inicial y se utilizó el sobrenadante de menor turbidez (S8_{sb}) para obtener AuNPs soportadas, utilizando el mismo agente reductor en la concentración más elevada (0,02 M).

3. Au/S8_{sb} reducción con NaBH₄

Luego de realizar el protocolo de incubación de la suspensión S8_{sb} con la sal de oro, se contactó el nuevo sistema con el agente reductor y se observó la aparición la coloración rojo vinosa translúcida esperada (imagen 7). El pasaje de una solución traslucida blanquecina a una rojo vinosa-burdeos, confiere una observación cualitativa que denota en la formación exitosa de nanopartículas de oro soportadas sobre las proteínas de capa-S en los sistemas imagen 6.



Imagen 7. Suspensión de Au/S8_{sb}-NaBH₄

De esta manera, se logró mejorar las propiedades macroscópicas del sistema, obteniendo un nanobiosistema constituido por nanopartículas de oro soportadas sobre S8_{sb}, en una suspensión de aspecto translúcido. A continuación, se presenta una imagen comparativa de los sistemas Au/S8-NaBH₄ vs. Au/S8_{sb}-NaBH₄. En la imagen 8, se puede visualizar la diferencia en la

turbidez con respecto al aspecto original lo que se vincula a una menor concentración proteica y por consecuencia, a una menor turbidez.



Imagen 8. Suspensión de los sistemas conteniendo nanopartículas de oro soportadas sobre proteínas de capa-S. Izquierda: sistema Au/SLP-NaBH₄ (obtenido empleando el extracto completo); derecha: sistema Au/SLP_{sb}-NaBH₄ (obtenido empleando el extracto centrifugado).

A continuación, se presenta el espectro Uv-visible del sistema Au/S8_{sb}-NaBH₄. En el grafico 4, se puede observar un pico máximo de absorción del sistema obtenido a 524 nm, lo que evidencia la presencia de nanopartículas de oro soportadas. La posición del plasmón se corresponde al valor reportado por bibliografía, encontrándose entre los 520 a 550 nm [Ribeiro et al., 2018; Boruah et al., 2019; Jung et al., 2019; Lakatos et al., 2015 & Templeton et al., 2000].

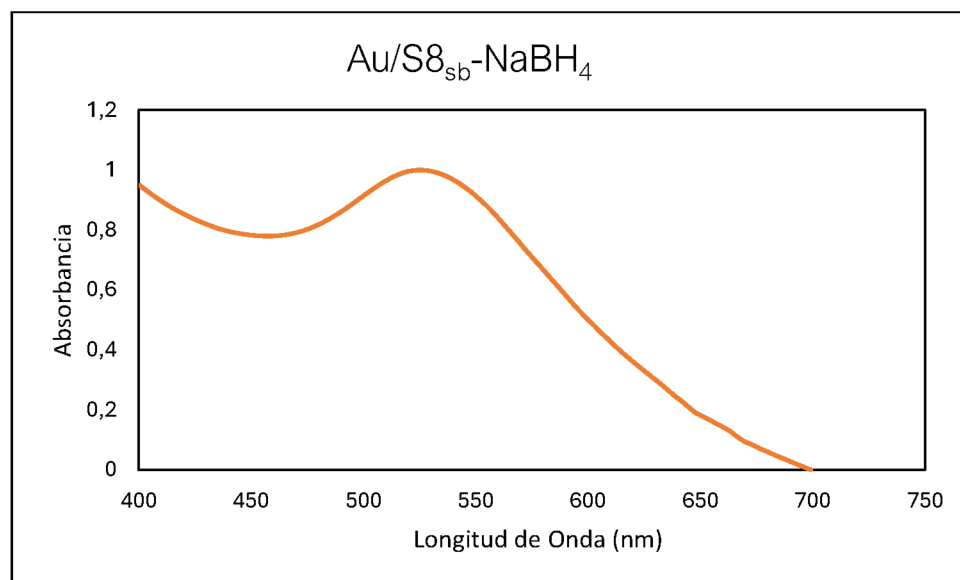


Gráfico 4. Espectro UV-Vis del Au/S8_{sb}-NaBH₄

El sistema obtenido, Au/S_{8sb}-NaBH₄, presentó un comportamiento estable a simple vista durante 48 hs., es decir, sin modificaciones macroscópicas asociadas a la desestabilización de las nanopartículas (cambios en la coloración, aparición de precipitados).

Esta observación se encuentra en concordancia con la hipótesis de que las SLP actúan estabilizando las nanopartículas metálicas, según lo reportado previamente [Janowski et al., 2010; Jung et al., 2019 & Lakatos et al., 2015].

Obtención de nanopartículas de oro coloidales estabilizadas

1. Síntesis de nanopartículas de oro coloidal (AuNPs_{col})

Como se menciona en la sección experimental, la obtención de nanopartículas de oro coloidales se llevó a cabo utilizando el método de síntesis de Frens y Turkevich [Turkevich et al., 1951; Frens 1973]. Durante los primeros segundos del proceso, luego del agregado del reductor, se visualizó un cambio de color de la solución transparente hacia el gris, que luego pasó rápidamente al azul y tras varios minutos se tornó roja derivando al bordo hasta volverse burdeos (imagen 9), color característico de la formación de una suspensión coloidal de nanopartículas de oro esféricas de aproximadamente 20-30 nm de diámetro según se describe en bibliografía [Harisha et al., 2021; Lakatos et al., 2015].



Imagen 9. Suspensión del sistema AuNPs_{col}, nanopartículas de oro coloidal sin estabilización.

El espectro UV-visible obtenido para la suspensión conteniendo nanopartículas de oro

coloidales se presenta en el gráfico 5. El mismo presenta el máximo de absorción a una longitud de onda de 521 nm, este máximo es característico de AuNPs esféricas de entre 15-20 nm de diámetro [Borah et al., 2022]. Se ha reportado que a medida que el diámetro de partícula aumenta, el máximo de absorción de la banda del plasmón superficial se desplaza hacia longitudes de onda mayores [Lakatos et al., 2005; Shrivastava et al., 2015; Smitha et al., 2008; Frens 1973; Turkevich et al., 1951].

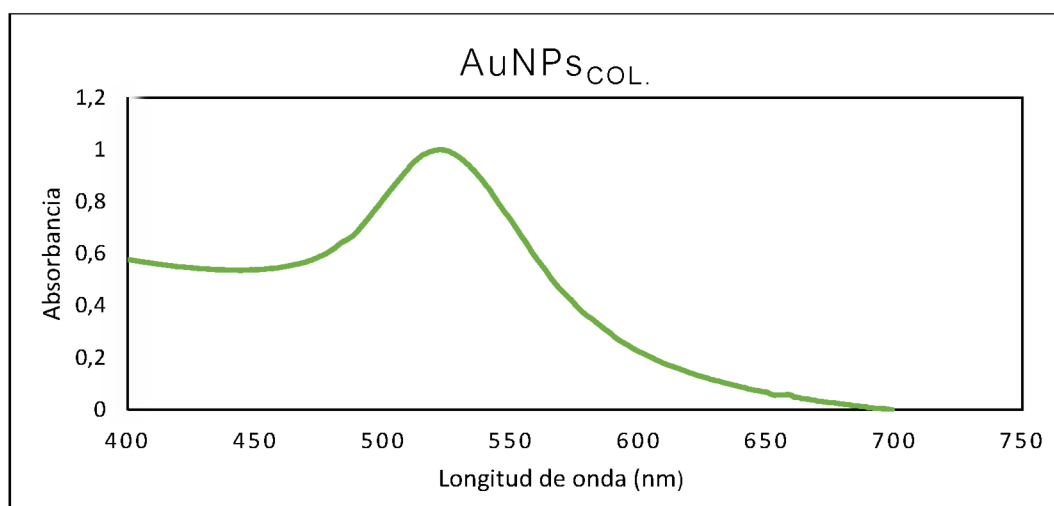


Gráfico 5. Espectro de absorción en el rango 400 a 700 nm de la suspensión de AuNPs_{col}.

2. Estabilización de las nanopartículas de oro coloidal con S8

La estabilización de las AuNPs_{col} obtenidas con las S8, se realizó mediante procesos de adsorción física de las proteínas.

En primer lugar, cabe destacar que luego del agregado de SLP a las AuNPs_{col} no se observaron alteraciones macroscópicas indicadoras de desestabilización (cambios de coloración o precipitación). Sin embargo, la intensidad de color varió ligeramente desde el color bordó original de las AuNPs_{col} hacia un tono más bien rosado, como puede apreciarse en la imagen 9.

Por otro lado, se evaluó la concentración de S8 óptima, necesaria para estabilizar las nanopartículas de oro coloidales (AuNPs_{col}) con el fin de mantener el sistema estable frente a una fuerza iónica elevada. La estabilidad del sistema se analizó visualmente a ojo desnudo (mediante la apreciación de cambios de color y/o aparición de precipitados, ambos indicadores de desestabilización de AuNPs), como también mediante la obtención de espectros UV-vis.

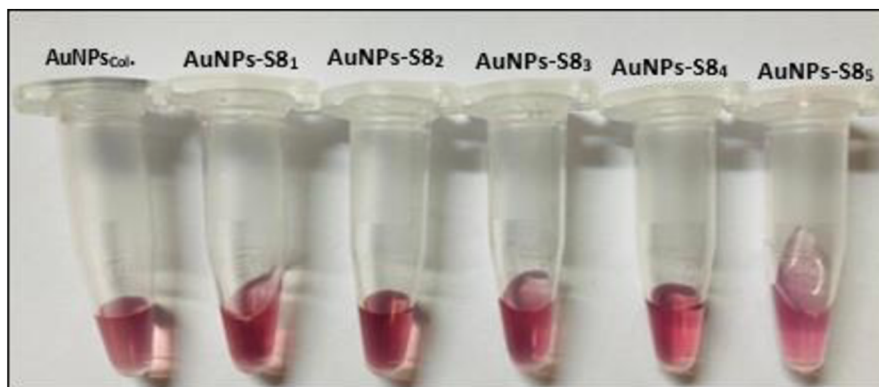


Imagen 10. Suspensiones de $\text{AuNPs}_{\text{col}}$ estabilizadas con diferentes concentraciones de S8.

La estabilización, o la adsorción física de proteínas de capa S sobre las nanopartículas metálicas puede confirmarse por espectroscopia UV-vis ya que, como se ha mencionado, el LSPR depende del entorno y en este sentido de factores como el pH, temperatura, entorno dieléctrico, presión, entre otros [Priyadarshini et al., 2017].

A continuación se muestra el gráfico 5 que presenta los espectros UV-vis de las nanopartículas de oro coloidales ($\text{AuNPs}_{\text{col}}$) y de las nanopartículas de oro coloidales estabilizadas con las proteínas de capa-S ($\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_i}$). Este gráfico es representativo de todas las concentraciones de S8 ensayadas. En todos los casos se obtuvieron gráficos idénticos.

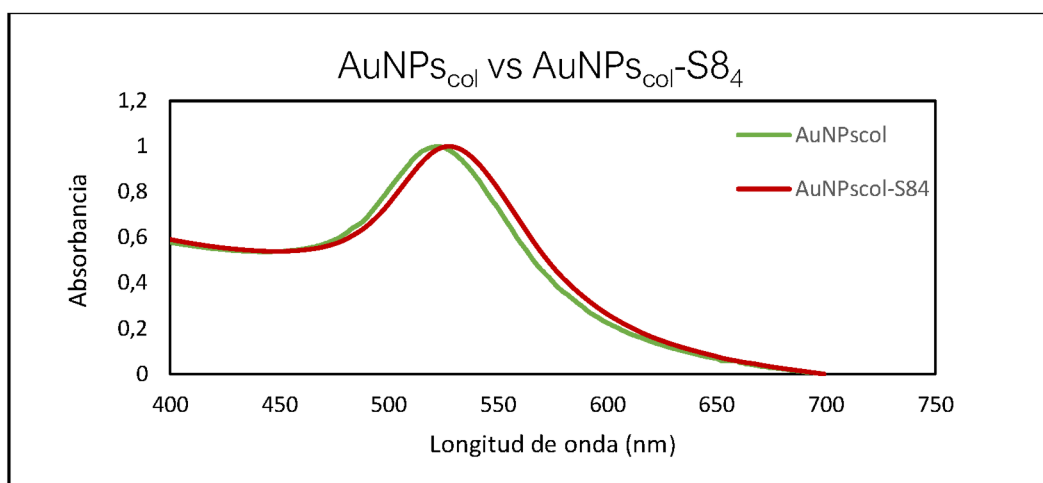


Gráfico 6. Espectros UV-Vis de nanopartículas de oro coloidales en suspensión ($\text{AuNPs}_{\text{col}}$) y $\text{AuNPs}_{\text{col}}$ estabilizadas con proteínas de capa-S ($\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$).

Como puede observarse en el gráfico 6 existe un leve corrimiento del pico máximo de absorbancia del LSPR de las $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_i}$ respecto a las $\text{AuNPs}_{\text{col}}$ (coloidales) hacia longitudes de onda mayores (desplazamiento de 521 nm hacia 527 nm). Este pequeño corrimiento ante la estabilización de AuNPs con SLP ya ha sido reportado previamente y se vinculó con el cambio en el entorno dieléctrico de las nanopartículas metálicas producto de la

interacción con las SLP lo cual impacta directamente en la posición del plasmón [Priyadarshini et al. 2017].

Como se aprecia en el gráfico 5, el espectro UV-vis no presenta señales en el rango 600-700 nm características de AuNPs desestabilizadas, con lo cual, la interacción de las SLP con las AuNPs_{col} no desestabilizaría el sistema sino que modificaría levemente su entorno dieléctrico introduciendo un pequeño desplazamiento del LSPR. El hecho de que la funcionalización de las nanopartículas de oro con las proteínas de capa-S no haya generado un corrimiento del plasmon del oro hacia los 600 nm, es un aspecto a destacar debido a que la asociación de las AuNPs_{col} con las S8 no impactaría negativamente sobre la capacidad de detección del nanobiosistema, ya que si hubiera desplazamientos considerables hacia longitudes de onda mayores o menores, podría verse afectado el posterior proceso de detección de arsénico. Estos resultados concuerdan con los reportados en la bibliografía [Jung et al., 2019].

