



---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

Microscopía de Barrido de Efecto Túnel de  
Proteínas Depositadas Sobre Superficies de  
Grafito Piroclítico Altamente Ordenado.

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JOSÉ ANDRÉS DE LA CRUZ RODRÍGUEZ GALVÁN

DIRECTOR DE TESIS: Dr. VLADIMIR BASIUK EVDOKIMENKO

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por haberme permitido ser parte de su alumnado.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Vladimir Basiuk  
Dr. Abel Moreno

A los integrantes del jurado:  
Dr. Luis Felipe Jiménez García,

y al Dr. Vladimir Basiuk

Al  
Dr. Octavio T. Ramírez y Dra. Laura A. Palomares  
por las muestras proporcionadas

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la cual financio en parte la compra del equipo de trabajo mediante el proyecto DGAPA-IN100107.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACYT), el cual financio en parte la compra del equipo de trabajo mediante el proyecto CONACYT-U48863-R.

- **A MIS PADRES Y HERMANOS, “GRACIAS”.**

Darío Rodríguez, Yolanda Galván  
Selene, Alejandr@, María, Clara y Eduardo

**A LOS AMIGOS, “GRACIAS”**

Vladimir Basiuk, Alejandro Heredia,  
Flavio Contreras, Oscar Amellines,  
Susana Carolina, Virgini@ López,  
Janina Aguilar, Miguel Herrera,  
Marcos Mora, Martín Gonzáles,  
Josselyn Rodríguez  
Juliet@ Mendoza, Anaid Marquez,  
Fernando Peralta, Alberto Barajas.

y A **Zoe** por Memo Rex Commander y el Corazón Atómico de la Vía  
Láctea.

# Índice

## **Resumen**

## **abstract**

### **Capítulo 1: Microscopía de barrido de efecto túnel del autoensamble de la proteína viral VP6 en nanotubos y nanoesferas**

#### 1. Introducción

#### 2. Antecedentes

2.1 Proteína VP6 se ensambla en estructuras tubulares y esféricas

2.2 Aplicaciones de nanotubos y nanoesferas

2.3 Microscopía de barrido de efecto de túnel (STM)

#### 3. Objetivos del trabajo

3.1 General

3.2 Particulares

#### 4. Métodos y materiales

#### 5. Resultados y discusión

5.1 Nanotubos

5.2 Nanoesferas

#### 6. Conclusiones

#### 7. Bibliografía

### **Capítulo 2: Estudio STM de la adsorción de albúmina sérica humana en la superficie de nanotubos de capa simple**

#### 1. Introducción

#### 2. Antecedentes

3.1 Nanotubos de carbono (CNTs)

3.2 Bioaplicaciones de nanotubos de carbono.

- 3.3 Nanotubos de carbono-proteínas (interacción inespecífica)
- 3.4 Albúmina sérica humana (HSA)
- 4. Objetivos del trabajo
  - 4.1 General
  - 4.2 Particulares
- 5. Métodos y materiales
- 6. Resultados y discusión
  - 6.1 Adsorción en superficie de grafito
  - 6.2 Adsorción en superficies de nanotubos
- 7. Conclusiones
- 8. Bibliografía

**Conclusiones**

**Apéndice**

**Bibliografía**

## Resumen

La nanociencia es una de las áreas de más rápido desarrollo desde los años 80. Tan solo en la pasada década, materiales desarrollados a través de la nanotecnología han tenido un impacto significativo en varios campos desde dispositivos electrónicos y química supramolecular a biotecnología y ciencias médicas. Un campo emergente en nanociencias es la bionanotecnología, la cual a pesar de encontrarse en una etapa muy temprana ha tenido un impacto en bioelectrónica e ingeniería de tejidos y medicina. Las nanociencias se han desarrollado rápidamente en parte por los avances en técnicas analíticas. Dentro de las herramientas analíticas para estudiar los nanomateriales que se han refinado se encuentran la microscopía por sonda (SPM), en particular la microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de barrido de efecto túnel (STM). Esta última es ampliamente utilizada para estudiar materiales a nivel atómico, además, ha sido empleada para estudiar gran número de biomoléculas. En esta tesis se empleó la microscopía de efecto túnel para analizar tubos y esferas de proteína viral, VP6, y además en el estudio de un sistema híbrido albúmina sérica humana / nanotubo de carbono. Se ha decidido estudiar los tubos y esferas ya que las plantillas de proteínas virales son capaces de organizar materiales inorgánicos de una manera deseable. Por otro lado el sistema híbrido proteína / nanotubo de carbono ya que tiene un gran número de aplicaciones. En el primer caso en el estudio de los tubos y esferas encontramos que el STM puede resolver a nivel molecular la estructura de los tubos y esferas, y puede mostrar el arreglo de las unidades estructurales de los tubos. En el segundo caso, el STM permitió observar la proteína sérica anclada sobre los nanotubos de carbono. Además dio información acerca de su distribución a lo largo de tubos individuales así como en grupos de tubos. Por otro lado también aporta información de la integridad de la proteína sobre grafito y nanotubos de carbono. Los resultados obtenidos demuestran que la microscopía de barrido de efecto túnel es una herramienta que da información de gran valor a nivel molecular de ensamblajes proteicos y sistemas híbridos proteínas / nanotubos de carbono.

## **Abstract**

Scanning tunneling microscopy (STM) is a powerful tool for imaging the surfaces and morphologies of biological samples, capable of providing detailed structural information on the molecular, submolecular and atomic scale. In the present work, we employed STM technique to study the morphology of self-assembled VP6 protein at the surface of highly oriented pyrolytic graphite (HOPG), and compared its STM images to those obtained by transmission electron microscopy (TEM). VP6, composed of trimer structural units, exhibits a high performance in its self-assembly, displaying two types of nanostructures, namely nanotubes and nanospheres. High-resolution STM images of nanotubes, nanospheres and their building block, VP6 trimer, were obtained. STM results provided interesting structural details even under ambient conditions. Some measurements are in agreement with data obtained previously from X-ray diffraction and electron cryomicroscopy analysis. At the same time, differences in the operation principles of STM and TEM techniques, as well as in the environmental conditions to which samples are exposed, give rise to some differences in the structural characteristics obtained.

# **Capítulo 1**

## **Microscopía de Barrido de Efecto Túnel del Autoensamble de la Proteína Viral VP6 en Nanotubos y Nanoesferas**

## 1. INTRODUCCIÓN

La naturaleza representa los límites en control sobre organización, ya que posee una extraordinaria capacidad para ensamblar estructuras complejas con funciones activas y especializadas (Aldaye et al., 2008). El autoensamble, la organización espontánea de componentes en estructuras organizadas, es el principal método que la naturaleza emplea para obtener complejidad. El autoensamble, característico de todas las biomoléculas, es dirigido por interacciones débiles como: fuerzas electrostáticas, enlaces de hidrógeno, efecto hidrofóbico, puentes salinos y fuerzas de van der Waals (Zhang, 2003). Desde hace millones de años la naturaleza adoptó el autoensamble como estrategia para construir un gran número de estructuras complejas con diversas formas, funciones y niveles de organización. Esta ingeniosa estrategia de ingeniería, ha sido recientemente asimilada por la nanobiotecnología, ya que representa un método potente y altamente eficaz para la creación espontánea y programada de estructuras complejas a escala nanométrica a partir de moléculas pequeñas (por ejemplo bases nitrogenadas, aminoácidos, proteínas, y lípidos). El autoensamble es concepto clave de la forma de construcción de abajo a arriba (bottom up), forma de construcción que intenta imitar el presente en la naturaleza trae nuevas oportunidades para diseñar y fabricar materiales innovadores los cuales tendrán un impacto significativo en ambas ciencia y tecnología (Zhao y Zhang, 2004).

Con el autoensamble actualmente los bionanotecnólogos están diseñando completamente nuevos patrones con los bloques de construcción que ofrece la naturaleza (Aldaye et al., 2008; Rothmund, 2006), sin embargo, todo su potencial aún no ha sido bien explotado (Ros, 2008). La mayor parte de los trabajos han enfocado su empleo en la fabricación de estructuras tubulares y esféricas. Para obtener estos ensambles, se ha empleado ADN, péptidos y proteínas (vea Figura 1). Esas estructuras, tubulares y esféricas, han acaparado la atención debido al hecho que poseen una superficie interna y externa potencialmente accesibles para funcionalización tanto química como bioquímica (Charles y Punit, 2003). Diversas aplicaciones se plantean para estos nuevos materiales compuestos, por ejemplo, como liberadores de fármacos, nanoreactores para diversos usos por ejemplo sensores,

imágenes en medicina, dispositivos electrónicos y magnéticos (Zhao y Zhang, 2007 y Cheng-Yu et al., 2009).