Por otro lado, se realizó la prueba de sal con el propósito de evaluar la estabilidad coloidal de los sistemas (AuNPs_{col}-S8_i) a elevadas fuerzas iónicas salinas. Este ensayo experimental permitirá seleccionar la concentración de S8 óptima en base a la capacidad de mantener la estabilidad coloidal frente a elevadas concentraciones de NaCl [Geoghegan et al. 1977].

Test de sal con NaCl

La obtención de un sistema estable frente a alta fuerza iónica es de gran interés para la aplicación que se pretende de los mismos como sensores de arsénico (V).

Al respecto, se evaluó la estabilidad de los sistemas de AuNPs_{col} estabilizados con distintas concentraciones de S8 denominados: AuNPs_{col}-S8₁, AuNPs_{col}-S8₂, AuNPs_{col}-S8₃, AuNPs_{col}-S8₄ y AuNPs_{col}-S8₅, en comparación con el sistema coloidal sin estabilizar (AuNPs_{col}).

El test de sal permite evaluar el grado de estabilización de las nanopartículas metálicas. Un cambio de color de la suspensión desde un rojo vinoso original a uno azul-violáceo dentro de los 5 a 10 minutos luego del agregado de NaCl indica la desestabilización del sistema producto de la fuerza iónica. En los experimentos analíticos, se verificó la estabilidad visualmente del sistema durante los primeros 10 minutos luego del agregado de la solución salina y también, luego de 90 minutos, con la finalidad de analizar los resultados obtenidos en períodos de tiempo mayores.

La estabilidad analizada en el test de sal se evaluó, en primera instancia, en término del

cambio de color y presencia de solido cuando se exponen los sistemas $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$ a NaCl 10%. Este análisis resulta relevante ya que si la fuerza iónica logra desestabilizar el sistema, $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$, podría generar falsos positivos durante la aplicación como sensor que no se vincularán con el analito de interés (arsénico).

En la siguiente tabla se resumen los resultados obtenido del test, en función de la coloración del sistema, luego de 10 y 90 minutos de aplicación NaCl 10%p/v, sobre los distintos sistemas $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$. Aquellos ensayos marcados en color rojo indican que el sistema $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$ no varió su coloración ante el test de sal (resultando estable macroscópicamente), por otro lado aquellos resultados marcados en color violeta indican una variación moderada de la coloración (indicando inestabilidad macroscópica) mientras que finalmente, aquellos resultados indicados en color azul se corresponden con sistemas desestabilizados.

Tabla 3. Test de sal sobre los sistemas $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$

Sistemas	Test de NaCl (10 min)	Test de NaCl (90 min)
$\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_1}$		
$\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_2}$		
$\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_3}$		
$\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_4}$		
$\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_5}$		
$\text{AuNP}_{\text{Scol}}$		

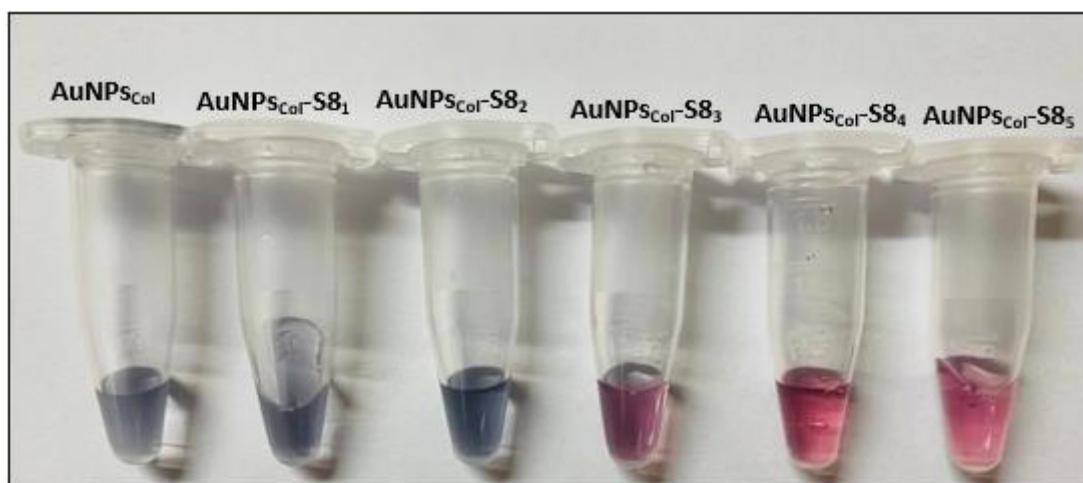


Imagen 11. Resultados del test de sal luego de 5 minutos de contacto de los distintos sistemas $\text{AuNP}_{\text{Scol-S8}_i}$ con NaCl 10% p/v

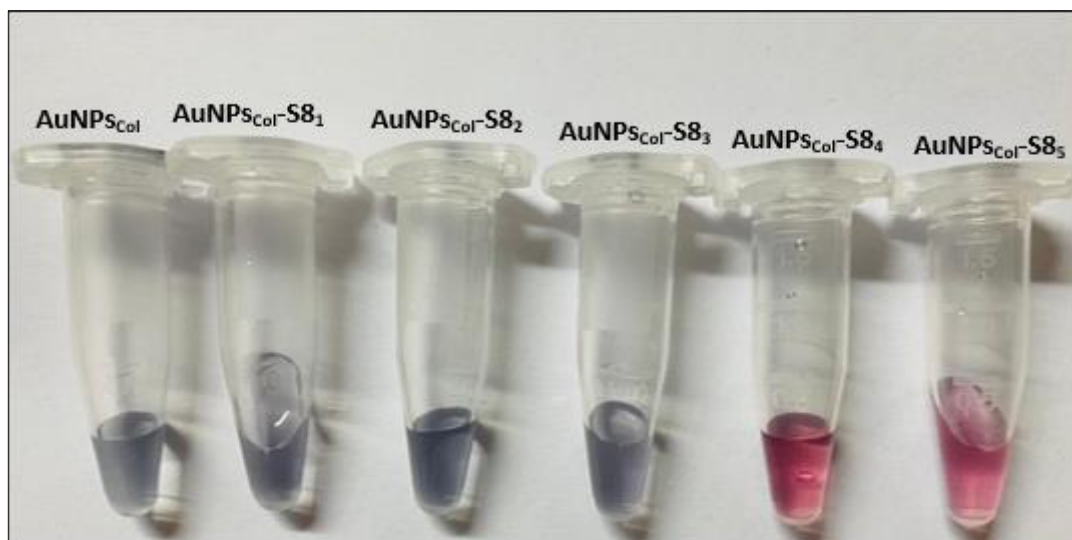


Imagen 12. Resultados del test de sal luego de 90 minutos de contacto de los distintos sistemas $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_i}$ con NaCl 10% p/v

Como se puede observar en las imágenes 11 y 12, los sistemas que contenían menor concentración de proteínas ($\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_1}$ y $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_2}$) viran de color instantáneamente luego del incremento de la fuerza iónica del medio, al igual que ocurre con el blanco o suspensión de partida ($\text{AuNPs}_{\text{col}}$) conformado por las AuNPs sin SLP, es decir, sin estabilización. A su vez, se puede ver que el sistema que contiene una concentración de 0,12 mg/mL SLP ($\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_3}$) mantiene durante los primeros minutos un color similar al característico de las $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_i}$ sin embargo, luego de 90 minutos se desestabiliza y vira al color grisáceo azulado, indicando la aglomeración de las nanopartículas metálicas.

Las observaciones indicarían que los sistemas más estables ante los cambios en la fuerza iónica son aquellos que presentan una mayor concentración proteica, 0,16 mg/mL y 0,19 mg/mL, ($\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ y $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_5}$ respectivamente).

En segunda instancia, se evaluó la estabilidad frente al test de sal mediante espectroscopia UV-vis, con el objetivo de confirmar las observaciones a ojo desnudo. Para este análisis se evaluó el sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ debido a que no presentó desestabilización macroscópica y fue obtenido con la menor cantidad de S8 (criterio de selección que se aclarará más adelante).

En el gráfico 6 se presentan a los espectros obtenidos para el sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ antes y después (90 minutos) del test de sal. Como se puede observar en el gráfico 6, la incorporación de grandes concentraciones de NaCl a la suspensión del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ no generó cambios en el plasmon característico de las nanopartículas de oro, manteniéndose el máximo de absorción del plasmon en 527 nm. De esta forma se confirma la estabilidad coloidal del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ frente a un aumento de la fuerza iónica del medio.

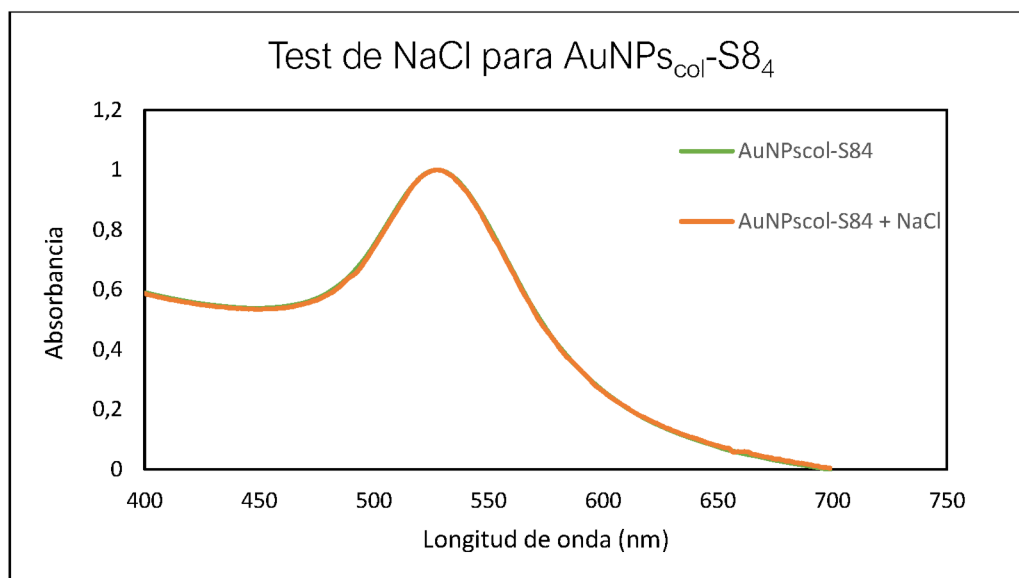


Gráfico 7. Espectros UV-vis del sistema AuNPs_{col}-S8₄ antes y después del test de sal.

Este conjunto de observaciones permite destacar el aporte estabilizante de las S8 en la obtención de sistemas conteniendo nanopartículas de oro. Con el propósito de seleccionar una condición óptima para la obtención de nanobiosistemas estables y adecuados para las aplicaciones propuestas, se tomó el criterio de utilizar la combinación que se mantenga estable (visual y espectroscópicamente) luego de 90 minutos del test de sal y que contenga la menor concentración de proteínas de capa-S. El sistema que cumple las condiciones propuestas es el correspondiente a 0,16 mg/mL de S8 (AuNPs_{col}-S8₄). Este es el sistema seleccionado para realizar los ensayos como biosensor de arsénico y su denominación continuará de aquí en adelante de igual forma, AuNPs_{col}-S8₄.

Evaluación de los sistemas obtenidos frente al arsénico

La detección de arsénico (V) en medio acuoso utilizando Au/S8_{sb}-NaBH₄ y AuNPs_{col}-S8₄ se investigó por ensayos colorímetros a través de espectroscopia UV-visible. Esta técnica que permite medir el corrimiento del máximo de longitud de onda situado a 527 nm por la agregación de las nanopartículas de oro en presencia del metaloide. Esta agregación produce un cambio de coloración perceptible en el visible y por tanto una variación en la señal de absorbancia en la región del plasmón de 520 nm hacia longitudes de onda mayores [Lin et al., 2004; Gong et al., 2017; Silva et al., 2021].

Para la evaluación del límite de detección del bionanosistema como sensor de arsénico se utilizaron soluciones acuosas de concentraciones variables, en el rango de 1×10^{-6} M hasta 5×10^{-2} M de HNa₂AsO₄.

La detección del arsénico se analizó de dos formas, en primer lugar, monitoreando visualmente la coloración del sistema y, por otro lado, recolectando los espectros UV-vis luego de 5 minutos de contacto con el As(V) en las distintas concentraciones analizadas.

Ensayo de la respuesta colorimétrica del sistema Au/S8_{sb}-NaBH₄.

Al contactar dicho sistema frente a la solución de arsénico de mayor concentración ($5 \times 10^{-2} \text{M}$), no se observaron variaciones de color, ni desplazamiento del máximo de absorbancia del sistema Au/SLP_{sb}-NaBH₄ como se puede observar en el gráfico 8. Si bien se aprecia un ensanchamiento de la banda asociada al plasmon del sistema Au/SLP_{sb}-NaBH₄ dicho efecto no resultó suficiente para introducir modificaciones en la coloración del sistema, no pudiendo percibirse respuesta ante el arsénico. Debido a que a esta elevada concentración de arsénico no se observó una respuesta, el análisis a concentraciones de arsénico menores no se llevó a cabo.

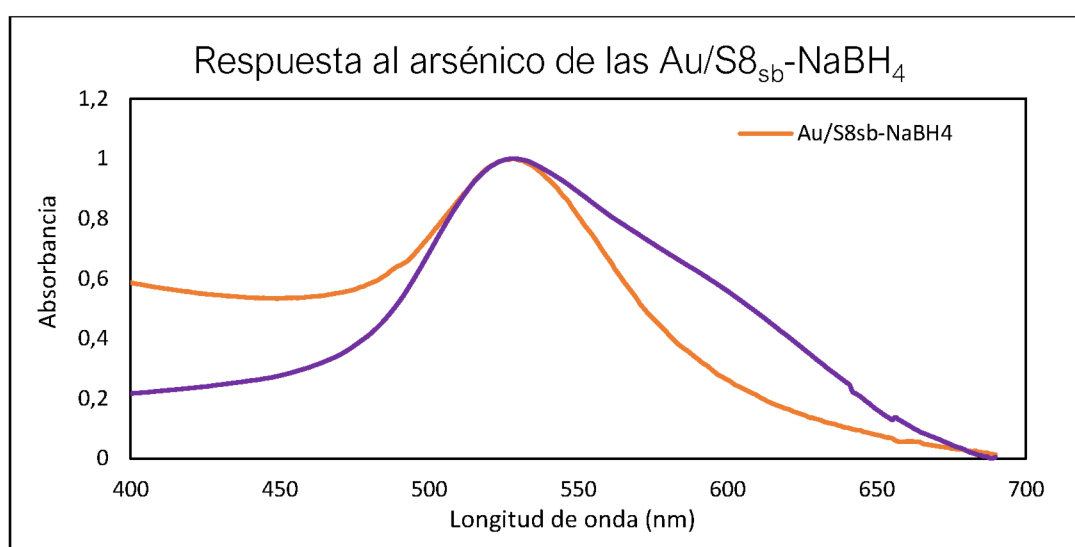


Gráfico 8. Espectros Uv-vis del sistema Au/S8_{sb}-NaBH₄ y del sistema Au/S8_{sb}-NaBH₄ frente a arsénico $5 \times 10^{-2} \text{M}$.

Esta observación podría relacionarse con el tamaño de las nanopartículas de oro soportadas sobre SLP. Como se ha reportado previamente, utilizando las proteínas de capa-S como soporte, las nanopartículas metálicas se nuclean y crecen confinadas a las dimensiones de los poros que poseen las SLP [Bolla et al., 2020(a); Aiken et al. 1999; Fahmy et al., 2006; Selenska-Pobell et al., 2011; Allievi et al., 2011]. Por este motivo, y como se desprende del análisis bibliográfico, el tamaño de las nanopartículas metálicas obtenidas empleando SLP como soporte rondan entre los 2 a 5 nm de diámetro [Bolla et al., 2020(a); Bolla et al., 2020(b); Larginho et al., 2015 & Pum et al. 2009]. Un tamaño tan pequeño de partícula no resultaría óptimo para la detección colorimétrica por desestabilización ya que, para apreciar un cambio

visible se requeriría la agregación de gran cantidad de partículas hasta formar los agregados de alrededor de 200 nm que se han reportado como responsables de la coloración azul característica frente a un agente desestabilizante, tal como el arsénico [Boruah et al., 2019].

Ensayo de la respuesta colorimétrica del sistema AuNPs_{col}-S8₄

Utilizando el sistema obtenido por estabilización de las AuNPs_{col} mediante su recubrimiento con S8 (AuNPs_{col}-S8₄) se realizaron los ensayos descritos en la sección experimental, “Detección colorimétrica de arsénico”.

Al contactar el sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a las soluciones de arsénico de concentración $1,00 \times 10^{-6}$ y $2,00 \times 10^{-6}$ M no se observaron modificaciones en la coloración de la solución luego de 10 minutos y, tampoco se observaron alteraciones en el espectro UV-visible obtenido. A partir de esta observación, se concluyó que el sistema no logra responder de manera apreciable ante dichas concentraciones de arsénico en agua. Debido a la nula respuesta ante ellas, se omitieron en la imagen 12 para una mejor interpretación visual.

Por otro lado, al contactar el sistema con las concentraciones de arsénico pertenecientes al rango entre $1,00 \times 10^{-5}$ a $5,00 \times 10^{-2}$ M, se observaron modificaciones en la coloración de la suspensión en todos los casos analizados. Como se puede apreciar en la imagen 13, al aumentar la concentración de arsénico contactada con el bionanosensor AuNPs_{col}-S8₄, la coloración comienza a variar desde un violeta pálido hacia un violeta intenso, que luego se torna azulada-grisácea en las suspensiones de concentración superior.

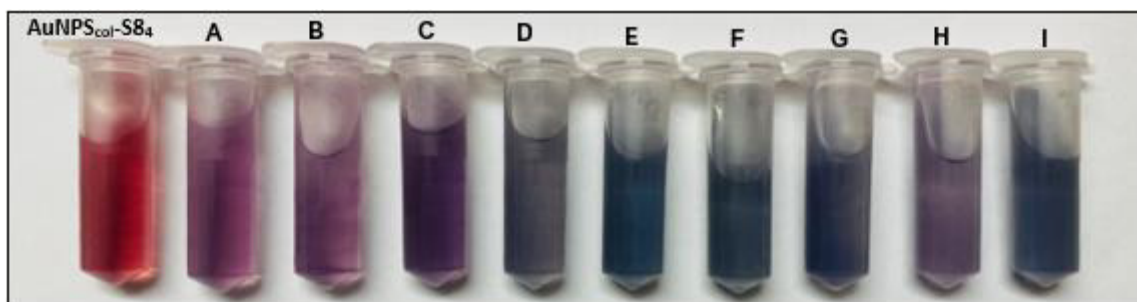


Imagen 13. Resultados macroscópicos de la interacción entre el sistema y las distintas concentraciones de arsénico. (AuNPs_{col}-S8₄: sistema en agua milli-Q, A: $1,00 \times 10^{-5}$ B: $2,00 \times 10^{-5}$, C: $4,00 \times 10^{-5}$, D: $1,00 \times 10^{-4}$, E: $5,00 \times 10^{-4}$, F: $1,00 \times 10^{-3}$, G: $5,00 \times 10^{-3}$, H: $1,00 \times 10^{-2}$ e I: $5,00 \times 10^{-2}$ M).

Antes de presentar los resultados analíticos de la respuesta del sensor AuNPs_{col}-S8₄ se muestra un esquema resumiendo los resultados macroscópicos obtenidos frente a arsénico

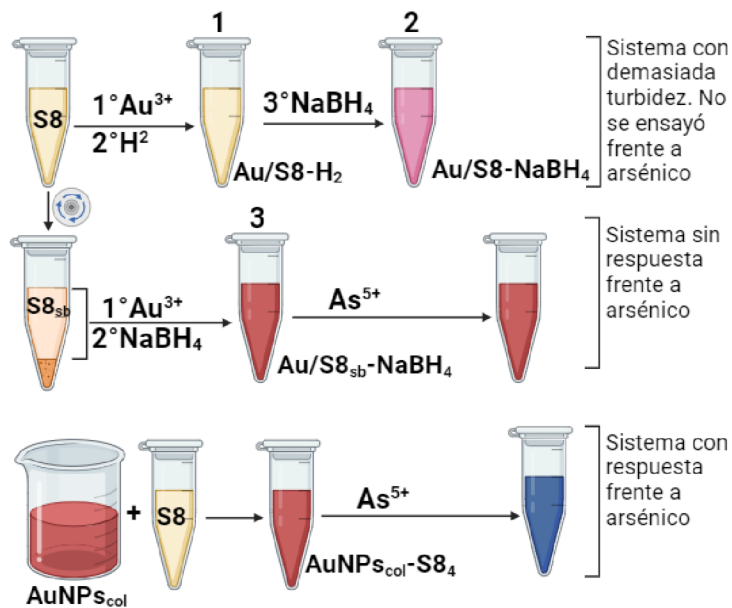


Imagen 14. Esquema de las suspensiones obtenidas al enfrentarlas con arsénico.

El análisis de los espectros de $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ obtenidos frente a las distintas concentraciones de arsénico (V), se realizó en comparación con un espectro base, obtenido para la suspensión del biosensor $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ en ausencia de arsénico. Los espectros se muestran a continuación y se analizarán en etapas conforme aumenta la concentración del arsénico para una mejor descripción.

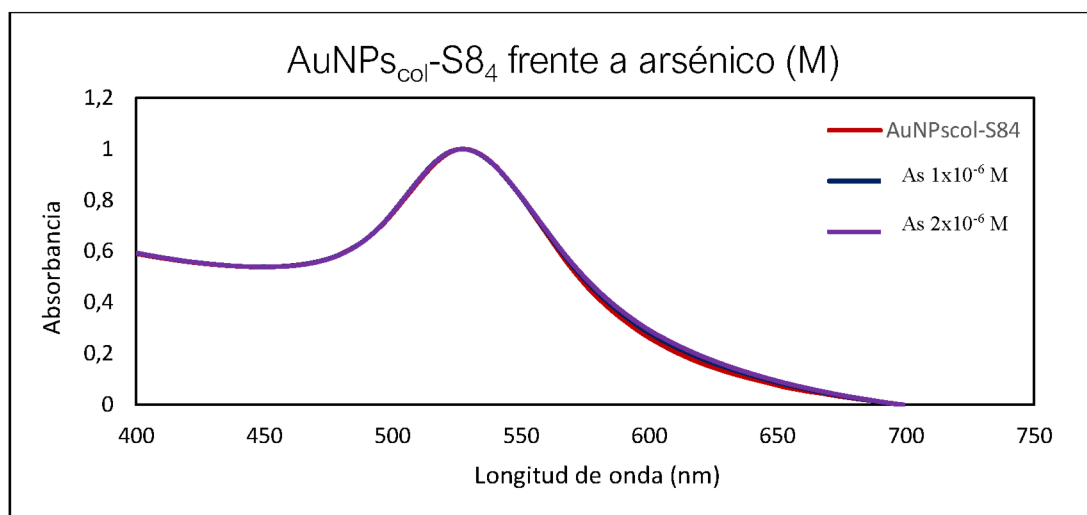


Gráfico 9. Espectros UV-vis del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ y del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ frente a distintas concentraciones del orden micromolar arsénico (V).

Como puede visualizarse en los espectros mostrados en el gráfico 9, no hay una variación significativa en los espectros obtenidos a concentraciones de ordenes micromolares, con respecto al espectro del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$. Lo cual concuerda con lo observado a simple vista, es decir, la nula modificación del comportamiento colorimétrico del sistema

AuNPs_{col}-S8₄ frente a estas concentraciones de arsénico.

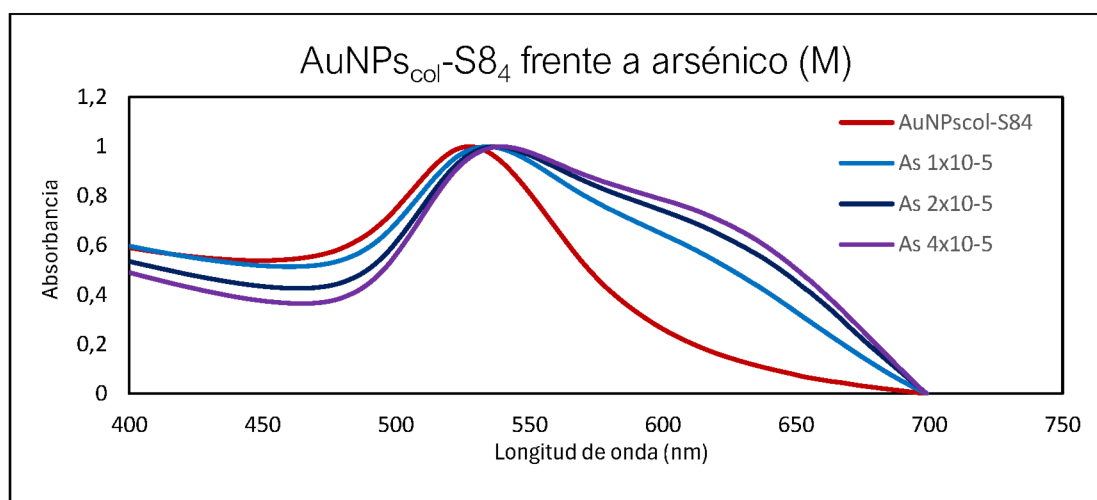


Gráfico 10. Espectros UV-vis del sistema AuNPs_{col}-S8₄ y del sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a distintas concentraciones del analito de interés en el orden de magnitud de 10^{-5} M.

Al contactar el sistema frente a concentraciones del orden de 10^{-5} M, se observó una modificación en la conducta espectral como se observa en el gráfico 10. Se aprecia en los espectros obtenidos una variación respecto al espectro UV-Vis del biosensor (AuNPs_{col}-S8₄), pudiendo vincularse a la aglomeración de las nanopartículas de oro debido a la adición de arsénico en $1,00 \times 10^{-5}$, $2,00 \times 10^{-5}$ y $4,00 \times 10^{-5}$ M de concentraciones. Se observa un corrimiento del máximo de la banda del plasmón de resonancia desde 527 nm (del biosensor) hacia longitudes de onda mayores, de 534, 537 y 539 nm respectivamente. La tendencia al desplazamiento hacia longitudes de onda cercanas a 625 nm se encuentra reportada en bibliografía y se ha vinculado con la banda característica de AuNPs aglomeradas de forma completa (alcanzando un tamaño aproximado de 200 nm) localizada alrededor de los 650-700 nm [Boruah et al., 2019]. De igual manera, lo propuesto se encuentra respaldado por el cambio de color visible en las soluciones de la imagen 13, los cuales muestran una mayor coloración violácea e intensidad de tono a medida que aumenta la concentración del analito problema.