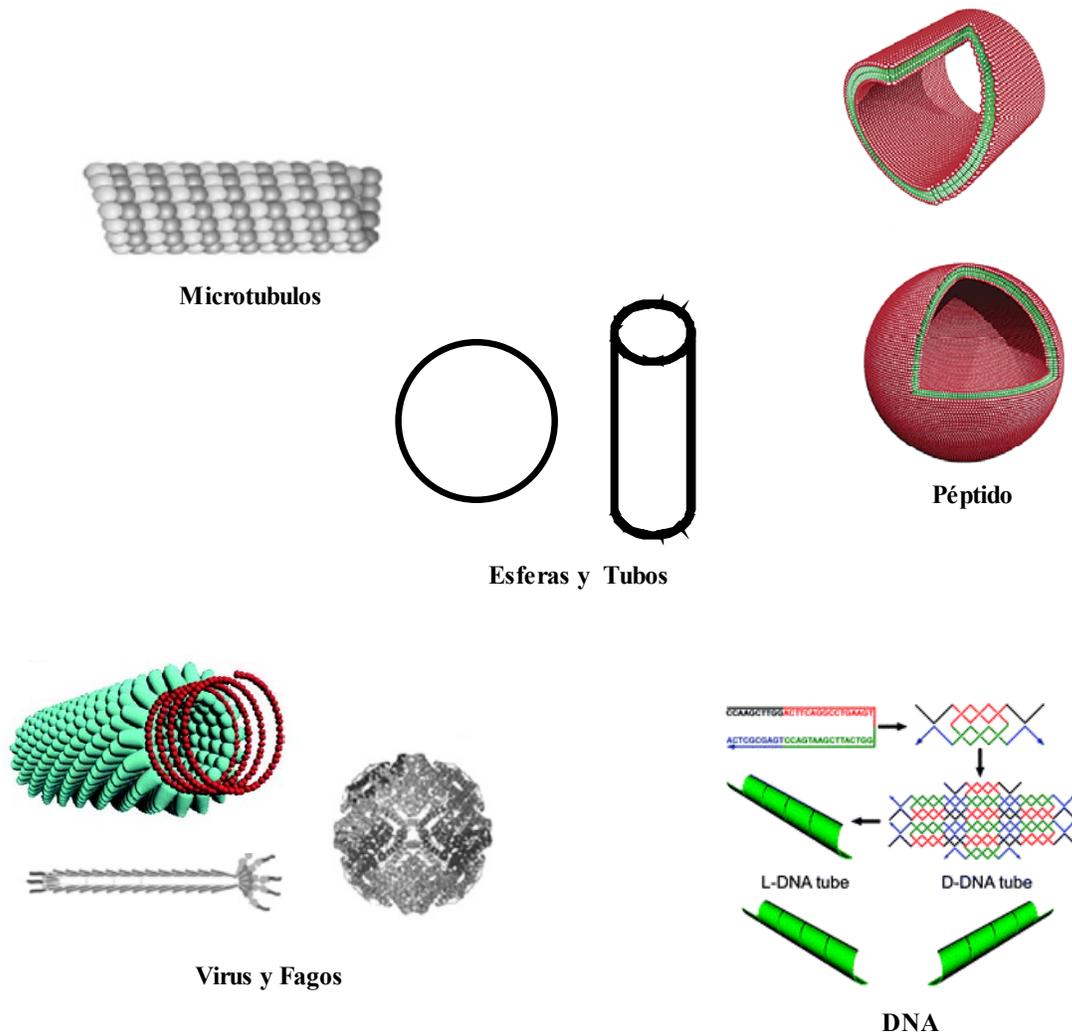


Figura 1. Ensamblajes tubulares y esféricos pueden ser generados con DNA, péptido, proteínas virales y estructurales, solo por mencionar algunos (Imágenes tomadas de Silke, 2008; Chenxiang et al., 2009; Whyburn et al., 2008).

Como se mencionó se emplea ADN, péptido y proteínas, para fabricar tubos y esferas. Sin embargo, en el caso de ADN algunas limitaciones para su uso como bloque de construcción se han encontrado, en particular la funcionalización con componentes inorgánicos debido a que sus unidades estructurales bases nitrogenadas son solo cuatro (A,T,G,C). Por otro lado, también se han empleado péptido de 6 a 10 aminoácidos, desafortunadamente no se tiene un control en las dimensiones de las estructuras

resultantes ya que se obtienen tubos y esferas con dimensiones heterogéneas (Zhao y Zhang, 2004). Además la funcionalización con moléculas inorgánicas se restringe ya que en sus superficies (interna y externa) se exponen únicamente aminoácidos hidrofílicos (Zhao y Zhang, 2007). A diferencia de ADN y péptidos, las proteínas tienen una alta diversidad química (20 aminoácidos), forman estructuras con dimensiones homogéneas en particular las proteínas de la cápside de virus (partículas virales). Las cápsides virales cuentan con una superficie interna, una externa y una interfase que pueden ser funcionalizadas, vea Figura 2. Las proteínas virales pueden ser aisladas en grandes cantidades, y de gran interés resulta que pueden ser modificadas, por la expresión de secuencias específicas a través de técnicas de ingeniería genética, para atar gran cantidad de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas, además; sus propiedades mecánicas pueden ser modificadas (Evans, 2008; Carrasco et al., 2009).

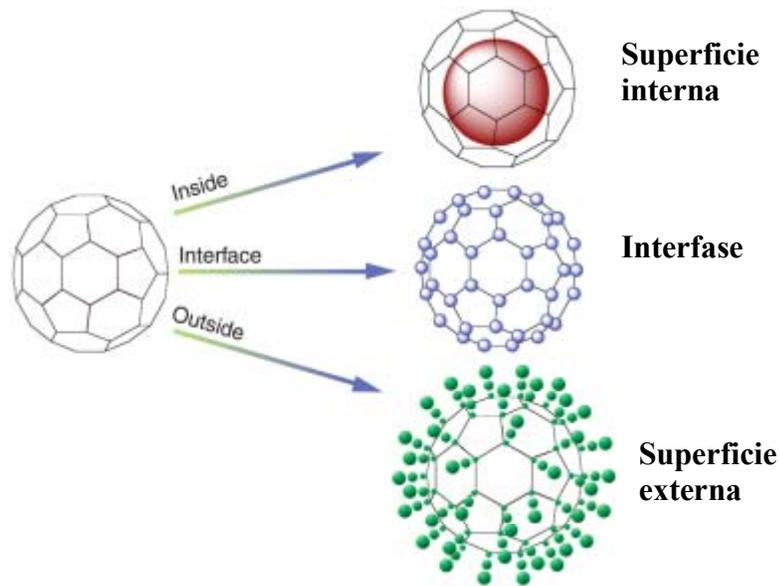


Figura 2. superficies accesibles que pueden ser funcionalizadas en una cápside viral. Imagen tomada de Douglas y Young, 2006.

Actualmente se propone la generación de una biblioteca de estuches virales viables para ser empleadas, vea Figura 3 (Uchida et al., 2007; Douglas y Young, 2006), además sugieren la búsqueda de nuevas cápsides con características en particulares, una de las

mas interesantes es que presenten resistencia a condiciones ambientales extremas, temperaturas y ambiente ácido. Por otro lado, debemos recordar que para atar fármacos (DNA, RNA, péptidos o compuestos químicos) las condiciones son semejantes a las celulares, y actualmente se cuenta con métodos de nucleación y crecimiento de partículas y óxidos de metal y partículas magnéticas que son suaves y no presentan ningún inconveniente para biomoléculas (Nam et al., 2008). Por otro lado, si analizamos las cápsides que se han utilizado o proponen útiles, sus bloques de construcción, es decir la proteína de la cual se forman, les permite únicamente generar un tipo de ensamble ya sea esférico o tubular. Desde un punto de vista industrial, producción a gran escala y costo de los ensambles, seria de gran utilidad que ambas estructuras se formen de un solo bloque de construcción. En ese sentido, recientemente se ha observado que las proteínas aisladas de la cápside de algunos virus dependiendo de sus condiciones químicas (pH, fuerza iónica) o presencia de DNA pueden formar ambas estructuras tanto tubulares como esféricas. Dos ejemplos son: la proteína CP del virus del moteado clorótico (CCMV) (Mukherjee et al., 2006) y la proteína VP6 de rotavirus (Mathieu et al., 2001). Esta última a diferencia de la proteína CP tiene la ventaja de no necesitar la presencia de DNA para poder formar tubos. Los ensambles de la proteína VP6 han sido estudiados por diversos métodos, además se han encontrado las condiciones adecuadas de pH y fuerza iónica para poder obtener tubos y esferas (Lepault et al., 2001).

Los ensambles de VP6 han sido analizados a través de diferentes tipos de microscopía. Además, la estructura tridimensional de los tubos pudo ser resuelta a través de la criomicroscopía electrónica, desafortunadamente la estructura 3D de las esferas ha sido difícil de obtener por la heterogeneidad en sus dimensiones (Mathieu et al., 2001). En este sentido, las técnicas de microscopía por sonda (SPM) podrían ser de gran utilidad en el estudio de estas estructuras, ya que han mostrado pueden resolver a nivel molecular desde proteínas individuales hasta grandes cápsides virales (Gaczynska y Osmulski 2008; Frederix et al., 2009; Gaczynska y Osmulski 2009; Müller y Dufrêne, 2008; Fotiadis, 2006). La microscopía de fuerza atómica (AFM) ha sido la mas empleada en comparación con el microscopía de barrido de efecto túnel (STM) para estudiar biomoléculas. Pocos son los trabajos que reportan el empleo del STM en el estudio de

biomoléculas, a pesar que ha mostrado ser eficiente en la obtención de imágenes a resolución molecular de biomoléculas sencillas y cápsides virales.

En este contexto, esta tesis se dirige para contribuir en el conocimiento de los autoensambles de proteína VP6. El objetivo principal fue el análisis estructural de los tubos y esferas. Para este fin empleamos la microscopía de efecto túnel. El capítulo se estructura de la siguiente manera. En los antecedentes se da una descripción de la proteína VP6, algunos materiales que se han diseñado con ayuda de las biomoléculas y un acercamiento a la microscopía de efecto túnel, mientras que en el apéndice se describe el principio en el que se basa el STM y sus modos de operación, después planteamos los objetivos, resumimos la metodología y presentamos nuestros resultados y discusión, para finalmente dar las conclusiones.