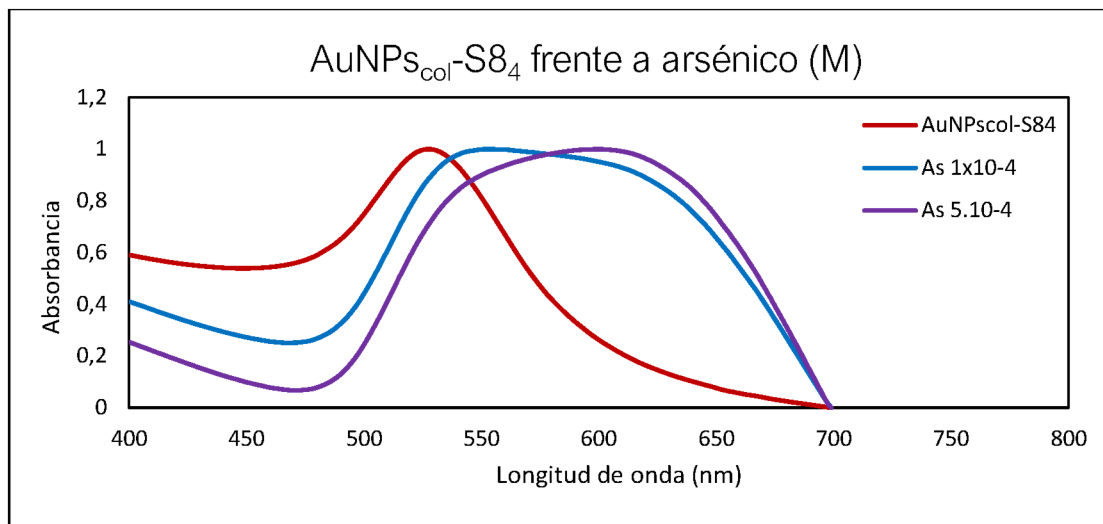


Gráfico 11. Espectros UV-vis del sistema AuNPs_{col}-S8₄ y del sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a distintas concentraciones del analito de interés en el orden de magnitud de 10⁻⁴M.

Los espectros obtenidos para el biosistema bajo concentraciones de arsénico de ordenes de magnitud de 10⁻⁴ M, muestran un corrimiento del máximo de absorción aún más marcado. Como se puede apreciar en los gráficos 9 y 10, las bandas de absorción presentan hombros y picos ensanchados, en distinta proporción. Este hecho podría vincularse con que, en dichas suspensiones, se encuentra coexistiendo una mezcla de nanopartículas con una doble población de tamaños: nanopartículas agregadas de manera parcial (es decir sin llegar a un gran tamaño) y nanopartículas totalmente aglomeradas. Es por eso, que presentan dos máximos, uno que correspondería a la absorción cercana a los 550 nm para las AuNPs aglomeradas de manera parcial y una absorción cercana a los 625 nm para las AuNPs de aglomeración completa, sin definirse un pico máximo de absorción debido al ensanchamiento del plasmon. A medida que la concentración de arsénico se incrementa, la población de mayor agregación, vinculada con el hombro centrado a 625 nm, se vuelve dominante desplazando cada vez más la posición de la banda. Esta observación se encuentra en concordancia con lo observado en la imagen 13, donde se aprecia que, en las soluciones de 1,00x10⁻⁴ y 5,00x10⁻⁴ M de concentración de arsénico hay un cambio drástico de color que vira desde el violáceo hacia el grisáceo y llega a los azules, coincidente con la tendencia de los espectros desplazando su máxima absorción hacia los 700 nm.

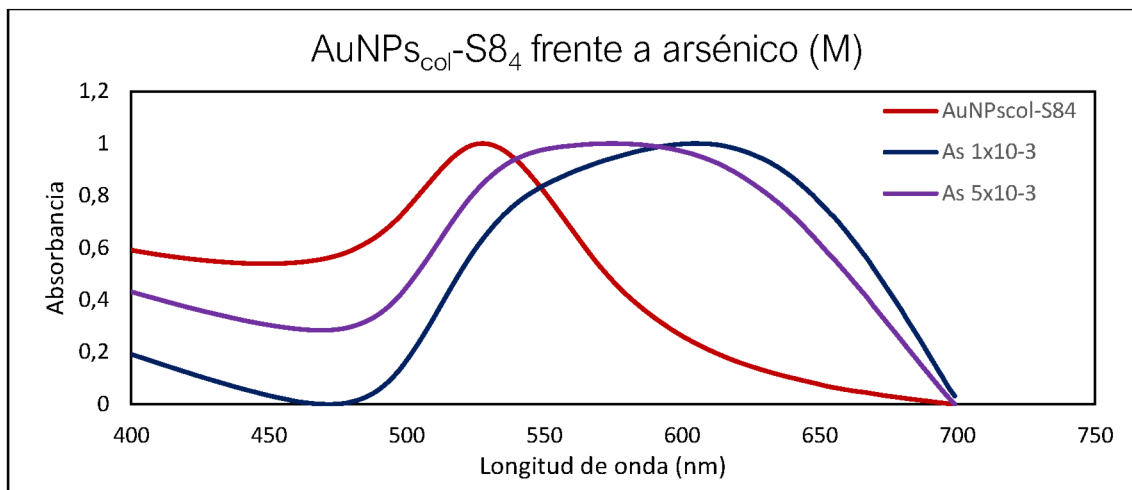


Gráfico 12. Espectros UV-vis del sistema AuNPs_{col}-S8₄ y del sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a distintas concentraciones del analito de interés en ordenes de magnitud milimolar.

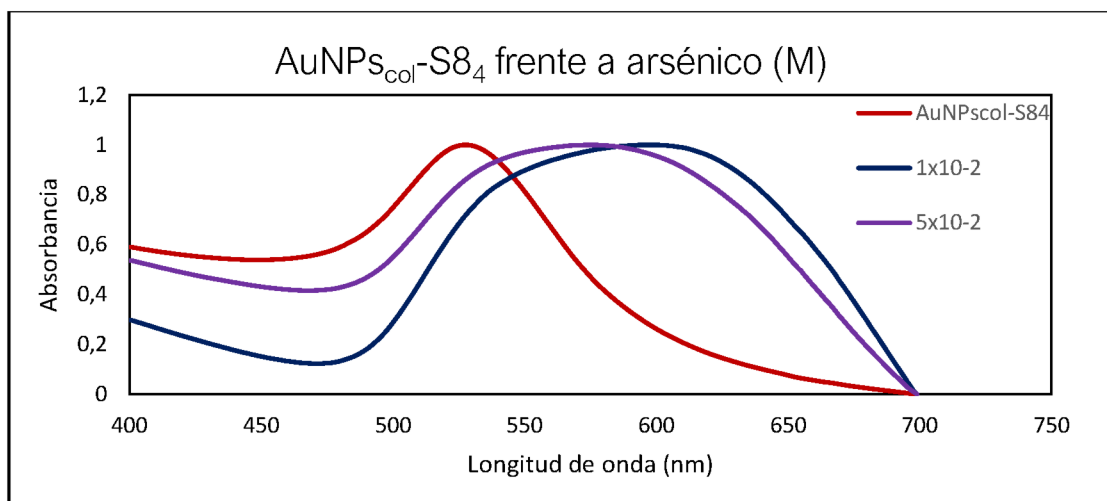


Gráfico 13. Espectros UV-vis del sistema AuNPs_{col}-S8₄ y del sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a distintas concentraciones del analito de interés en ordenes de magnitud de 10^{-2} M.

En los gráficos 12 y 13, se presentan los espectros obtenidos para concentraciones de 1×10^{-3} y 5×10^{-3} M arsénico y 1×10^{-2} y 5×10^{-2} M, respectivamente. En ambas figuras se pueden observar espectros con un comportamiento similar a lo descrito para concentraciones de orden de magnitud de 10^{-5} M. A medida que aumenta la concentración de arsénico el máximo de absorción se desplaza hacia longitudes de onda mayores, cercanas al área de absorción del azul, tendiente a los 650-700nm. Finalmente, cabe destacar que cuando el sistema se contacta con la concentración de arsénico 1×10^{-2} M se observó un color violáceo (imagen 13, H) lo cual indicaría un retroceso en el desplazamiento hacia las tonalidades azules. Esta observación parecería indicar que las nanopartículas agregadas se desaglomeran o que, se agregan en aglomerados de menor tamaño. Como consecuencia, se podría pensar que el sistema presenta un cambio en la conducta de absorción, lo que podría deberse a una estabilización del sistema

por un exceso de arsénico en el medio, lo que conduce a una alteración de las interacciones electrostáticas entre nanopartículas impidiendo su aglomeración total [Lakatos et al., 2015].

Con el objetivo de desarrollar un análisis de mayor precisión sobre la respuesta colorimétrica comparativa del sistema de detección desarrollado, se puede reducir el análisis espectral a la absorbancia observada a 625 nm en cada condición. Para esto se determinó el cambio porcentual en el coeficiente de extinción ($\Delta\epsilon$,%) según:

$$\Delta\epsilon_{625\text{nm}} (\%) = \left(\frac{A_{625\text{nm}, \text{AuNPs-SLP}+\text{As}} - A_{625\text{nm}, \text{AuNPs-SLP}}}{A_{625\text{nm}, \text{AuNPs-SLP}}} \right) * 100$$

En los gráficos 13 y 14, se presentan las gráficas de $\Delta\epsilon\%_{625\text{nm}}$ vs. concentración de arsénico. Estas figuras ofrecen una mejor visualización de la conducta en la actividad del sistema frente al analito, acompañando los espectros obtenidos y permitiendo comparar de manera más simple los cambios en la respuesta del mismo.

Cabe destacar que este análisis se puede realizar con el cambio porcentual de extinción a diferentes longitudes de onda, sin embargo, se ha elegido 625 nm por tratar de la ubicación del máximo de absorción ante los desplazamientos del biosensor.

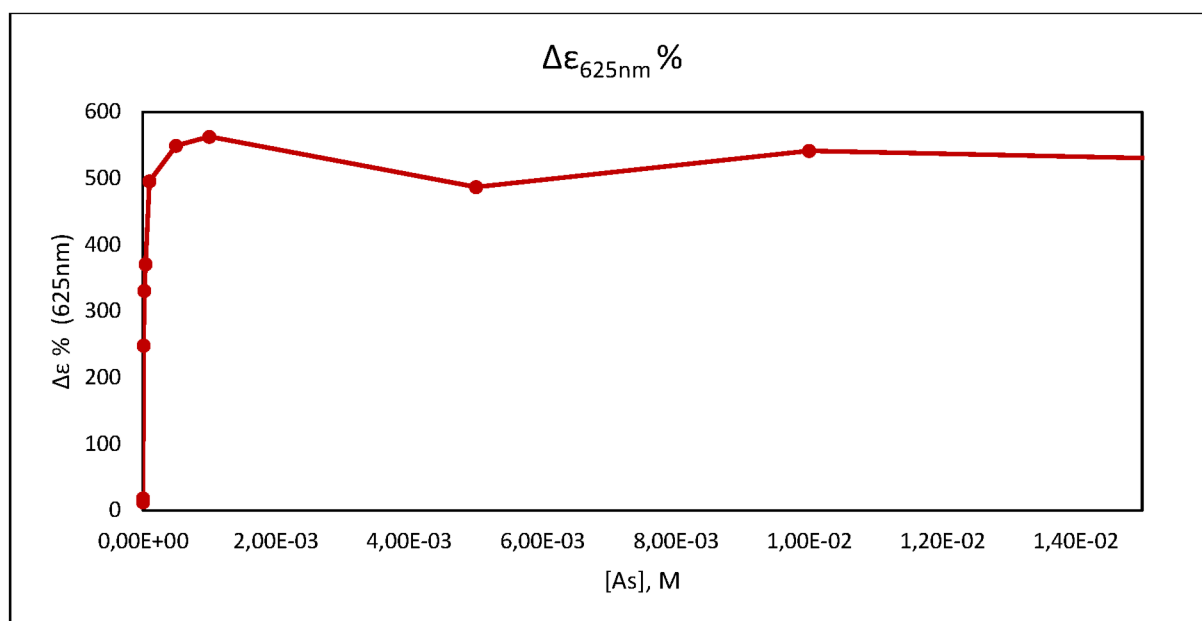


Gráfico 14. Gráfico del coeficiente de extinción molar a 625 nm frente a las distintas concentraciones del analito de interés, As(V).

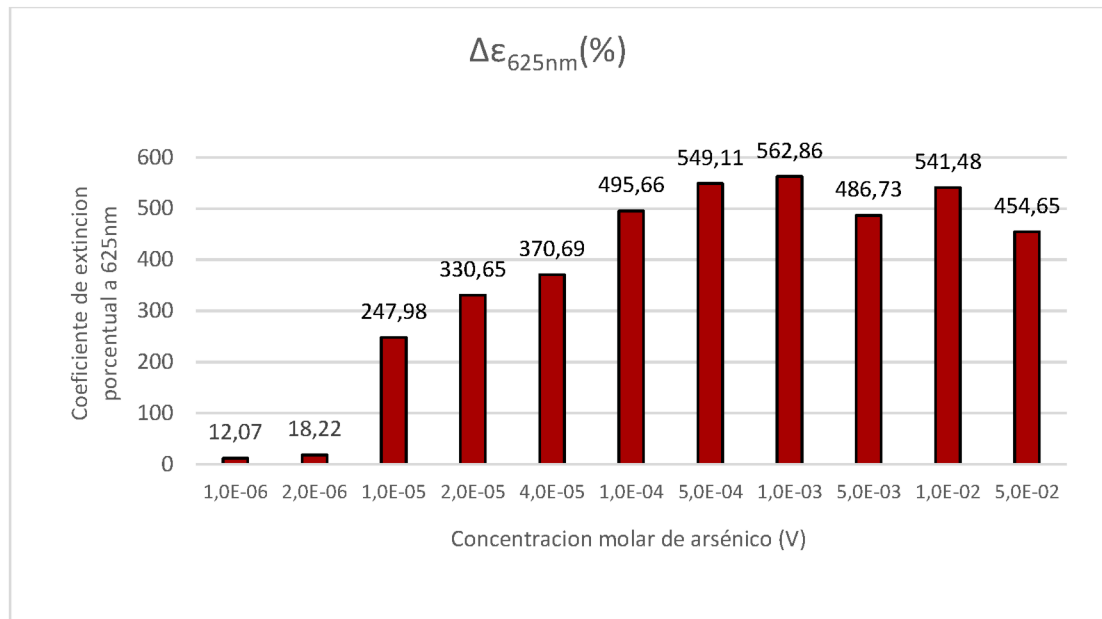


Gráfico 15. Cambio porcentual del coeficiente de extinción en el sistema frente a As(V) a 625 nm.

En los gráficos 14 y 15 se puede observar cómo hay un cambio brusco en la respuesta del sensor AuNPs_{col}-S8₄ durante el cambio de concentración de $2,00 \times 10^{-6}$ a $1,00 \times 10^{-5}$ M. A partir de esta última concentración y hasta $5,00 \times 10^{-4}$ M, se puede observar una conducta aproximadamente lineal de la absorbancia del biosensor a 625 nm. En este sentido, el sistema presenta una aplicabilidad futura como herramienta para la determinación cuantitativa de arsénico en aguas.

Luego de este rango mencionado, se puede visualizar como el sistema AuNPs_{col}-S8₄ no modifica sustancialmente su absorbancia frente a incrementos en la concentración del analito. En este punto, se puede adjudicar que el sistema se saturó y no hay condiciones que aumenten la aglomeración de las nanopartículas, aunque se aumente la cantidad de arsénico disponible. Asimismo, se mantiene la concordancia con lo observado en las soluciones presentadas en la imagen 13 y los espectros UV-vis descriptos anteriormente. A su vez, se puede visualizar la caída de absorbancia en concentraciones 5×10^{-3} M que resulta coincidente con el retroceso del color en la solución de dicha concentración. Como se mencionó anteriormente, en esta sección, es posible que se produzca una estabilización por parte del analito problema sobre las nanopartículas del sistema a causa del exceso de arsénico en el medio. Finalmente, se puede observar que en la concentración de 5×10^{-3} M, el sistema presenta un color y un $\Delta\epsilon_{625nm}\%$ similar al de 5×10^{-2} M. Ambas observaciones respaldan el hecho de que el sistema no incrementa su respuesta en este rango de concentraciones de arsénico.

Si bien se han desarrollado otros sistemas de detección de arsénico basados en

nanopartículas de oro, el nivel de detección mínimo alcanzado por el biosensor AuNPs_{col}-S8₄ basado en la estabilización de AuNPs_{col} con S8 es destacable. Esta sensibilidad se ha explicado en reportes previos bajo la sospecha de que la proteína de capa-S que estabiliza las partículas metálicas interactuaría con el arsénico facilitando el proceso de detección y aglomeración. Si bien esta teoría se ha planteado [Lakatos et al., 2015], aún no ha sido comprobada. Las interacciones entre las nanopartículas de oro estabilizadas con proteínas de capa-S y el arsénico (V) se pueden atribuir a una serie de grupos funcionales relevantes como NH₂, NH, OH, CO y COOH que se encuentran, comúnmente en la superficie de proteínas de la capa-S [Sara & Sleytr, 1987; Györvarya et al., 2004].

Finalmente, si se deseara mejorar el límite de detección, disminuyendo la cantidad de arsénico necesaria para introducir un cambio macroscópico en el sistema se podría recurrir a una estrategia sencilla. Se ha reportado en bibliografía que la eficiencia en la detección de arsénico mejora con el aumento del tamaño de nanopartícula metálica. Las nanopartículas de oro más grandes producen una señal detectable incluso con agregados de arsénico más pequeños, lo que amplía el rango de detección. Esta disminución en el límite de detección se vincula con que, al aumentar el tamaño de la nanopartícula de oro, se requiere menor cantidad de agente desestabilizante para lograr agregados de alrededor de 200 nm los cuales se asocian con los cambios bruscos de coloración [Boruah et al., 2019].

Interferencias con distintos analitos.

La interferencia en la respuesta del biosensor AuNPs_{col}-S8₄ frente a distintos analitos cuya presencia en aguas de red es frecuente, resulta de suma importancia para conocer el alcance eficaz del biosensor.

Con dicho objetivo, en este trabajo se evaluaron diez metales, cuya interferencia se clasifico en metales de unión reducida o metales de unión fuerte. En este sentido, los metales que generan un corrimiento de la banda del plasmon y por consecuencia un cambio de color, se denominaron metales de unión fuerte y los metales de unión reducida serán aquellos que no generan un corrimiento brusco ni un cambio de color perceptible en la solución. Cabe destacar, que en los ensayos de interferencias se utilizaron concentraciones de todos los metales que no tienen un correlato real con las concentraciones en aguas de red ya que los valores de todos ellos en el agua corriente son mucho menores por tratarse de especies sumamente reguladas. [CAA, art. 982; OMS, 2022].

Como se describió previamente, los metales evaluados fueron Al⁺³, Ca⁺², Co⁺², Cu⁺²,

Fe^{+3} , Mg^{+2} , Mn^{+4} , Ni^{+2} , Pb^{+2} y Zn^{+2} , que se contactaron en distintas concentraciones con el biosensor $\text{AuNP}_{\text{Scol-S84}}$, cuya respuesta se evaluó a simple vista y mediante espectroscopía UV-vis con la intención de observar si la banda de resonancia del plasmón presentaba alguna modificación en presencia de los posibles interferentes.

A continuación, se presenta una imagen de las soluciones preparadas en el laboratorio de los metales a medir.

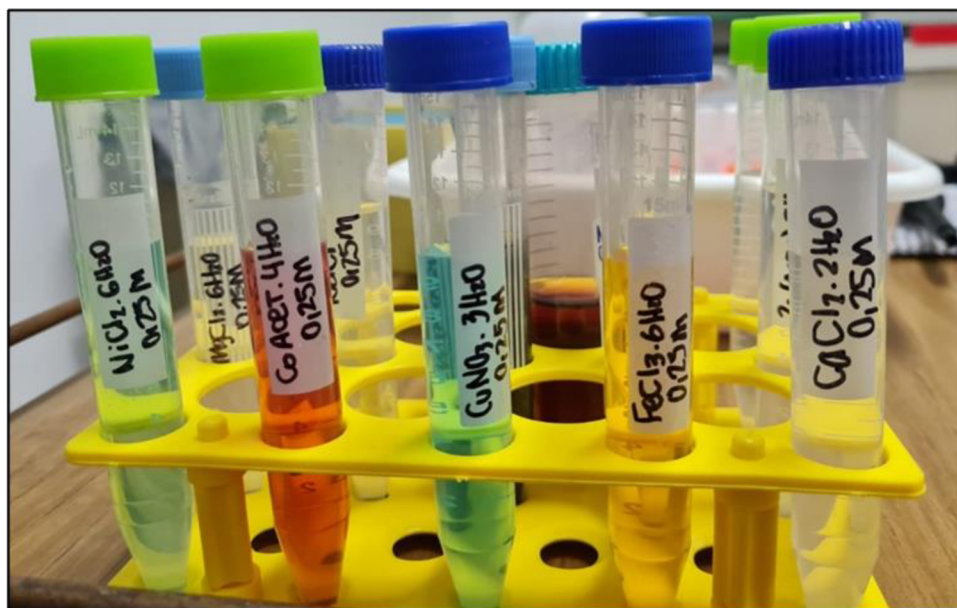


Imagen 15. Soluciones acuosas de los analitos evaluados.

La imagen 15 muestra las soluciones madres de las sales preparadas para el estudio de detección de los bionanosistema $\text{AuNP}_{\text{Scol-S84}}$.

Los gráficos derivados de las respuestas espectroscopias se presentan a continuación, discriminados por la concentración a la cual se evaluó cada metal.

Complementariamente y con el fin de mejorar la interpretación y conocer el cambio real en la actividad del biosensor, se llevó a cabo el cálculo del cambio porcentual del coeficiente de extinción molar a 625 nm tal y como se describió en la sección “ensayo de la respuesta colorimétrica del sistema $\text{AuNP}_{\text{Scol-S84}}$ ”, de los distintos metales interferentes, en las respectivas concentraciones medidas.

A su vez, se analizan las variaciones porcentuales respecto al $\Delta\epsilon_{625}\%$ del biosensor $\text{AuNP}_{\text{Scol-S84}}$ frente a una concentración de arsénico de 1×10^{-5} M, elegida por ser la primera concentración de arsénico en propiciar una respuesta visible y a nivel espectral del biosensor. Este análisis comparativo permite visualizar cuando un analito es efectivamente un interferente y cuando su cambio espectral en la suspensión es despreciable. Para dicha clasificación se estableció como punto de corte, que si la respuesta del $\text{AuNP}_{\text{Scol-S84}}$ frente a un analito supera

en un 50% al $\Delta\epsilon_{625}$ del $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ para el arsénico 1×10^{-5} M, se definirá como metal de unión fuerte y por se clasificará como interferente en el método, en la concentración analizada. Los análisis comparativos se hacen a continuación de cada figura espectral mediante un análisis por gráfico de barras.

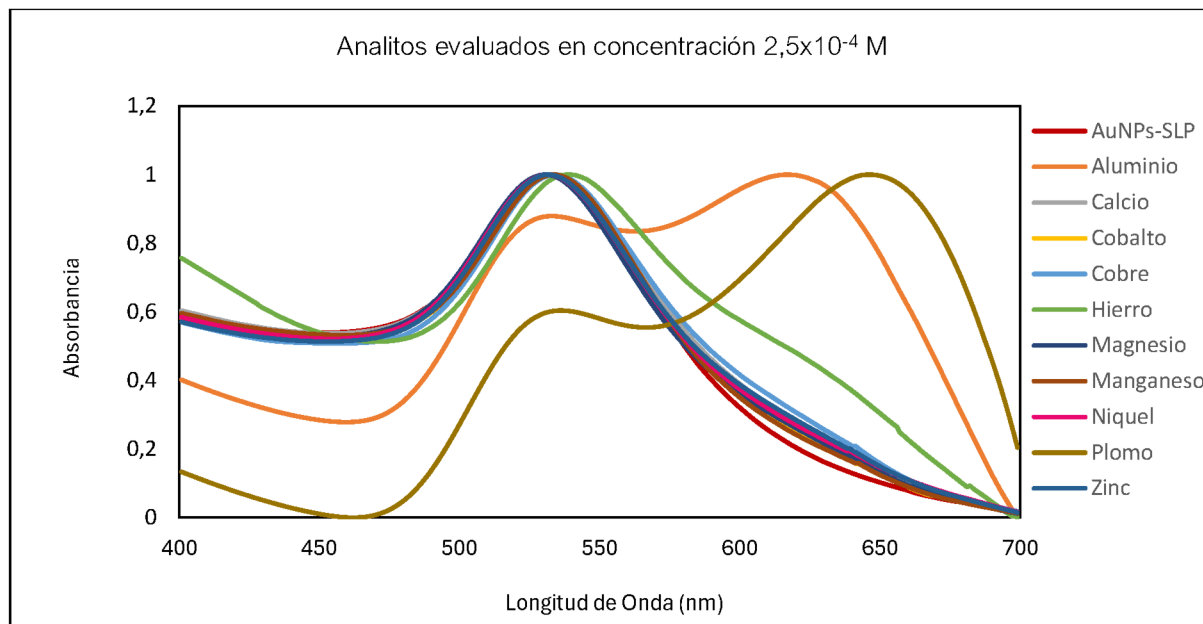


Gráfico 16. Espectros UV-Vis de del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ y del sistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ frente a metales en concentración $2,5 \times 10^{-4}$ M.

En el gráfico 16 se puede visualizar como el plomo y el aluminio interfieren en la respuesta de $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ en la menor concentración analizada ($2,5 \times 10^{-4}$ M). Debido a la interferencia, el plomo y el aluminio se clasifican como metales de unión fuerte generando un desplazamiento del LSPR nm hacia los 600-700 nm. En este sentido, y considerando que el nanobiosistema $\text{AuNPs}_{\text{col-S8}_4}$ presenta su plasmón centrado en los 533 nm, se puede visualizar como se desplaza hacia longitudes de onda mayores, 617 nm en el caso del aluminio, y 646 nm por parte del plomo.

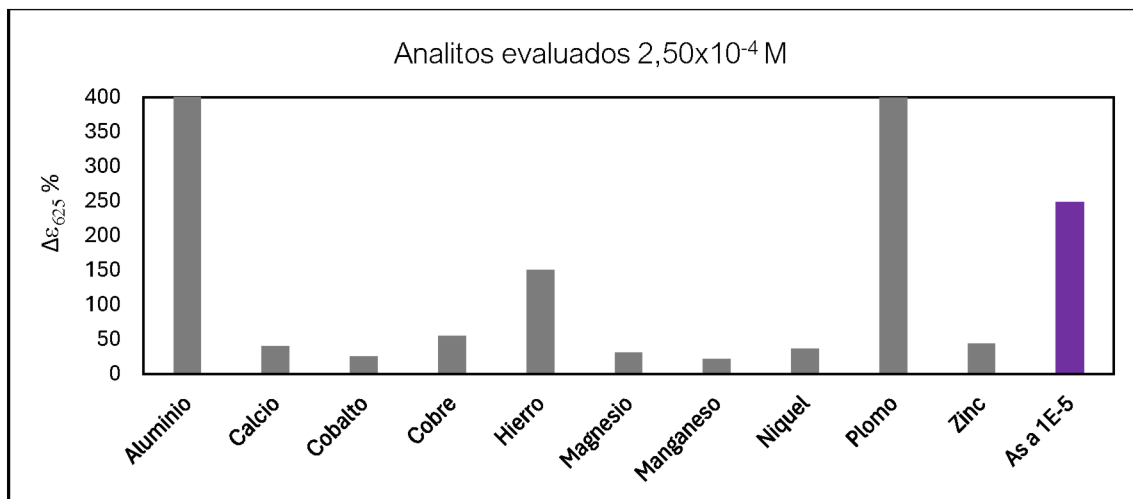


Gráfico 17. Representación del análisis para del cambio porcentual del coeficiente de extinción a 625nm para AuNPs_{col-S84} frente a los metales ensayados a $2,5 \times 10^{-4} M$.