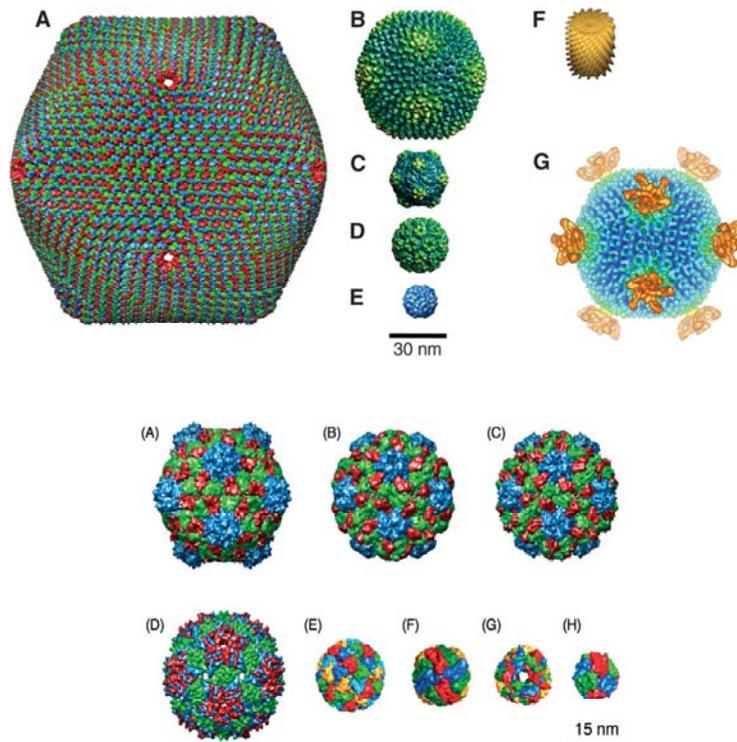


Figura 3. Cápsides que han sido propuestas para tener alguna utilidad en bionanotecnología. Para más datos vea Uchida et al., 2007; Douglas y Young, 2006.

## 2. ANTECEDENTES

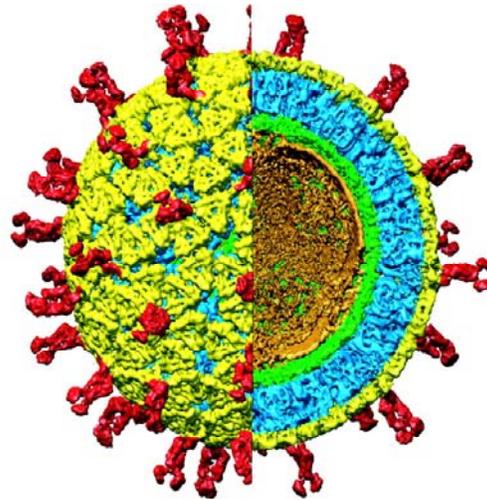
## 2.1 PROTEÍNA VP6 SE ENSAMBLA EN ESTRUCTURAS TUBULARES Y ESFÉRICAS

Los rotavirus son virus de doble cadena de RNA, pertenecen a la familia Reoviridae y son los agentes de mayor causa de gastroenteritis severa en niños. Tienen una cápside icosaédrica no envuelta relativamente grande ( $\sim 1,000 \text{ \AA}$ ) que almacena 11 segmentos de RNA, cada segmento codifica para una proteína, con excepción de uno que codifica para dos proteínas (segmento 11). De las 12 proteínas codificadas por el genoma viral, seis son estructurales y seis no estructurales, las proteínas que codifica el virus son bien conocidas y sus propiedades han sido ampliamente estudiadas (Estes et al., 2001).

La cápside del virus se forma por tres capas proteicas concéntricas y las proteínas que la forman son VP2, VP6, VP7 y VP4, vea Figura 4(a), dentro de estas la proteína VP6 juega un papel clave en la organización del virión (Patton y Spencert, 2000; Greig et al., 2006). La unidad biológica de la proteína VP6 es un trímero, es una molécula alargada y su forma recuerda una torre (Prasad et al., 1996). El trímero mide 9.5 nm de largo, su base es triangular (vista transversal) de 6.0 nm por lado, la cabeza (vista transversal) tiene forma de hexágono de 4.5 nm de diámetro (Mathieu et al., 2001). El polimorfismo de la proteína es una de sus características más notables, Ready y Sabara en 1987 reportaron por primera vez que la proteína VP6 aislada se autoensambla produciendo estructuras tubulares y esféricas. De igual forma Estes y colaboradores en 1987 mencionaron que la proteína VP6 tiene la propiedad de ensamblarse espontáneamente en tubos. El polimorfismo de la proteína ha sido bien caracterizado y se ha encontrado que el pH y fuerza iónica son los principales parámetros que controlan su autoensamble en ambos tubos y esferas, la Figura 4(b) muestra la respuesta de la proteína a cambios en pH y fuerza iónica (Lepault et al., 2001).

Como se observa en la Figura el pH y fuerza iónica son los parámetros que controlan *in vitro* la agregación de VP6. En pH neutro y fuerza iónica baja, la proteína forma tubos de 45 nm en

(a)



(b)

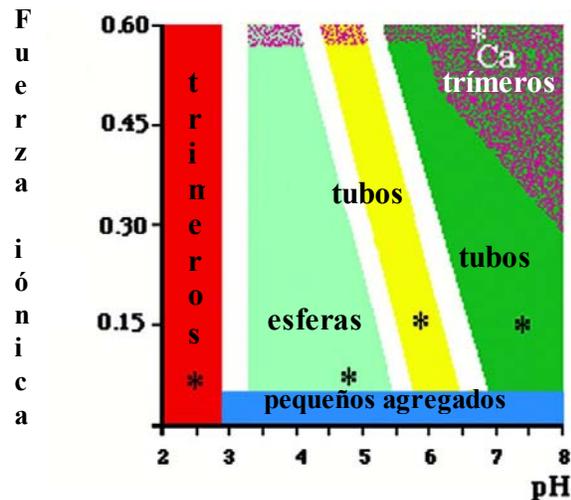


Figura 4. (a) Reconstrucción a 9.5 Å de resolución de la cápside de rotavirus. Las capas son coloreada radialmente, los picos representan la proteína VP4, en amarillo se muestra la capa VP7, en azul VP6 y en verde VP2, en naranja la maquinaria interna ( RNA y polimeraza). (b) Gráfico que muestra la respuesta de la proteína VP6 a cambios en pH y fuerza iónica. Imágenes tomadas de Estes et al., 2001 y Lepault et al., 2001, respectivamente.

diámetro y varios micrómetros de longitud, vea Figura 5(a), Sin embargo, cuando se emplean sales como  $\text{CaCl}_2$  o  $\text{ZnCl}_2$  con el objeto de incrementar la fuerza iónica (de 100 a 200 mM) los ensamblajes se desestabilizan y únicamente trimeros de VP6 están presentes en la solución. En un pH entre 5.5-7.0 y fuerza iónica baja los trimeros forman tubos

grandes de 75 nm en diámetro y micrómetros de longitud vea Figura 5(b), y al igual que en los tubos pequeños si se incrementa la fuerza iónica los tubos se desestabilizan. En pH ácido entre 3.0-5.5 se forman partículas esféricas de tamaños heterogéneos, la mayoría de las esferas pequeñas tienen un diámetro de 75 nm, similar al de los tubos grandes. En condiciones ácidas, pH de 2.0-3.0, e independientemente de la fuerza iónica, las estructuras se desestabilizan y solo los trímeros están presentes (Lepault et al., 2001).

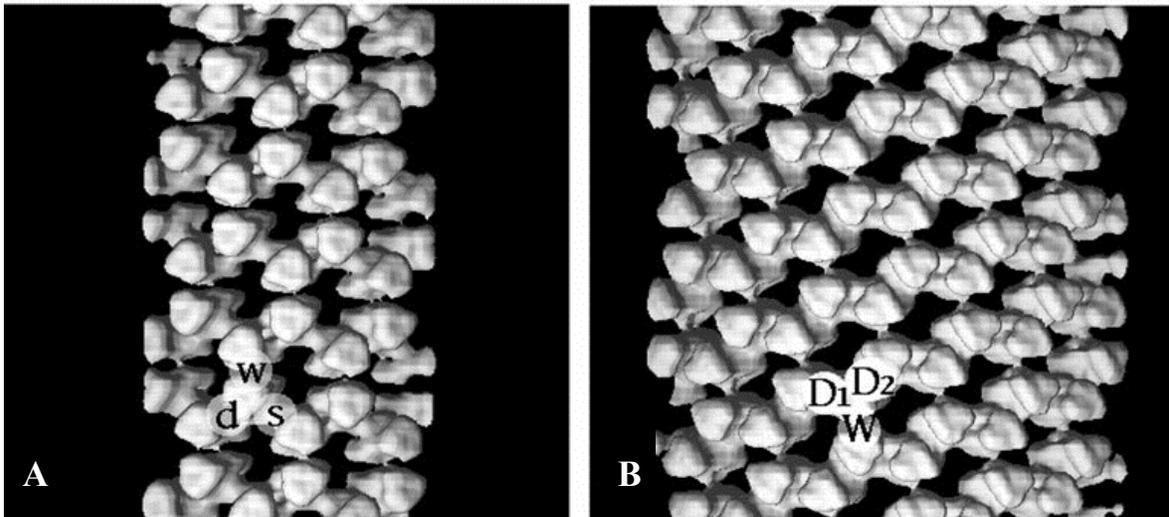


Figura 5. Representación en tercera dimensión de la reconstrucción de los tubos pequeños (A) y grandes (B). Los tres diferentes tipos de contactos son: débil (w, W), simple (s) y doble densidad (d, D1 y D2). De igual forma se muestra un modelo que muestra los contactos de doble densidad, generado de datos de rayos X. Imagen tomada de Lepault et al., 2001.