Por su parte, en el gráfico de barras (gráfico 17) se puede observar cómo lo mencionado anteriormente resulta significativo, generando un $\Delta\epsilon_{625} \%$ mucho mayor al dado por el arsénico, contemplando, que la concentración analizada de estos metaloides supera en 25 veces a la concentración tomada como referencia para el arsénico. En conclusión, respecto al plomo y el aluminio sería conveniente considerarlos como interferentes del nanobiosensor AuNPs_{col-S84} en la concentración analizada ($2,5 \times 10^{-4} M$). Respecto a este análisis cabe destacar que estos analitos se encuentran normalmente en agua de red, con lo cual se ha reportado mediante el CAA [CAA, art.982] un límite permisible de 0,20 mg/L ($7,4 \times 10^{-6} M$) para el aluminio residual y 0,05 mg/L ($2,4 \times 10^{-7} M$) para el plomo. En este contexto, en el agua apto consumo de red la concentración máxima de los analitos sería entre 30 y 1000 veces menor a la analizada, con lo cual se puede estimar que no representarían una interferencia en un contexto real.

Por otro lado, se puede observar una reactividad significativa del sensor AuNPs_{col-S84} con el hierro, cambiando la forma y desplazando la banda principal del plasmon hacia 538 nm, en dicha concentración. En este sentido el mínimo desplazamiento de la banda de absorción del LSPR no permitiría clasificar al hierro como interferente ya que se encuentra en el rango aceptado para AuNPs de 520 a 550 nm [Bourah et al., 2019; Murray et al., 2007; Priyadarshini et al., 2016]. Sin embargo, en el gráfico de barras se visualiza que el hierro se comporta como un interferente ya que representa una respuesta mayor al 50% de la respuesta colorimétrica del arsénico. Consecuentemente, se clasifica al hierro como un metal interferente del AuNPs_{col-S84} en una concentración de $2,5 \times 10^{-4} M$. Sin embargo, se ha reportado mediante el CAA [CAA, art.982] un límite permisible para el hierro total de 0,30 mg/mL ($5,4 \times 10^{-6} M$) por lo cual, en el marco de la utilización experimental del biosensor, el hierro no se considera un interferente

real.

Para finalizar, podemos concluir que los demás iones, a esta concentración ($2,5 \times 10^{-4}$ M), pueden definirse como metales de unión débil ya que no generan desestabilización del sistema ni variación significativa en la absorbancia a 625 nm.

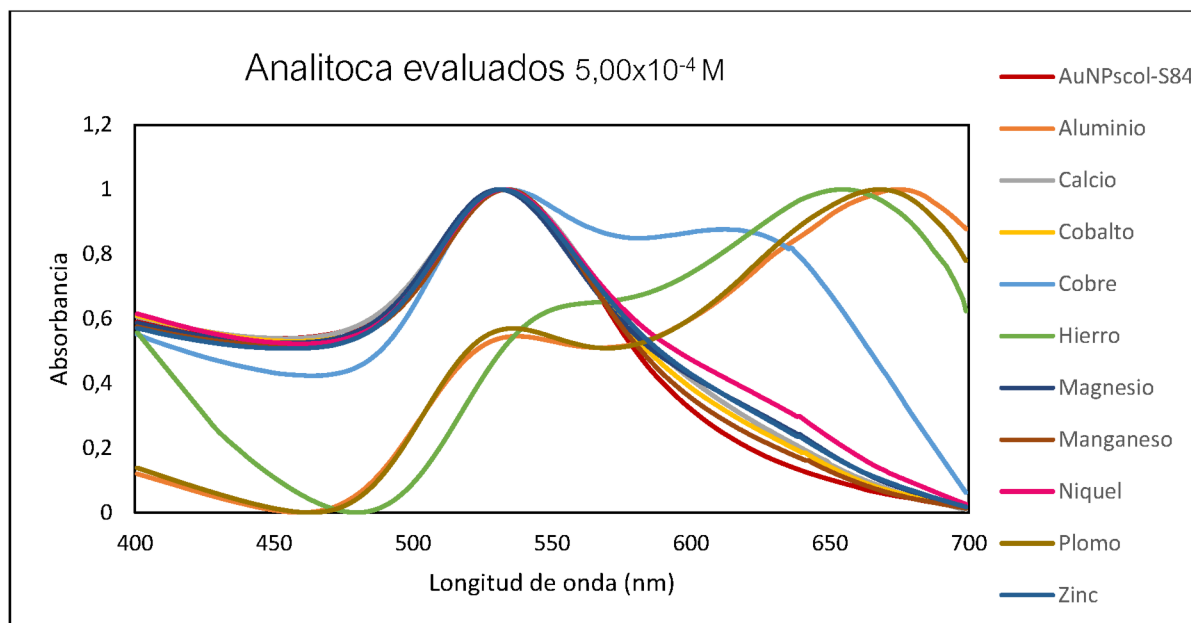


Gráfico 18. Espectros UV-Vis de del sistema AuNPs_{col}-S8₄ y del sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a metales en concentración $5,00 \times 10^{-4}$ M.

En el espectro presentado en el gráfico 18 se muestran los espectros UV-vis del nanobiosensor AuNPs_{col}-S8₄ frente a una concentración de $5,00 \times 10^{-4}$ M para todos los analitos analizados. Se puede observar cómo se acentúa la actividad del hierro en la aglomeración de las nanopartículas, generando un mayor cambio en la forma del plasmon obtenido y el desplazamiento de la población aglomerada hacia longitudes de onda que comprenden desde los 654 nm en adelante. En este sentido, concuerda con lo concluido durante la descripción del gráfico 16 y se lo designa finalmente en esta concentración evaluada ($5,00 \times 10^{-4}$ M), como un metal de unión fuerte. A su vez, el aluminio y el plomo siguen induciendo una respuesta en el sensor AuNPs_{col}-S8₄ a esta concentración mayor.

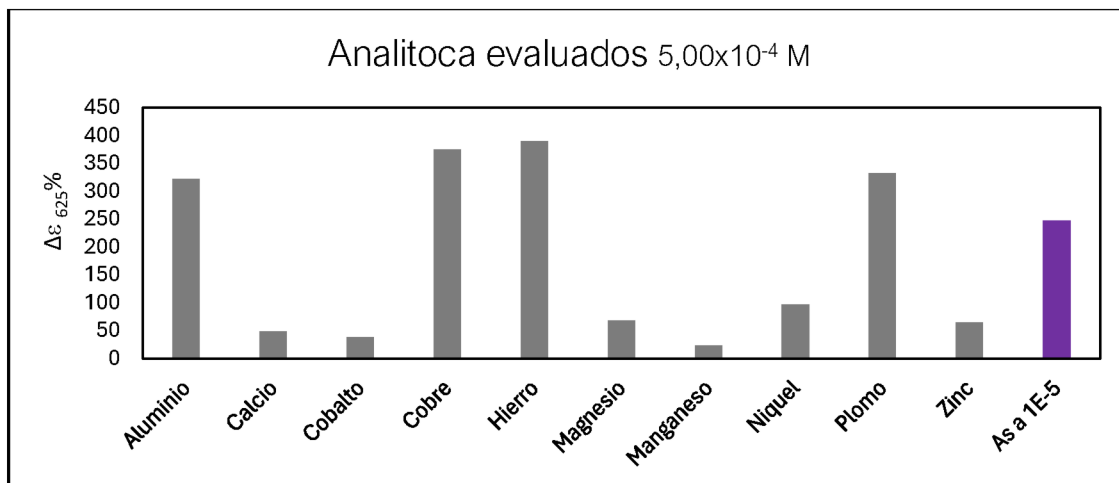


Gráfico 19. Representación del análisis para del cambio porcentual del coeficiente de extinción a 625nm para AuNPs_{col-S84} frente a los metales ensayados a 5,00x10⁻⁴M.

Por otro lado, se observa que el cobre en esta concentración introduce una respuesta en el biosensor AuNPs_{col-S84} impulsando su aglomeración. El cobre genera un aglomeramiento parcial de las nanopartículas del sensor AuNPs_{col-S84} lo que se traduce en la formación de un hombro en el plasmon localizado en 612 nm. En este sentido, esta agregación resulta en la interferencia efectiva del sensor, generando un cambio porcentual por encima del límite planteado para la respuesta del sistema ante el arsénico (gráfico19), categorizando al cobre como un interferente de unión fuerte en una concentración de 5,00x10⁻⁴ M. Según el CAA, el límite permitido del cobre en agua residual es de 1,00 mg/mL (1,6 x10⁻⁵ M), en este contexto, no se considera al cobre como un interferente ya que los resultados indican reactividad para el nanobiosistema en concentraciones de alrededor de diez veces mayor que la permitida.

Finalmente, en la concentración evaluada se sigue los demás analitos no actúan como interferentes, ya que no introducen modificaciones en el espectro del AuNPs_{col-S84}. Si bien se puede visualizar una pequeña reactividad del sensor frente al níquel y al magnesio, esta mínima respuesta se considera despreciable en comparación con la respuesta porcentual frente al arsénico.

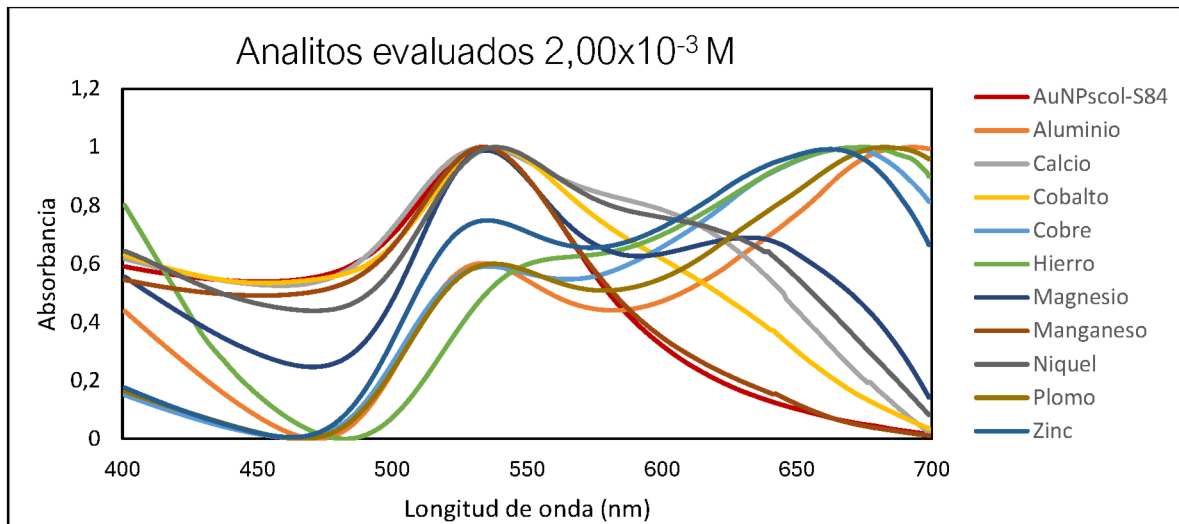


Gráfico 20. Espectros UV-Vis de del sistema AuNPs_{col}-S8₄ y del sistema AuNPs_{col}-S8₄ frente a metales en concentraciones milimolares.

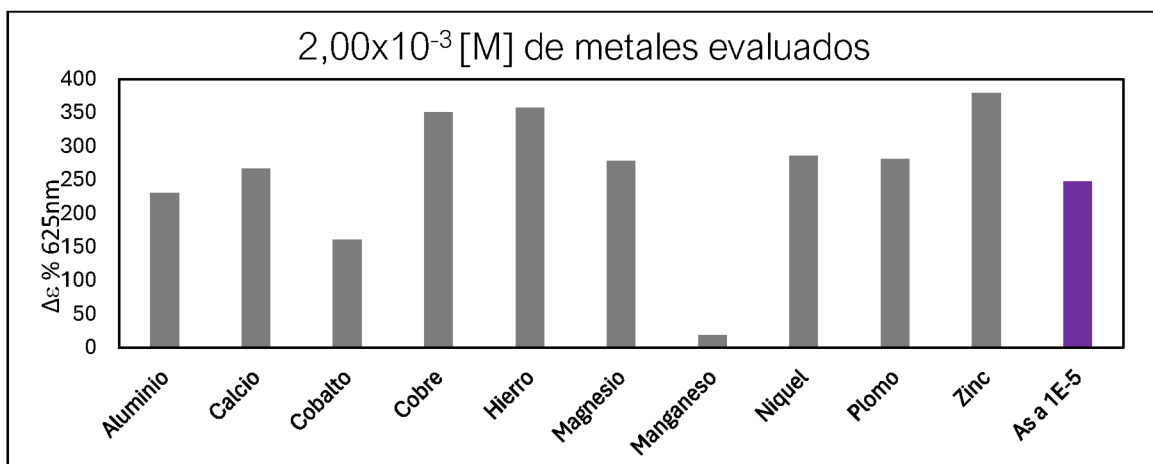


Gráfico 21. Representación del análisis para del cambio porcentual del coeficiente de extinción a 625nm para AuNPs_{col}-S8₄ frente a los metales ensayados en concentraciones milimolares.

En los gráficos 20 y 21 se presentan los espectros UV-visible y el análisis del cambio porcentual para los interferentes en una concentración de $2,00 \times 10^{-3}$ M. Se puede observar y concluir que a partir de una concentración de $2,00 \times 10^{-3}$ M, todos los analitos ensayados excepto el manganeso, representan una interferencia fuerte para el biosensor AuNPs_{col}-S8₄. A esta elevada concentración tanto el zinc, como el níquel y el calcio desestabilizan el sistema AuNPs_{col}-S8₄ generando una disminución la aglomeración de las nanopartículas manifestando absorbancias a partir de los 600 nm en adelante. Lo mencionado se puede visualizar en el espectro UV-Vis y se encuentra respaldado por lo presentado en el gráfico de la variación de la absorbancia porcentual, $\Delta\epsilon_{625}\%$.