A través de microscopía Crio-electrónica se ha observado que los tubos y esferas en su superficie exhiben un enrejado casi hexagonal. Como se mencionó la estructura tridimensional de los tubos y esferas pudo ser resuelta, en la reconstrucción la forma de torre de VP6 se ha podido apreciar, donde la base se expone hacia la luz del tubo y la cabeza al exterior vea Figura 5, además, en su estructura se observan tres diferentes tipos de contactos laterales por trímero, uno débil (w, W) a comparación de los restantes que son simples (s) y de doble densidad (d, D1 y D2). Debido al contacto débil los tubos dan la apariencia de estar formados solo por cintas, lo cual es más claro en los tubos pequeños, vea Figura 5. En los tubos pequeños los trímeros muestran los tres tipos de

contactos, el débil señalado como "w", de doble densidad "d" y simple "s". En los tubos grandes los trímeros únicamente tienen dos tipos de contactos, el simple señalado como "W" y dos de doble densidad "D1 y D2" (Lepault et al., 2001).

## **2.2 APLICACIONES DE NANOTUBOS Y NANOESFERAS**

Un número de revisiones discuten la fabricación de nuevos materiales por medio del autoensamble y las aplicaciones potenciales de las nanoestructuras (Bittner, 2005). Debido a su homogeneidad, autoensamble tubular o esférico son de particular interés las cápsides virales. Por ejemplo, los tubos pueden ser anclados por uniones antígeno-anticuerpo a superficies y pueden servir como sensores de moléculas en fase fluida o como antena para ondas electromagnéticas (Bittner, 2005). Además los tubos han irrumpido en el campo de los dispositivos electrónicos, ya que pueden servir como platillas y templetas para sujetar o sintetizar nanopartículas, por ejemplo, nanopartículas semiconductoras, metálicas, magnéticas y cristales, esto con la finalidad de fabricar nanoalambres, nanoarreglos y chips (McMillan et al., 2002; Nam, 2008; ). El método de producción empleando plantillas de biomoléculas surge ya que técnicas convencionales como la litografía se acercan a sus límites teóricos y prácticos (McMillan et al., 2002). Por los resultados que se tienen con este método se plantea los dispositivos electrónicos evolucionaran rápidamente (Fung et al., 2004).

El empleo de plantillas virales para generar nanoalambres es uno de los más explorados, excelentes resultados se han obtenido empleando la cápside del virus mosaico del tabaco (TMV) y el virus M13, por ejemplo, la cápside de este último ha sido modificada para expresar gran cantidad de aminoácidos glutamato para incrementar su afinidad al ion de cobalto y después de que el ion se ha anclado a la superficie de la cápside, los virus se exponen a un agente reductor, con este procedimiento han podido generar nanoalambre de óxido de cobalto los cuales se emplearon como ánodo en el primer prototipo de nanobaterías (que emplea partículas virales), las cuales se especula tendrán un mejor desempeño con respecto a las baterías convencionales, serán más ligeras y flexibles. En

la Figura 6 mostramos imágenes de microscopía de transmisión de los nanoalambres fabricados con M13 y un esquema del proceso de fabricación (Nam et al., 2006). Las biomoléculas han mostrado que en realidad pueden ser empleadas para la construcción de circuitos electrónicos ya que ofrecen un control preciso de su arreglo y orientación (Yoo et al., 2006).

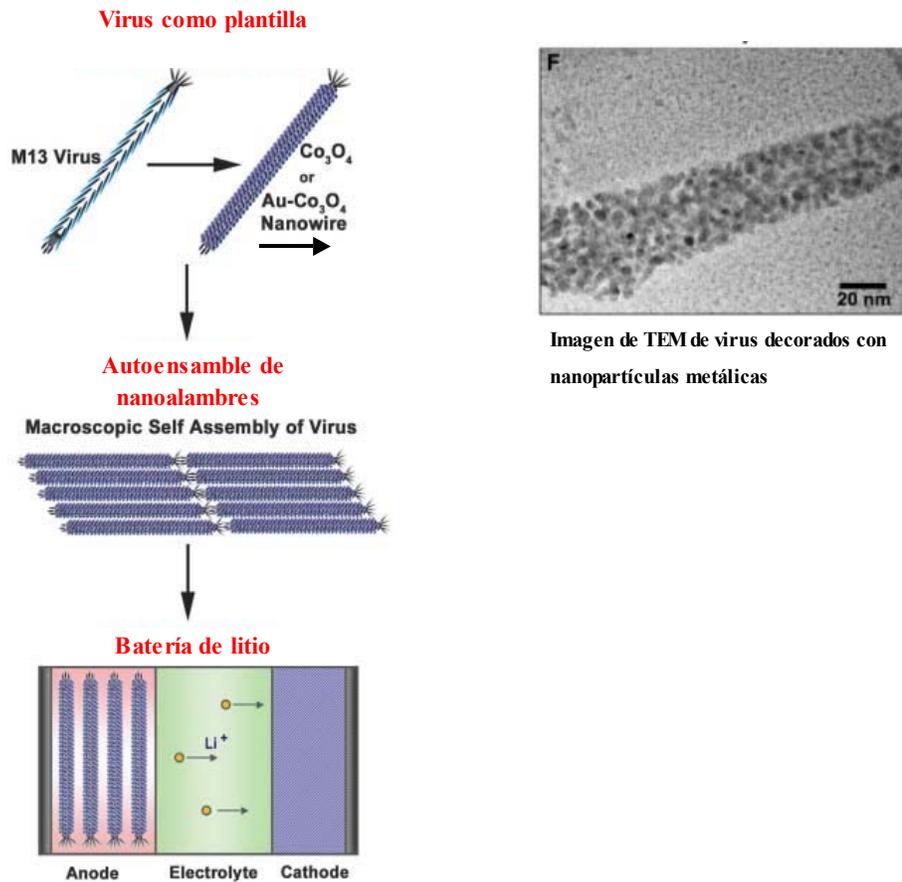


Figura 6. Esquema de metodología en construcción de un prototipo de nanobatería empleando virus. Imágenes tomadas de Nam et al., 2006.

Además, en biomedicina se ha visto la eficiencia de vesículas de péptidos como liberadores de fármacos. En esta línea también se exploran sistemas virales como vectores. Sin embargo, a pesar de que tienen una tasa superior de transferencia comparada con las vesículas de péptidos presenta limitaciones, ya que pueden promover mutagénesis, carcinogénesis y una respuesta inmune (Iatrou et al., 2007).

### 2.3 MICROSCOPIÀ DE BARRIDO DE EFECTO DE TÚNEL (STM)

El rápido progreso en nanociencia y nanotecnología en parte se debe a la mejora en las herramientas analíticas. La invención del STM resultó ser un evento crucial en la historia de la nanociencia y nanotecnología (Fung et al., 2004). Es una técnica que permite la visualización del arreglo de átomos de la superficie de un material, y simultáneamente el análisis de sus propiedades electrónicas (Ago et al., 2004; Odom et al., 1998). Además permite manipular átomos individuales, así como moléculas orgánicas pequeñas (Otero et al., 2006). El STM han obtenido imágenes impactantes y en ocasiones hasta dramáticas del arreglo atómico de un gran número de superficies metálicas y semiconductoras (Rosei y Rosei, 2002). Por otro lado, su potencial para analizar materiales aislantes como biomoléculas permanece en discusión ya que el mecanismo de formación e interpretación de las imágenes no es totalmente conocido.

Independientemente de esa controversia, diferentes grupos han reportando el empleo del STM en estudios estructurales de biomoléculas (Campbell et al., 2007). De 1983 a la fecha, el número de publicaciones se a incrementando rápidamente, el numero casi se triplicó a partir de 1987 lo que probablemente esta relacionado con una mayor comercialización del equipo. La mayor dificultad que se ha encontrado al trabajar con biomoléculas en los distintos ambientes (líquido, ambiental y vacío) radica en la baja conductividad y la resistencia eléctrica que presentan (resistencias de  $10^{15}$ - $10^{18}$   $\Omega$ m). El hecho de trabajar en el modo de corriente constante, vea apéndice, puede ocasionar que la punta se hunda en la molécula hasta que la corriente de túnel fluya entre los dos electrodos, o que al realizar el barrido la retracción de la punta no sea suficiente para evitar la colisión con la muestra, ocasionando imágenes donde no es posible discriminar sus propiedades de las inducidas por los efectos de la punta (Alliata et al., 2004). A pesar, de estos inconvenientes el STM abrió la posibilidad de realizar estudios de alta resolución de biomoléculas.

### 3. OBJETIVOS DEL TRABAJO

#### 3.1 GENERAL

El objetivo de esta tesis es incrementar el conocimiento que se tiene de los ensamblajes de la proteína viral VP6 ya que los tubos y esferas podrían ser sistemas de interés para diseñar nuevos materiales. La principal tarea fue el análisis estructural de los ensamblajes empleando la microscopía de efecto túnel (STM).

#### 3.2 PARTICULARES

1. Encontrar las condiciones óptimas para observar los ensamblajes de VP6 a través de la microscopía STM.
2. Obtener imágenes de los ensamblajes de la proteína viral VP6.
3. Realizar un análisis estructural de los ensamblajes y comparar los resultados obtenidos por STM con los datos que se tienen de otras técnicas de microscopía y cristalografía por rayos X.

### 4. MÉTODOS Y MATERIALES

**Preparación de muestras:** Las muestras de proteína VP6 fueron proporcionadas por los Doctores Octavio Ramírez y Laura Palomares del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las muestras de esferas o tubos se depositaron sobre superficies nuevas de grafito pirolítico, por el método de prueba de gota y spin coating.

**Microscopía de efecto túnel:** Se empleó un microscopio de barrido por sonda (JSPM, 5200) de la firma Jeol (Japón). El análisis se realizó en condiciones ambientales (temperatura y presión) en modo de corriente constante, se emplearon puntas de Pt/Ir

cortadas manualmente. Las imágenes que se muestran no sufrieron ninguna modificación y los perfiles que se muestran se trataron con el software Nanotec Electronica WSxM© Scanning Probe Microscopy software (Horcas et al., 2007).

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Nanotubos**

Al analizar las muestras de nanotubos la microscopía de STM permitió detectar una gran variedad de morfologías incluyendo agregados con morfologías irregulares así como tubulares. Además, se pudo observar el trímero de VP6, de acuerdo con los resultados de cristalografía de rayos X (Mathieu et al., 2001) mide alrededor de 9.5 nm de longitud, tiene una base triangular con una sección transversal de alrededor de 6.0 nm y una cabeza con forma hexagonal y una sección transversal de 4.5 nm, vea Figura 7 (a), también tiene una cavidad en el centro de la molécula. Los análisis de trímeros por microscopía electrónica de transmisión no han podido resolver ninguno de los detalles morfológicos mencionados, en contraste el STM fue capaz de proveer algunos detalles relacionados.

En particular, la imagen mostrada en Figura 7 (b) es consistente con la morfología del trímero de VP6. En los análisis esas estructuras exhibieron típicamente un ancho de  $\sim 9.0$  nm y una altura de  $\sim 1.6$  nm para su base, alrededor de 8.0 nm de ancho y 1.0 nm de altura para su cabeza (la base y cabeza se señalan en la Figura 7 como h y b respectivamente), y la longitud estimada de la molécula fue de  $\sim 12$  nm. De este modo, las dimensiones obtenidas en STM son un poco grandes comparadas a las reportadas en los datos cristalográficos. No obstante, esa discrepancia puede ser explicada por el efecto de convolución de la punta, efecto que ha sido reportado ampliamente para técnicas de microscopía de barrido por sonda (Alliata et al., 2004). Por otro lado la cavidad en la proteína se observó como una cavidad en el centro del trímero, se señala con la flecha roja en la Figura 7(c) esta morfología concuerda con la reconstrucción por crió microscopía electrónica (Lepault et al., 2001).

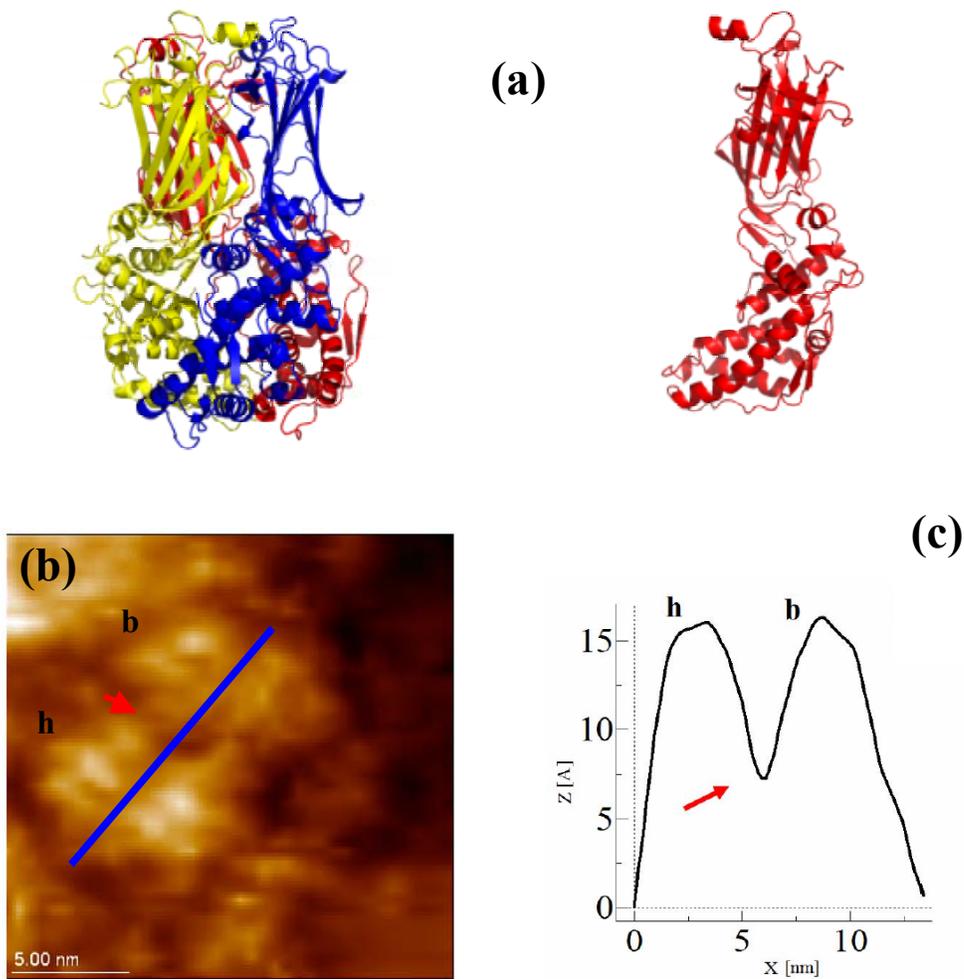


Figura 7. (a) Representación de listones de proteína VP6, además se muestra el monómero (pdb 1qhd), en la imagen (b) se muestra una imagen STM del trímero (19.1×19.1 nm V=0.801 V, I=1.23 nA) y en (c) el perfil del trímero la región se indica con una línea azul.

En los experimentos se observaron estructuras tubulares de 40-65 nm de ancho, un amplio espectro de alturas 5-35 nm, y una longitud de cientos de nanómetros a pocos micrómetros. Tubos rectos y aislados se encontraron con mayor regularidad, aunque en algunos casos también se observaron manojos y estructuras ramificadas, vea Figura 8 (a). De nuestras observaciones podemos mencionar que los nanotubos tuvieron una buena afinidad por la superficie del sustrato, HOPG, es decir la absorción física fue un proceso favorable en el cual se generaron tubos bien formados y dispersos. Además que el

proceso de adsorbió física fue relativamente débil, por dos razones: (i) se preservó la estructura tubular de la cápside viral (Knez et al., 2004) y (ii) se observó que los tubos eran desplazados fácilmente por la punta del STM durante el barrido.

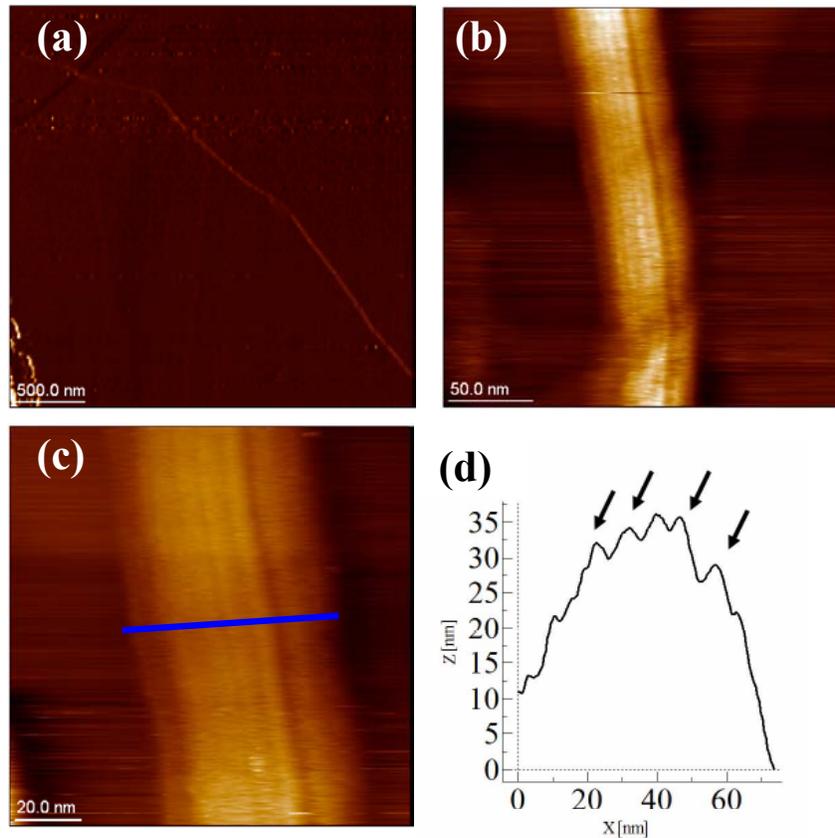


Figura 8. Imágenes de nanotubos de proteína VP6. En (a) se muestra un tubo a baja magnificación ( $2.86 \times 2.86 \mu\text{m}$ ,  $V=1.37 \text{ V}$ ,  $I=1.34 \text{ nA}$ ), (b) y (c) sección de un tubo a alta magnificación ( $235.9 \times 235.9 \text{ nm}$  y  $119.9 \times 119.9 \text{ nm}$ , respectivamente;  $V= 0.271 \text{ V}$ ;  $I=2.08 \text{ nA}$ ); (d) perfil del tubo mostrado en (c) a lo largo de la línea azul.

De igual forma los tubos fueron analizados (en el instituto de biotecnología) por microscopía de transmisión, sus imágenes representativas a diferentes magnitudes se muestran en la Figura 9. En estas se puede observar una diferencia interesante entre los dos tipos ensambles: mientras que las nanoesferas son estructuras con un eje bien definido, los nanotubos siempre exhibieron ejes algo difusos, esto es especialmente claro en la Figura 9 (b y d), esta característica puede ser implicada en las dificultades que

se observaron en la determinación del diámetro de los nanotubos en la imágenes de STM.