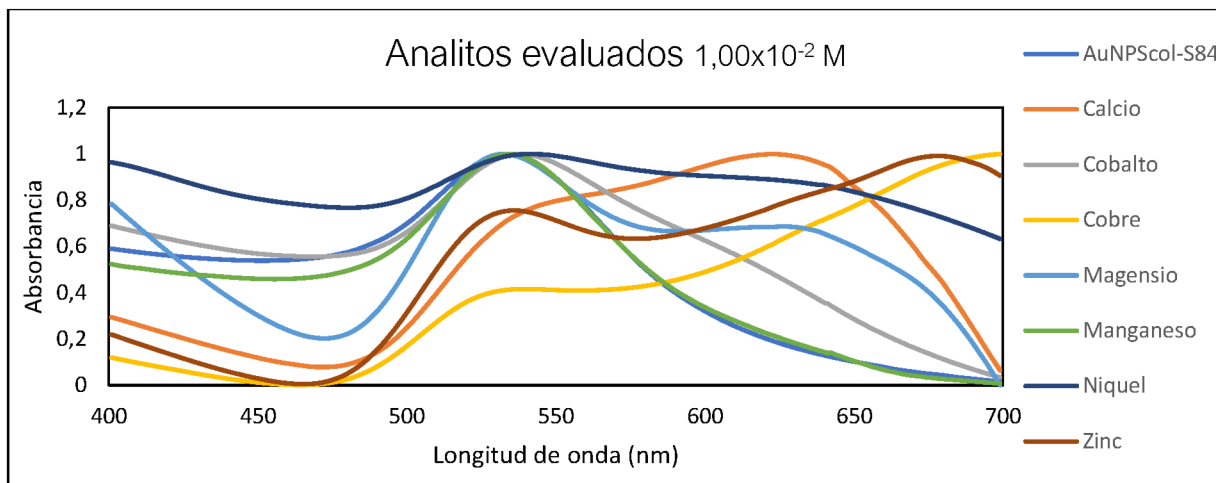


Gráfico 22. Espectros UV-Vis de del sistema AuNPscol-S84 y del sistema AuNPscol-S84 frente a metales en concentración $1,00 \times 10^{-2} M$.

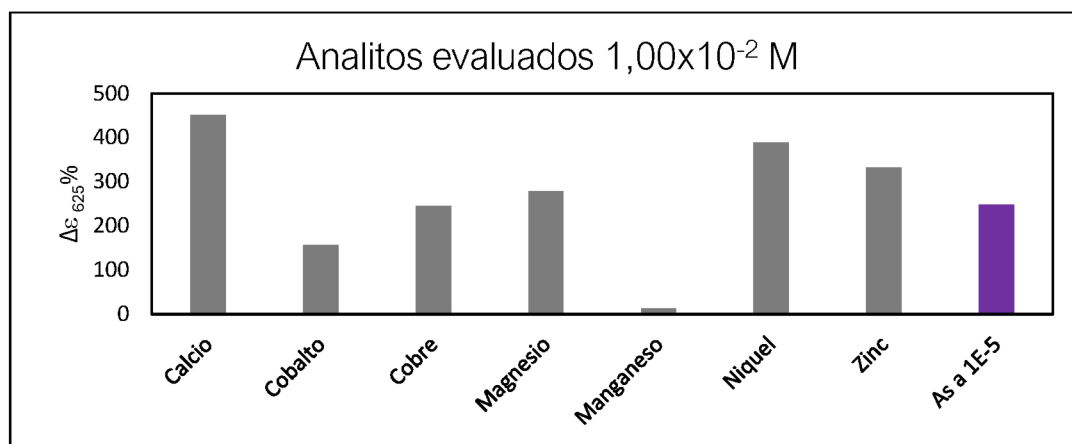


Gráfico 23. Representación del análisis para del cambio porcentual del coeficiente de extinción a 625nm para AuNPscol-S84 frente a los metales ensayados en concentración $1,00 \times 10^{-2} M$.

En los gráficos 22 y 23 se presentan los espectros UV-visible y el análisis del cambio porcentual en la respuesta del AuNPscol-S84 para los interferentes en una concentración de $1,00 \times 10^{-2} M$. Se observa que el comportamiento de casi todos los analitos como interferentes se mantiene a esta nueva concentración, excepto en el caso del manganeso el cual no genera una respuesta evidente, incluso a las máximas concentraciones ensayadas.

Es relevante destacar que no se evaluaron en esta máxima concentración ($1,00 \times 10^{-2} M$) aquellos analitos categorizados como interferentes fuertes en alguna de las concentraciones menores analizadas ya que se considera que continuarán comportándose como interferentes.

Además, es de importancia mencionar que un analito comúnmente presente en agua corriente es el sodio (Na^+), el cual no se analizó en estas instancias como interferente ya que, en el test de sal se contactó al sistema frente al NaCl en concentraciones muy elevadas (10% p/v, aproximadamente $4,3 M$ en Na^+) y no se observaron modificaciones en el espectro del

AuNPs_{col}-S8₄ (como se observa en el gráfico 6). Con lo cual, no se consideró necesario hacer este análisis a menores concentraciones de NaCl, como las usadas para los metales ensayados anteriormente.

Finalmente, cabe destacar que las últimas concentraciones de analitos interferentes evaluadas (1×10^{-2} y 2×10^{-3} M) no representan una problemática para la detección real de arsénico en aguas de red. Por lo general, estas concentraciones extremadamente elevadas no corresponderían a concentraciones reales de metales en agua de red apto consumo, por lo cual, su interferencia se limita al marco experimental y resultan despreciables para un análisis futuro.

Como era de esperar, el biosensor AuNPs_{col}-S8₄ utilizado no respondió de manera idéntica frente a las variaciones en la concentración para todos los analitos ensayados. Un dato no menor a tener en cuenta es que el sistema respondió de forma positiva (es decir, con una modificación en su coloración) ante Al(III), Pb(II) y Fe(III), a pesar de sus diferentes características y estructuras atómicas, y de las diferencias que presentan estos respecto al As (V). Según Jung y col. (2019) las proteínas de la capa-S interactúan con los analitos examinados mediante los grupos funcionales presentes en la superficie de las SLP, con lo cual, las interacciones SLP-metal no tendrían por qué ser específicas ya que se trataría de interacciones metal-ligando convencionales y reportadas para distintos analitos [Allievi et al., 2011; Györvary et al., 2004; Pum & Sleyter, 2009]. En función de esta hipótesis, si la interacción entre los analitos catiónicos y las proteínas de capas-S sería únicamente de naturaleza electrostática no específica, todos los cationes ensayados deberían haber mostrado la misma respuesta. Sin embargo, no se ha observado esto y por lo tanto, los resultados obtenidos permitirían formular una hipótesis basada en la interacción diferencial entre el sistema AuNPs_{col}-S8₄ y algunos metales.

Conclusiones.

1. El aislamiento, extracción y purificación de las proteínas de capa S (S8), logró ser efectivo y con un rendimiento esperado según lo reportado previamente en el grupo de investigación.
2. La S8 no presentó absorbancia en longitudes de onda cercanas al LSPR de las nanopartículas de oro, permitiendo desarrollar una estrategia en la que se las utilice como parte de un sensor colorimétrico.
3. Con respecto al análisis de la reducción para la obtención de nanopartículas de oro se puede concluir que el hidrogeno gaseoso no es efectivo para la generación de AuNPs que

presenten una coloración visible en suspensión.–Sin embargo, un reductor fuerte como el borohidruro de sodio permitió sintetizar AuNPs y generar un sistema de color rojizo-bordó típico de las nanopartículas de oro en suspensión.

4. Como aspecto a destacar, se requiere encontrar una concentración óptima de S8 para la realización de este tipo de sistemas ya que, en grandes cantidades las proteínas representan una interferencia analítica para la utilización de métodos ópticos debido a la turbidez que adquiere el sistema.
5. El aporte de S8 como soporte de AuNPs resultó efectivo demostrándose que las interacciones de las S8 con las AuNPs no generan alteraciones en el sistema coloidal como la formación de agregados de nanopartículas.
6. Por otro lado, la estabilidad generada por parte de las proteínas de capa-S de *L. kefir* en las nanopartículas de oro coloidales, no introdujo modificaciones relevantes en el plasmón característico de las nanopartículas de oro.
7. La S8 estabilizó las nanopartículas metálicas, aun en entornos extremos, como en elevada fuerza iónica, en coincidencia con lo reportado en bibliografía. En este sentido, la estabilidad evaluada bajo la prueba del test de sal permitió elegir la concentración de S8 óptima para la generación de un bionanosensor estable, siendo este el denominado AuNPs-S8₄.
8. Respecto a la aplicación del sistema AuNPs-S8₄ como biosensor de arsénico se puede concluir que el mismo resultó efectivo en la respuesta ante el arsénico obteniendo un rango de linealidad entre $1,00 \times 10^{-5}$ y $5,00 \times 10^{-4}$ de concentración molar.
9. Sin embargo, el biosensor AuNPs-S8₄ no respondió a las concentraciones más bajas de arsénico estudiadas ($1,00 \times 10^{-6}$ y $2,00 \times 10^{-6}$), resultando ser un inconveniente ya que no lograría cumplir con la necesidad de encontrar un sistema que responda sensiblemente a concentraciones limitadas por la OMS. Condición que podría mejorarse controlando el tipo y cantidad de reductor utilizado para sintetizar las nanopartículas de oro coloidales, logrando de manera controlada obtener AuNPs de mayor tamaño.
10. Ante concentraciones elevadas de arsénico (mayores a 1×10^{-3} M), el biosensor AuNPs-S8₄ pierde linealidad en su respuesta, sin embargo, sigue siendo efectivo para una

detección cualitativa dado que se observa el cambio de color claramente. Cabe destacar que estas elevadas concentraciones no representan un desafío para una futura cuantificación en muestras reales ya que tales cantidades de arsénico en agua no se encuentran reportadas en acuíferos.

11. Por último, respecto al análisis de interferentes con otros metales y metaloides convencionalmente presentes en agua de red, es necesario discriminar en diferentes conclusiones:

- El aluminio, el hierro y el plomo interfieren en la señal del biosensor AuNPs-S8₄ en concentración menor o igual a $2,5 \times 10^{-4} \text{M}$, con lo cual se consideran potenciales interferentes en el rango de detección lineal del biosensor. Sin embargo, esta concentración supera ampliamente los límites de concentración aceptados para estos metales en agua corriente, no representando una interferencia para la detección de arsénico en agua de red potable.
- Por su parte, el cobre comienza a comportarse como una interferencia en concentraciones superiores a $5 \times 10^{-4} \text{M}$, lo cual supera la región de linealidad de respuesta del sensor AuNPs-S8₄ a arsénico no constituyendo una interferencia para dicho rango.
- Por otro lado, el calcio, cobalto, magnesio, níquel y zinc, comienzan a interferir en concentraciones superiores a $2 \times 10^{-3} \text{M}$. Finalmente, el manganeso no interfiere en la señal del biosensor incluso en la máxima concentración ensayada ($1 \times 10^{-2} \text{M}$). Con lo cual ninguno de ellos es considerado un potencial interferente para la detección de arsénico. Una vez más, cabe destacar que las concentraciones en las cuales se manifiestan las interferencias mencionadas no se presentan en muestras reales apto consumo debido a exceden ampliamente los valores permitidos.

12. Se obtuvieron nanopartículas de oro estabilizadas y soportadas sobre proteínas de capa S, los sistemas coloidales estabilizados con capa S fueron capaces de detectar arsénico en concentraciones mayores a $1 \times 10^{-5} \text{M}$, con muy buena respuesta frente a interferentes metálicos y a condiciones extremas de fuerza iónica.

Referencias bibliográficas.

- Aiken, J.D. III & 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.
- 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.
- Anker, J.N, Hall, W.P, Lyandres, O., Shah, N.C., Zhao, J., Van-Duyne R.P. (2008). Biosensing with Plasmonic Nanosensors. *Nature Materials*. vol. **7** (6). 442–453.
- Beaven, H.G. & Holiday, R.E. (1952). Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids. Medical Research Council Spectrographic Research Unit, London Hospital, London, England.
- Biagini, R.E. (1966). Hidroarsenicismo cronico y cancer de pulmon. *Arch Argent Dermatol*; **16**:172-184.
- 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 kefir 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 kefir: Synthesis and Catalytic Application. *Mol. Catal.* **481**, 110262.
- Borah, R., Ninakanti, R., Bals, S. (2022). Plasmon resonance of gold and silver nanoparticle arrays in the Kretschmann (attenuated total reflectance) vs. direct incidence configuration. *Sci Rep* **12**, 15738. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20117-7>.
- Boruah, B.S., Biswas, R., Deb, P. (2019). A green colorimetric approach to wards detection of arsenic (III): A pervasive enviromental pollutant. *Optics and Laser Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.optlastec.2018.09.023>.
- Bundschuh, J., Pérez, C., Litter M.I. (2008). Distribución del arsénico en la región Ibérica e Iberoamericana. Editorial Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, (Buenos Aires).
- Byrne, L.J.D., Betancourt, T., Brannon-Peppas. (2008). Active Targeting Schemes for Nanoparticle Systems in Cancer Therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. **60**, 1615–1626
- Capostagno, C. (2022). Extracción de proteínas de capa S de Lactobacillus kefir con NaCl 5M: optimización de las condiciones y caracterización de los extractos obtenidos. Trabajo Final de la Carrera de Bioquímica; Universidad Nacional Arturo Jauretche.

Canals, M.V. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Universidad de Barcelona, facultad de biología, departamento de microbiología.

Chen, W.W., Guo, Y.M., Zheng, W.S., Xianyu, Y.L., Wnag, Z., Jiang, X.Y. (2014). Nanoparticles for biomolecules, recent progress of gold-based colorimetric assays. *Chin J Anal. Chem.* **42**(3), 307-314.

Claus, H., Akça, E., Debaerdemaeker, T., Evrard, C., Declercq, J.P., Robin Harris, J., Schlottm B., König, H. (2005). Molecular organization of selected prokaryotic S-layer proteins. *Can J Microbiol* **51**, 731-743.