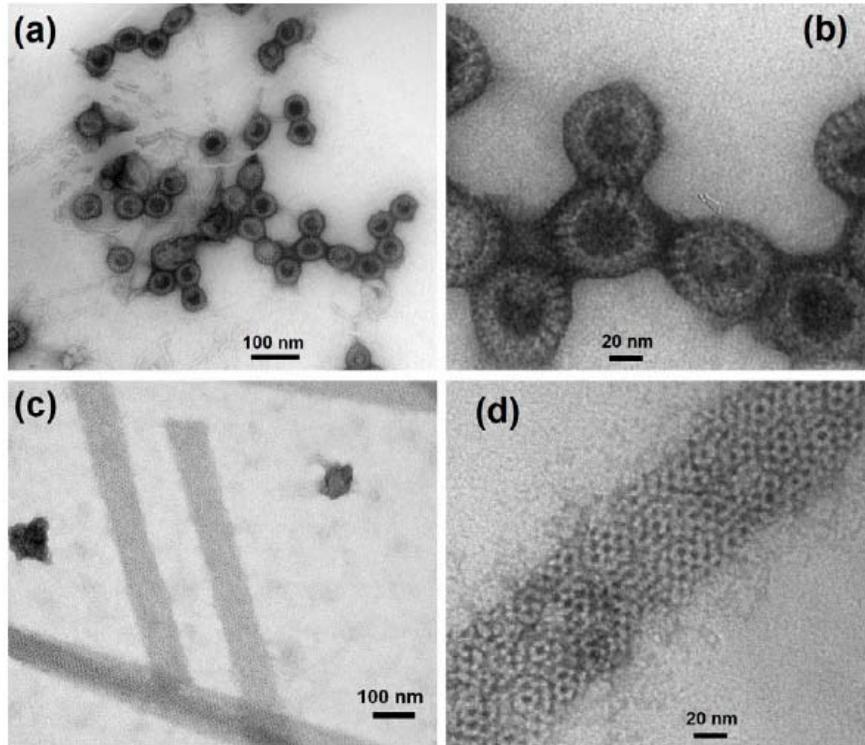


Figura 9. Imágenes de TEM de nanoesferas (a, b) y nanotubos de 75 nm diámetro (c, d) a diferentes magnificaciones.

La Figura 8 (c) muestra una imagen STM de un tubo aislado típico, el ancho estimado es alrededor de 65 nm, mientras su altura aparente, obtenida del análisis de su sección transversal es de  $\sim 35$  nm. El ancho es consistente con el obtenido de las imágenes de TEM, este es cercano a 75 nm, vea Figura 9 (d). Es posible que la discrepancia (mas cercano, 10 nm con respecto al diámetro de 75-nm; menos cercano, 20 nm con respecto a el de 45 nm) sea una consecuencia directa de los ejes difusos de los nanotubos observados por TEM, vea Figura 9 (d), la cual introduce una incertidumbre significativa en la determinación del ancho por STM. Como se mencionó, la altura del tubo es de 35 nm, demasiado baja para la esperada para un tubo con un diámetro de 75 nm. Sin

embargo, este fenómeno puede ser atribuido a las pobres propiedades de conductividad de la proteína (Shapir et al., 2005).

Más análisis de detalles estructurales de los tubos revelaron un patrón longitudinal de surcos, el cual se observa claramente en la Figura 8 (b, c). Resultó realmente interesante el análisis de la sección transversal en una dirección perpendicular al eje del tubo (Figura 8(d)) el cual mostró una buena correlación de la periodicidad del patrón (flechas en Figura 8 (b)) con el ancho de la cabeza del trímero de VP6 ( que es  $\sim 4.5$  nm) la cual como se había mencionado se proyecta hacia el exterior del tubo (Lepault et al., 2001).

El STM fue capaz de proveer imágenes a resolución molecular, en las cuales no únicamente el patrón longitudinal, sino además se observa un surco transversal puede ser observado. La Figura 10 muestra un ejemplo de resolución molecular obtenida de un nanotubo de VP6 de  $\sim 65$  nm de diámetro. Como en el caso previo, el patrón del surco longitudinal está bien resuelto y además un patrón transversal también es evidente, sin embargo, el longitudinal permanece dominante. Los bordes entre las unidades estructurales son generalmente claros a través de las imágenes, desafortunadamente no fueron resueltas de manera similar para todas las regiones del nanotubo. En este sentido, descartamos un efecto que se pueda atribuir a una deformación estructural o interacción punta-muestra, debido a que ningún fragmento de la muestra se detectó, además no se observó distorsión de la imagen durante el barrido (Campbell et al., 2007). El fenómeno de contraste de inversión puede estar involucrado (Shapir et al., 2005); las flechas rojas y azules en la Figura 10 (a) señalan las regiones de contraste negativo y positivo respectivamente. Por otro lado las flechas amarillas muestran una región de alto contraste. La imagen de alta resolución en la Figura 10 (b) nos da una estimación del tamaño de cada unidad estructural, las cuales miden  $\sim 5.0$  nm, esto es mas claro si se observa la sección transversal en la Figura 10 (c), las dimensiones están en concordancia con el tamaño estimado de 4.5 nm de la Figura 8 (b-d).

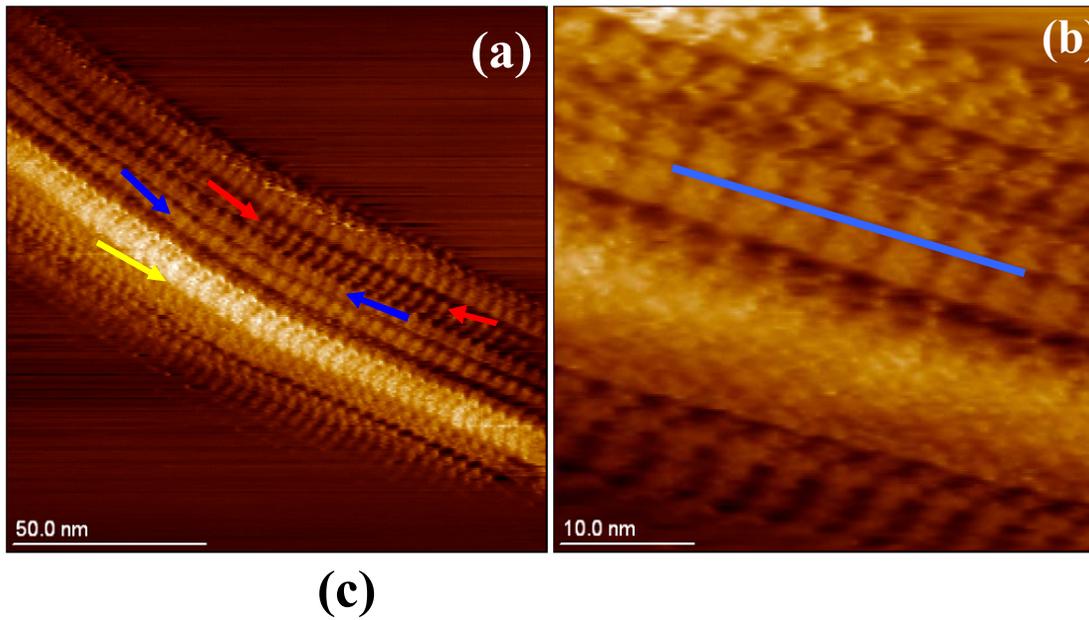


Figura 10. (a, b) Imágenes a resolución molecular, las cuales muestran el arreglo de los trímeros de VP6 en un tubo, y en (c) se muestra el perfil del tubo mostrado en (b), se tomó a lo largo de la línea azul. Parámetros STM: (a)  $139.7 \times 139.7$  nm,  $V=0.223$  V,  $I=1.22$  nA; (b)  $40.1 \times 40.1$  nm,  $V=0.183$  V,  $I=1.06$  nA, respectivamente.

Los tubos en microscopía crio-electrónica, han mostrado un arreglo helicoidal, lo cual es característico de nanotubos pequeños y grandes (Lepault et al., 2001). Este arreglo no

pudo ser observado con STM, de igual forma no se apreció el arreglo de cintas helicoidales en los tubos. Esto pudo deberse a imperfecciones de las puntas que se emplearon ya que se cortaron manualmente y no se tuvo un control sobre su calidad. Además, uno tiene que recordar que la estructura 3D reportada, fue determinada por análisis de crio-microscopía electrónica, en el cual promedian la estructura de un gran número de moléculas en un cristal (que minimizan ampliamente la suavidad de la muestra y por lo tanto preservando la estructura de los objetos) en una alta humedad relativa. Por el contrario, los nanotubos de VP6 en nuestro estudio son nanoensambles simples, que se analizaron bajo condiciones ambientales y en una baja humedad relativa. En adición, las muestras fueron observadas en una superficie altamente hidrofóbica, la cual se sabe puede inducir una notable deformación estructural, sobre tubos huecos. Así, las condiciones de análisis en STM son muy diferentes comparadas con el ambiente bajo las cuales los nanotubos de VP6 fueron originalmente caracterizados en crio-microscopía (Kim, 2004).

## **5.2 Nanoesferas**

Finalmente, analizamos las muestras de esferas de VP6. Como se muestra en la Figura 11, se observaron estructuras esféricas de un tamaño heterogéneo, en general se observaron esferas con anchos de 100-500 nm y una altura alrededor de 50 nm. Las esferas en su mayoría se encontraron como aglomerados, característica que comparte con las imágenes de TEM, vea Figura 9 (a y b). Además se observaron partículas pequeñas las cuales aparentemente son esferas parcialmente ensambladas y otro tipo de agregados.

En general las esferas completas mostraron la presencia de defectos estructurales, esto es claro en la Figura 11 (b). Por la homogeneidad y continuidad de los defectos suponemos fueron ocasionados por la punta, esto es bastante lógico ya que son ensambles de gran tamaño a diferencia de los tubos ensambles mas pequeños y donde no se observaron defectos ocasionados por la punta, probablemente los ensambles esféricos son demasiado

grandes y la punta choco y se hundió en la molécula hasta que la corriente de túnel fluyera entre los electrodos y continuo con el barrido (Alliata et al., 2004).