Código alimentario Argentino (CAA). Capítulo XII: bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Artículos 982 y 983. Ley 18284. Resolución 34/2012 y 50/2012. Resolución SCS y SAByDR 22/2021. Actualización agosto de 2021. <https://argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>

Cruz, A.D., Rodríguez, M.C., López, J.M., Herrera, V.M., Orive, A. & Creus, A.H. (2012). Metallic nanoparticles and surface plasmons: a deep relationship. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, vol. **3**, n° 2. pp, 67-78.

Eslami, N., Kermanshahi, K.R. & Erfan M. (2013). Studying the stability of S-layer proteina of *Lactobacillus Acidophilus* ATCC 4356 in simulated gastrointestinal fluids using SDS-Page and circular dichroism. *Iranian J. of Pharmaceutical Research.* **12**, 47-56.

Fahmy, K., Merroun, M., Pollmann, K., Raff, J., Savchuk, O., Hennig, C., Selenska-Pobell, S. (2006). Structure and Pd(II) Coordination in S-Layer Proteins from *Bacillus sphaericus* Studied by Infrared and X-Ray Absorption Spectroscopy. *Biophysical Journal*, vol. **91**, 996–1007.

Fendorf, S., Michael, H.A., van Geen, A. (2010). Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in South and Southeast Asia. *Science* **328** (5982), 1123–1127.

Frens, G. (1973). Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nature*, **241**(105), 20-22.

Geoghegan, W.D. & Ackerman, A. (1977). Adsorption of horseradish peroxidase ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concavalin a wheat germ agglutinin and coat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level a new method, theory and application. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* Vol, **25** n° 11, pp: 1187-1200.

Gong, L., Du, B., Pan, L., Liu, Q., Yang, K., Wang, W., Zhao, H., Wu, L., He, Y. (2017) Colorimetric aggregation assay for arsenic(III) using gold nanoparticles. *Microchimica Acta.* **184**(4), 1185-1190.

Godoy-Reyes T.M. (2017). Desarrollo de un sensor químico basado en nanopartículas de oro para la detección colorimétrica de serotonina. Trabajo de fin de master. Universidad Politécnica de Valencia.

González, E.E., Acuña, Y.A., Quiroz, A.M. (2021). Nanopartículas de oro funcionalizadas con L-Cisteína para detección de arsénico en agua. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, vol. **21** (2), pp: 66-72.

Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda, organización mundial de la salud, OMS 2022.

Gong, L., Du, B., Pan, L., Liu, Q., Yang, K., Wang, W., Zhao, H., Wu, L., He, Y. (2017) Colorimetric aggregation assay for arsenic(III) using gold nanoparticles. *Microchimica Acta*. **184**(4), 1185-1190.

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.

Harisha K.S., Narayana B., Sangappa Y. (2021). Highly selective and sensitive colorimetric detection of arsenic(III) in aqueous solution using green synthesized unmodified gold nanoparticles. *Journal of Dispersion Science and Technology*. DOI:10.1080/01932691.2021.1931286.

Herves, P., Perez-Lorenzo, M., Liz-Marzan, L., Dzubiella, J., Lu, Y., Ballauff, M. (2012). Catalysis by metallic nanoparticles in aqueous solution: model reactions. *Chemical Society Reviews*, **41**. 5577-5587.

Huang, X. & El-Sayed, M.A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of Advanced Research* **1**, 13–28.

Huggias, S., Bolla, P.A., Serradell, M.A., Casella, M., Peruzzo, P.J. (2020). *Langmuir.: amer chemical soc.* vol.**36** n°5. P 1201 - 1211. issn 0743-7463.

Huggias, S., Bolla, P.A., Azcárate, J.C., Serradell, M.A., Casella, M.L. & Peruzzo, P.J. (2021). *Catalysis Today*, **372**, 98–106.

Hynönen, U., Palva, A. (2013). Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:5225–5243.

Ilk, N., Egelseer, E.M., Sleytr, U.B. (2011). S-layer fusion proteins-construction principles and applications. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 824-831.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Monograph of the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some drinking water disinfectants and contaminants, including

arsenic. Lyon, France. 2004:84.

Jaenicke, R., Welsch, R., Sara, M., Sleytr, U.B. (1985). Stability and Self-Assembly of the S-Layer protein of the cell wall of *Bacillus stearothermophilus*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. Vol. **366**, pp. 663-670.

Jankowski, U., Merroun, M.L., Selenska-Pobell, S. & Fahmy, K. (2010). S-Layer protein from *Lysinibacillus sphaericus* JG-A12 as matrix for Au (III) sorption and Au-nanoparticle formation. *Spectroscopy* **24**, 177–181.

Jung, J., Lakatos, M., Bengs, S., Matys, S., Raff, J., Blucher, A., Cuniberti, G. (2019). S-Layer protein-AuNP systems for the colorimetric detection of metal and metalloid ions in water. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.014>

Kim, C.A.D., Daniel, W.L. & Mirkin L. (2009). Microarray-Based Multiplexed Scanometric Immunoassay for Protein Cancer Markers using Gold Nanoparticle Probes. *Anal. Chem*, vol. **81**, 9183–9187.

Kinniburgh, D.G., Smedley, P., (2001). Arsenic Contamination of Groundwater in Bangladesh. *British Geological Survey*, 630pp (WC/00/019) (unpublished).

Lakatos, M., Matys, S., Raff, J., Pompe, W. (2015). Colorimetric As (V) detection based on S-layer functionalized gold nanoparticles. *Talanta* **144**, 241–246.

Larguinho, M., Canto, R., Cordeiro, M., Pedrosa, P., Fortuna A., Vinhas, R., Baptista, P.V. (2015). Gold nanoprobe-based non-crosslinking hybridization for molecular diagnostics. *Expert review of Molecular Diagnostics*, **15** (10), 1355-1368.

Lin, S., Tsai, Y., Chen, C., Lin, C., Chen, Ch. (2004). Two-Step Functionalization of Neutral and Positively Charged Thiols onto Citrate-Stabilized Au Nanoparticles. *J Phys. Chem. B*. **108**, 2134-2139.

Litter M. (2010). Actualización The problem of arsenic in Argentina: HACRE. *SAEGRE*- vol **XVII**-n° 2.

Litter, M.I., Ingallinella, A.M., Olmos V., Savio M., Difeo G., Botto L., Torres E.M.F., Taylor S., Frangie S., Herkovits J., Schalamuk I., Bhattacharya P., Ahmad A. (2019). Arsenic in Argentina: Occurrence, human health, legislation and determination. *Science of the Total Environment* **676**, 756-766.

Maliva, R.G., (2020). Anthropogenic Aquifer Recharge and Water Quality. In: Maliva, R.G. (Ed.), Anthropogenic Aquifer Recharge. Springer Hydrogeology. *Springer, Cham*, pp. 133–164 https://doi.org/10.1007/978-3-030-11084-0_6

Mandal, B., Suzuki, K. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, **58**, pp. 201-235.

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.

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.

Messner, P., Egelseer, E.M., Sleytr, U.B., Schäffer, C. (2009) 7. Bacterial surface layer glycoproteins and “non-classical” secondary cell wall polymers. *Microbial glycobiology.* 109-128. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374546-0.00007-9>

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.

Mozumder, M.R.H., 2019. Impacts of Pumping on the Distribution of Arsenic in Bangladesh Groundwater. Ph.D. Thesis. Columbia University, p.199.

Murray, W.A. & Barnes, W.L. (2007). Plasmonic materials. *Adv. Mater.:* **19**, 3771-3782.

Nonna Silva, 2006. Epidemiologia del hidroarsenicismo cronico regional endemico en la republica Argentina.

Organización mundial de la salud (OMS), 2004.

Organización mundial de la salud (OMS), 2022.

Parab H, Jung C, Woo M, Park HG. (2010). An anisotropic snowflake-like structural assembly of polymer-capped gold nanoparticles. *J Nanopart Res* **13**:2173–2180.

Polya, D.A., Sparrenborn, C., Datta, S., Guo, H. (2019). Groundwater arsenic biogeochemistry – Key questions and use of tracers to understand arsenic-prone groundwater systems. *Geosci. Front.* **10**, 1635–1641.

Priyadarshini, E. & Pradhan, N. (2017). Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ion: A review. *Elsevier B.V.* 888-902.

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 (2009). S-Layer Proteins for Assembling Ordered Nanoparticle Arrays. *Nanobioelectronics - for Electronics, Biology, and Medicine*, 167-180.

Pum, D., Herrera, J.L.T., Sleytr, U.B. (2013). S-Layer Protein Self-Assembly. *International Journal of Molecular Sciences* ISSN 1422-0067. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 2484-2501.

Randy, H., Schroeder, A., Domínguez, R., Verónica, I., García, H.L. (1999). Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra Latinoamericana*, vol. **17**, núm. 2, 159-174. *Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C*

Ribeiro, M.S., de Melo, L.S.A., Farooq, S., Baptista, A., Kato, I.T., Nuñez, S.C. & de Araujo,

R.E. (2018). Photodynamic inactivation assisted by localized surface plasmon resonance of silver nanoparticles: in vitro evaluation on Escherichia coli and Streptococcus mutans. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. **22**, 191-196.

Puy, E.I. 2016. Sensor óptico colorimétrico de peróxido de hidrogeno con doble referencia basado en nanopartículas de oro y plata. E.T.S de Ingeniería Industrial, Informática y de Telecomunicación. Universidad pública de Navarra.

Sanchez, M.L. (2020). *Biofármacos*, **84**(3):44-51.

Sara, M. & Sleytr, U.B. (1987). Production and characteristics of ultrafiltration membranes with uniform pores from two-dimensional arrays of proteins. *J. of membrane science*, **33**(1) 27-49.

Sara, M. & Sleytr, U.B. (2000). S-Layer Proteins. *J. Bacteriology*. **182** (4):859-868.

Schuster, B., Petra, C.G., Pum, D. & Sleytr, U.B. (2004). S-Layer Proteins as Supporting Scaffoldings for Functional Lipid Membranes. *Ieee transactions on nanobioscience*. Vol.3, n°1.

Schuster B. & Sleytr U.B. (2013). Nanotechnology with S-Layer Proteins. *Protein Nanotechnology*. Juliet A. Gerrard (ed.) New York (pp: 153-175) ISBN: 978-1-62703-354-1.

Selenska-Pobell S., Reitz T., Schonemann R., Herrmansdorfer T., Merroun M., Geibler A., Rogalev A. (2011). Magnetic Au nanoparticles on Archeal S-Layer ghosts as templates. *Nanomaterials and nanotechnology*, **1**, 13. <https://doi.org/10.5772/50955>.

Shrivastava, K., Shankar, R. & Dewangan, K. (2015). Gold nanoparticles as a localized surface plasmon resonance based chemical sensor for on-site colorimetric detection of arsenic in water samples. *Sensors and Actuators B*. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2015.07.058>

Silva, L.I.M., Perez-Gramatges, A., Larrude, D.G., Almeida, J.M.S., Aucelio, R.Q., da Silva, A.R. (2021). Gold nanoparticles produced using NaBH₄ in absence and in the presence of one-tail or two-tail cationic surfactants: Characteristics and optical responses induced by aminoglycosides. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **614**, 126174.

Sleytr, U.B. & Glauert, A.M. (1975). Analysis of regular arrays of subunits on bacterial surfaces: evidence for a dynamic process of assembly. *J. Ultrastruct. Res.* **50**, 103–116.

Sleytr, U.B., Schuster, B., Egelseer, E.M., Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiology Reviews* **38**, 823–864.

Smedley, P., Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* **17**(5), 517-568.

Smedley, P. & Kinniburgh, D. G. (2012). Arsenic in Groundwater and the Environment.

Essentials of medical geology. 279-319. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4375-5_12

Smith, A.H., Ligas E.O., Rahman, M. (2000). Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization*, **78**, (9).

Smitha, S.L, Nissamudeen, K.M., Philip, D. & Gopchandran, K.G. (2008). Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochim. Act. A* **71**, 186–190.

Selenska-Pobell S, Reitz T, Schonemann R, Herrmansdorfer T, Merroun M, Geibler A. & Rogalev A. (2011). Magnetic Au nanoparticles on Archeal S-Layer ghosts as templates. *Nanomaterials and nanotechnology*, **1**, 13. <https://doi.org/10.5772/50955>.

Thanh, N.T.K. & Rosenzweig, Z. (2002) Development of an aggregation-based immunoassay for anti-protein a using gold nanoparticles. *Anal. Chem.* **74**, 1624–1628.

Templeton, A.C., Pietron, J.J., Murray, R.W. & Mulvaney, P. (2000). Solvent refractive index and core charge influences on the surface plasmon absorbance of alkanethiolate monolayer-protected gold clusters. *The Journal of Physical Chemistry B*, **104**(3), 564-570.

Trelles, R., Larghi, A., Paez, J. (1970). El problema sanitario de las aguas destinadas a bebida humana con contenidos elevados de arsenico, vanadio y fluor. Facultad de ingenieria, UBA. Instituto de Ingenieria Sanitaria; Pub n° 4.

Turkevich, J., Stevenson, P.C. & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, **11**, 55-75.

Ulman, A. (1996) Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem .Rev.* **96**,1533-54.

Watanabe, S., Seguchi, H., Yoshida, K., Kifune, K., Tadaki, T., Shiozaki, H. (2005). Colorimetric detection of fluoride ion in an aqueous solution using a thioglucose-capped gold nanoparticle. *Tetrahedron letters* **46**(51), 8827-8829.

Wang, C. & Yu, C. (2013). Detection of chemical pollutants in water using gold nanoparticles as sensor: a review. *Rev. Anal. Chim.* **32** (1), 1-14.

Wang X.Y, Wang D.B, Zhang Z.P, Bi L.J, Zhang J.B, Ding W. & Zhang X.E. (2015). A S-layer protein of *Bacillus anthracis* as a building block for functional protein arrays by in vitro self-assembly. *Small* **11** 5826-5832.

Wei Q., Yu T. (2018). Plasmonic molecular assays: Recent advances and applications for mobile health. *Nano Research*, **11**(10), 5439-5473.

Zhao, W., Brook, M.A. & LI, Y. (2008). Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *ChemBioChem*, **9**(15): 2363-2371.