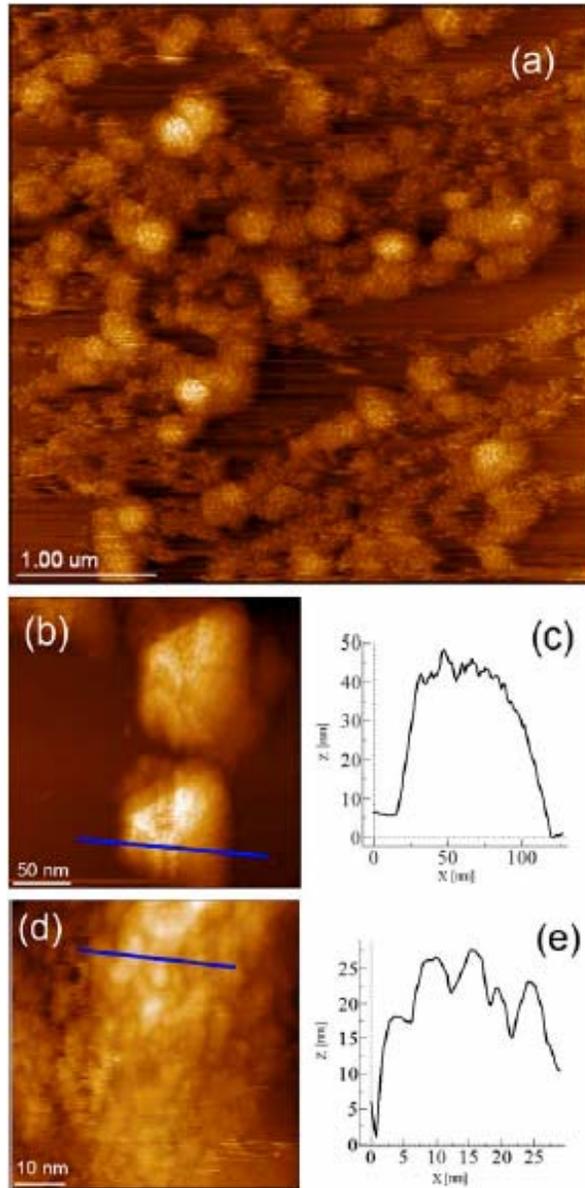


Figura 11. STM imágenes de nanoesferas de VP6. (a) Esferas de ca. 200-nm diámetro ( $4.17 \times 4.17 \mu\text{m}$ ,  $V = -1.062 \text{ V}$ ,  $I = 0.094 \text{ nA}$ ); (b) Esferas de ca. 100-nm diámetro ( $250.8 \times 250.8 \text{ nm}$ ;  $V = 0.552 \text{ V}$ ;  $I = 1.00 \text{ nA}$ ); (c) perfil de esfera superior en (b), se indica en la línea azul; (d) imagen a alta resolución de una esfera ( $56.8 \times 56.8 \text{ nm}$ ,  $V = 0.522 \text{ V}$ ,  $I = 1.00 \text{ nA}$ ); (e) perfil de la esfera mostrada en (d), vea línea azul.

Las nanoesferas de VP6, fueron observadas como partículas de forma y tamaño heterogénea, al observar las imágenes a resolución molecular en su superficie se observan estructuras granulares sin exhibir un patrón definido, al analizar el perfil de las esferas, las estructuras granulares tuvieron un tamaño de  $\sim 5.0$  nm el cual corresponde con los datos cristalográficos de la proteína VP6, vea Figura y perfil en 11 (c y e) . La falta de un orden estructural en la superficie de las nanoesferas puede ser explicada por el factor que las esferas son partículas lábiles ensambladas a través de interacciones débiles entre proteínas. Además es bien conocido que la estructura (conformación) de proteínas puede ser influenciada considerablemente por su adsorción física en superficies hidrofóbicas (Libersou et al., 2008).

## 6. CONCLUSIONES

- 1- La microscopía de efecto túnel permite observar tubos y esferas, de la proteína viral VP6, de grandes dimensiones ( $> 40$  nm). Esto resulta de gran importancia ya que es la primera vez que se observan biomoléculas de esas dimensiones con ayuda del STM.
- 2- Las condiciones óptimas para observar los ensambles de VP6 a través de la microscopía STM variaron sin embargo el rango óptimo de voltaje y corriente fueron:  $V_s = 0.2 - 1.5$  V y  $I_t = 1.0 - 1.34$  nA.
- 3- El STM permite observar las unidades estructurales de los tubos y esferas, es decir el trímero de VP6, de igual forma permite observar algunas de sus características estructurales, las cuales corresponden con los datos de cristalografía de rayos X que se tienen.
- 4- La microscopía de efecto túnel permite observar a nivel molecular la estructura de tubos y esferas de proteína viral VP6 a nivel molecular, la cual concuerda con algunas características que se han obtenido por microscopía electrónica y Crioelectrónica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Ago, H., Azumi, R., Ohshima, S., Zhang, Y., Kataura, H., Yumura, M (2004) STM study of molecular adsorption on single-wall carbon nanotube surface, *Chemical Physics Letters*, Vol. 383, No. 5-6, pp. 470.

Aldaye, F.A., Palmer, A.L., Sleiman, H.F. (2008) Assembling materials with DNA as the guide, *Science*, Vol. 321 (5897), pp. 1795-1799.

Alliata, D., Andolfi, L., Cannistraro, S. (2004) Tip to substrate distances in STM imaging of biomolecules, *Ultramicroscopy*, Vol. 101, No. 2-4, pp. 231-240.

Behrens, S.S. (2008) Synthesis of inorganic nanomaterials mediated by protein assemblies, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 18 (32), pp. 3788-3798.

Bittner, A. M. (2005) Biomolecular rods and tubes in nanotechnology, *Naturwissenschaften*, Vol. 92 (2), pp. 51-64.

Chenxiang L., Yonggang K., Zhe L., James H. W., Yan L., Hao Y. (2009) Mirror Image DNA Nanostructures for Chiral Supramolecular Assemblies, *Nano Letters*, Vol. 9 (1), pp. 433-436.

Charles R. M. y Punit K. (2003) The emerging field of nanotube biotechnology, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 2, pp. 29-37.

Cheng-Yu L., Chris M. W., Valerie A. K., Leonard H. R., Glen R. N. (2009) Vault Nanoparticles Containing an Adenovirus-Derived Membrane Lytic Protein Facilitate Toxin and Gene Transfer, *ACS Nano*, Vol. 3 (3), pp. 691-699.

Campbell, S. A., Smith, J. R., Jungblut, H., Lewerenz, H. J. (2007) Protein imaging on a semiconducting substrate: A scanning tunnelling microscopy investigation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 599 (2), pp. 313-322.

Carrasco, C., Castellanos, M., De Pablo, P.J., Mateu, M.G. (2008) Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105 (11), pp. 4150-4155.

Douglas, T., Young, M. (2006) Viruses: Making friends with old foes, *Science*, Vol. 312 (5775), pp. 873-875.

Evans, D.J. (2008) The bionanoscience of plant viruses: Templates and synthons for new materials, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 18 (32), pp. 3746-3754.

Estes, M. K., Crawford, S. E., Penaranda, M. E. (1987) Síntesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expresión system, *Journal of Virology*, Vol. 61, No 5, pp.1488-1494.

Estes, M.K., Kang, G., Zeng, C.Q.-Y., Crawford, S.E., Ciarlet, M. (2001) Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis, *Novartis Foundation Symposium 238*, pp. 82-100.

Frederix, P.L.T.M., Bosshart, P. D., Engel, A. (2009) Atomic force microscopy of biological membranes, *Biophysical Journal*, Vol. 96 (2), pp. 329-338.

Fung, S. Y.; Hong, Y.; Dhadwar, S. S.; Zhao, X.; Chen, P. in *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*; Nalwa, H. S., Ed.; American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA USA, 2004.

Fotiadis, D., Jastrzebska, B., Philippsen, A., Muller, D.J., Palczewski, K., Engel, A. (2006) Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors, *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 16 (2), pp. 252-259.

Gaczynska, M., Osmulski, P.A. (2008) AFM of biological complexes: What can we learn?, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Vol. 13 (5), pp. 351-367.

Gaczynska, M., Osmulski, P.A. (2009) Atomic Force Microscopy as a Tool to Study the Proteasome Assemblies. *Methods in Cell Biology*, Chapter 3, Vol. 90, pp. 39-60.

Greig, S.L., Berriman, J.A., O'Brien, J.A., Taylor, J.A., Bellamy, A.R., Yeager, M.J., Mitra, A.K. (2006) Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 356, No. 1, pp. 209.

Hermis I., Henrich F., Sirkku H., Nikos F., Janne R., Olli I., Dieter R., Jimmy M., y Nikos H. (2007) architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides. Formation of gene vehicles, *Biomacromolecules*, Vol. 8 (7), pp. 2173-2181.

Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baro, A.M. (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Review of Scientific Instruments*, 78 (1), art. no. 013705.

Iatrou, H., Frielinghaus, H., Hanski, S., Ferderigos, N., Ruokolainen, J., Ikkala, O., Richter, D., Hadjichristidis, N., (2007) Architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides Formation of gene vehicles, *Biomacromolecules*, Vol. 8 (7), pp. 2173-2181.

Knez, M., Sumser, M.P., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Hoffmann, D.M.P., Kuhnke, K., Kern, K. (2004) Binding the Tobacco Mosaic Virus to Inorganic Surfaces, *Langmuir*, Vol. 20 (2), pp. 441-447.

Kim, D. T., H. W. Blanch, and C. J. Radke, (2004) *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York ,Vol. 4, p. 3041.

Kapikian, A. Z. 2001 A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal Novartis Found. Symp. 238, pp. 153-171.

Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Rey, F.A. (2001) Structural polymorphism of the major capsid of rotavirus, EMBO Journal, Vol. 20 (7), pp. 1498-1507.

Li, Z., Baker, M.L., Jiang, W., Estes, M.K., Venkataram Prasad, B.V. (2009) Rotavirus architecture at subnanometer resolution, Journal of Virology, Vol. 83 (4), pp. 1754-1766.

Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L.F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Lepault, J. (2008) Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: A potential regulatory switch of viral particle transcription activity, Journal of Virology, Vol. 82 (6), pp. 2844-2852.

Mukherjee, S., Pfeifer, C.M., Johnson, J.M., Liu, J., Zlotnick, A., (2006) Redirecting the coat protein of a spherical virus to assemble into tubular nanostructures, Journal of the American Chemical Society, Vol. 128 (8), pp. 2538-2539.

McMillan, R.A., Howard, J., Zaluzec, N.J., Kagawa, H.K., Mogul, R., Li, Y.-F., Paavola, C.D., Trent, J.D., (2005) A self-assembling protein template for constrained synthesis and patterning of nanoparticle arrays, Journal of the American Chemical Society, Vol. 127 (9), pp. 2800-2801.

McMillan, R.A., Paavola, C.D., Howard, J., Chan, S.L., Zaluzec, N.J., Trent, J.D., (2002) Ordered nanoparticle arrays formed on engineered chaperonin protein templates, Nature Materials, Vol. 1 (4), pp. 247-252

Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V.V., Rey, F.A., (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion, *EMBO Journal*, Vol. 20 (7), pp. 1485-1497.

Muller, D.J., Dufrene, Y.F., (2008) Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nature Nanotechnology*, Vol. 3 (5), pp. 261-269.

Nam, K.T., Lee, Y.J., Krauland, E.M., Kottmann, S.T., Belcher, A.M., (2008) Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds, *ACS Nano*, Vol. 2 (7), pp. 1480-1486.

Nam, K.T., Kim, D.-W., Yoo, P.J., Chiang, C.-Y., Meethong, N., Hammond, P.T., Chiang, Y.-M., Belcher, A.M. (2006) Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes, *Science*, Vol. 312 (5775), pp. 885-888.

Odom, T.W., Huang, J.-L., Kim, P., Lieber, C.M. (1998) Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes, *Nature*, Vol. 391, No. 6662, pp. 62.

Otero, R., Rosei, F., Besenbacher, F. (2006) Scanning tunneling microscopy manipulation of complex organic molecules on solid surfaces, *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol. 57, pp. 497-499.

Patton, J.T., Spencert, E. (2000) Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses, *Virology*, Vol. 277 (2), pp. 217-225.

Prasad, B.V.V., Rothnagel, R., Zeng, C.Q.-Y., Jakana, J., Lawton, J.A., Chiu, W., Estes, M.K. (1996) Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus, *Nature*, Vol. 382, No. 6590, pp. 471-474.

Ready, K. F. M. y Sabara, M. (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein, *Virology* Vol. 157, No. 1, pp. 189.

Rosei, F., Rosei, R. (2002) Atomic description of elementary surface processes: Diffusion and dynamics, *Surface Science*, Vol. 500, No. 1-3, pp. 399.

Rothemund, P.W.K. (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature*, Vol. 440 (7082), pp. 297-302.

Ros, P. (2008) Self assembly: Design by DNA, *Nature Nanotechnology*, Vol. 3, pp. 132.

Shafir, E., Yi, J., Cohen, H., Kotlyar, A.B., Cuniberti, G., Porath, D. (2005) The puzzle of contrast inversion in DNA STM imaging, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 109 (30), pp. 14270-14274.

Uchida, M., Klem, M.T., Allen, M., Suci, P., Flenniken, M., Gillitzer, E., Varpness, Z., Douglas, T. (2007) Biological containers: Protein cages as multifunctional nanoplatfoms, *Advanced Materials*, Vol. 19 (8), pp. 1025-1042.

Whyburn, G.P., Li, Y., Huang, Y. (2008) Protein and protein assembly based material structures, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 18 (32), pp. 3755-3762.

Yoo, P.J., Nam, K.T., Qi, J., Lee, S.-K., Park, J., Belcher, A.M., Hammond, P.T. 2006 Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces, *Nature Materials*, Vol. 5 (3), pp. 234-240.

Zhang, S. (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly, *Nature Biotechnology*, Vol. 21 (10), pp. 1171-1178.

Zhang, S. (2002) Emerging biological materials through molecular self-assembly, *Biotechnology Advances*, Vol. 20 (5-6), pp. 321-339.

Zhao, X., Zhang, S. (2004) Fabrication of molecular materials using peptide construction motifs, *Trends in Biotechnology*, Vol. 22 (9), pp. 470-476.

Zhao, X., Zhang, S. (2007) Designer self-assembling peptide materials, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 7 (1), pp. 13-22.

## **Capítulo 2**

# **Estudio STM de la Adsorción de Albúmina Sérica Humana en la Superficie de Nanotubos de Carbono de Capa Simple**

## 1. INTRODUCCIÓN

Por más de una década los nanotubos de carbono (CNTs), que incluyen nanotubos de simple (SWNTs) y de múltiples capas (MWNTs), han sido tema de interés en trabajos de investigación en física, química y ciencia de materiales debido a sus propiedades eléctricas, químicas y mecánicas únicas. Actualmente la posibilidad de integrar las propiedades catalíticas o de reconocimiento (especificidad) de biomoléculas (Ej. proteínas / enzimas, antígenos, anticuerpos o DNA) con las propiedades de CNTs resulta muy atractiva por el gran número de aplicaciones que promete (Katz, y Willner, 2004). Hoy en día la integración de nanotubos y biomoléculas ha arrojado los primeros prototipos de sistemas bioelectrónicos (sensores de biomoléculas). Además el desarrollo de esta área incluye el avance de diferentes temas; mejora en métodos de separación de nanotubos, control y arreglo de ensambles de sistemas nanotubo/biomolécula en superficies, puntas para microscopía por sonda, y puntas modificadas para distintos análisis, así como sistemas liberadores de fármacos, ingeniería de tejidos (Lin et al., 2004).

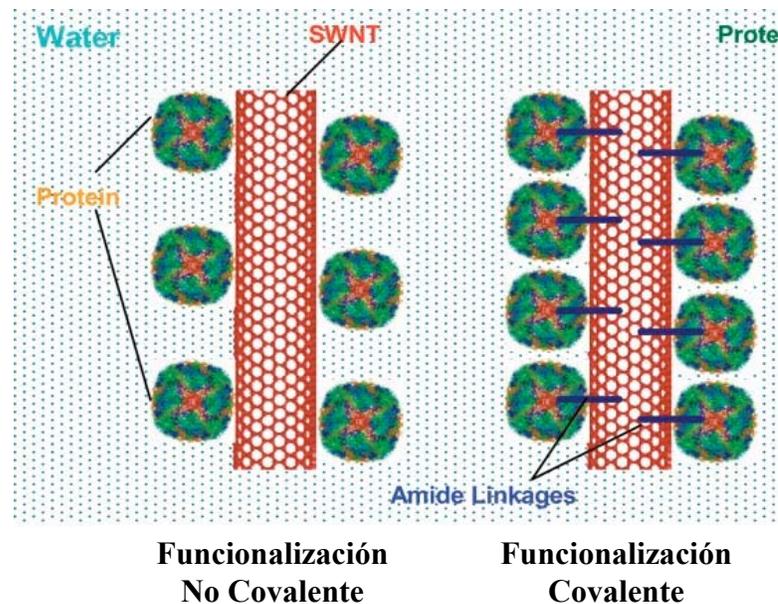


Figura 12. Ejemplos de métodos empleados para inmovilizar proteínas en nanotubos de carbono. Imagen tomada de Lin et al., 2004.

En general para realizar el gran número de aplicaciones que se plantean, se requiere la sinergia entre la biomolécula y el nanotubo. Diferentes estrategias se han diseñado buscando inmovilizar biomoléculas en la superficie interna y externa, así como en las puntas de CNTs (Lin et al., 2004). La funcionalización de CNTs puede ser covalente o no covalente. La mayor estabilidad, accesibilidad y selectividad se obtiene a través de la funcionalización covalente, vea Figura 12 (Jiang et al., 2004), sin embargo, las uniones covalentes requiere, la modificación química del nanotubo (oxidación por ácidos, por ejemplo nítrico) comprometiendo sus propiedades intrínsecas. En contraste la funcionalización no covalente tiene la indudable ventaja de no distorsionar la estructura electrónica intrínseca de los nanotubos, esta se conserva totalmente intacta (Basiuk et al., 2007); sin embargo, tienen la gran desventaja de tener una falta de especificidad en la interacción (lo cual se explica ya que todos los átomos de carbono en la superficie de un nanotubo son casi idénticos y promueve un anclaje azaroso). Aunque en algunos casos se ha observado biomoléculas pueden ser adsorbidas con un arreglo específico (Lin et al., 2007), el cual depende de condiciones de concentración de ambos nanotubos y biomoléculas, de sales, pH, o el diámetro del nanotubo solo por mencionar algunos.

Varias moléculas tales como polisacáridos, péptidos, ácidos nucleicos, se sabe son capaces de adsorber y / o enrollar de forma no covalente alrededor de nanotubos de carbono, vea Figura 13 (Zheng et al., 2003; Numata et al., 2005; Dieckmann et al., 2003; Barone et al., 2005; Gao et al., 2003). Además, muchas proteínas también se sabe pueden ser adsorbidas espontáneamente en las superficies de nanotubos, aunque algunas con mayor afinidad que otras. La cavidad de tubos abiertos también ha sido llenada con proteínas pequeñas, así como enzimas las cuales conservan su actividad (Tsang et al., 1995 y Davis, 1998).

Diversos grupos han estudiado la funcionalización no covalente de nanotubos con proteínas, de esos trabajos tres temas son de gran interés: 1) unión no específica (NSB, por sus siglas en inglés) de proteínas a nanotubos de carbono, 2) funcionalización de nanotubos para resistir la interacción no específica y 3) facilitar la unión específica de proteínas a nanotubos funcionalizados (Shim et al., 2002).

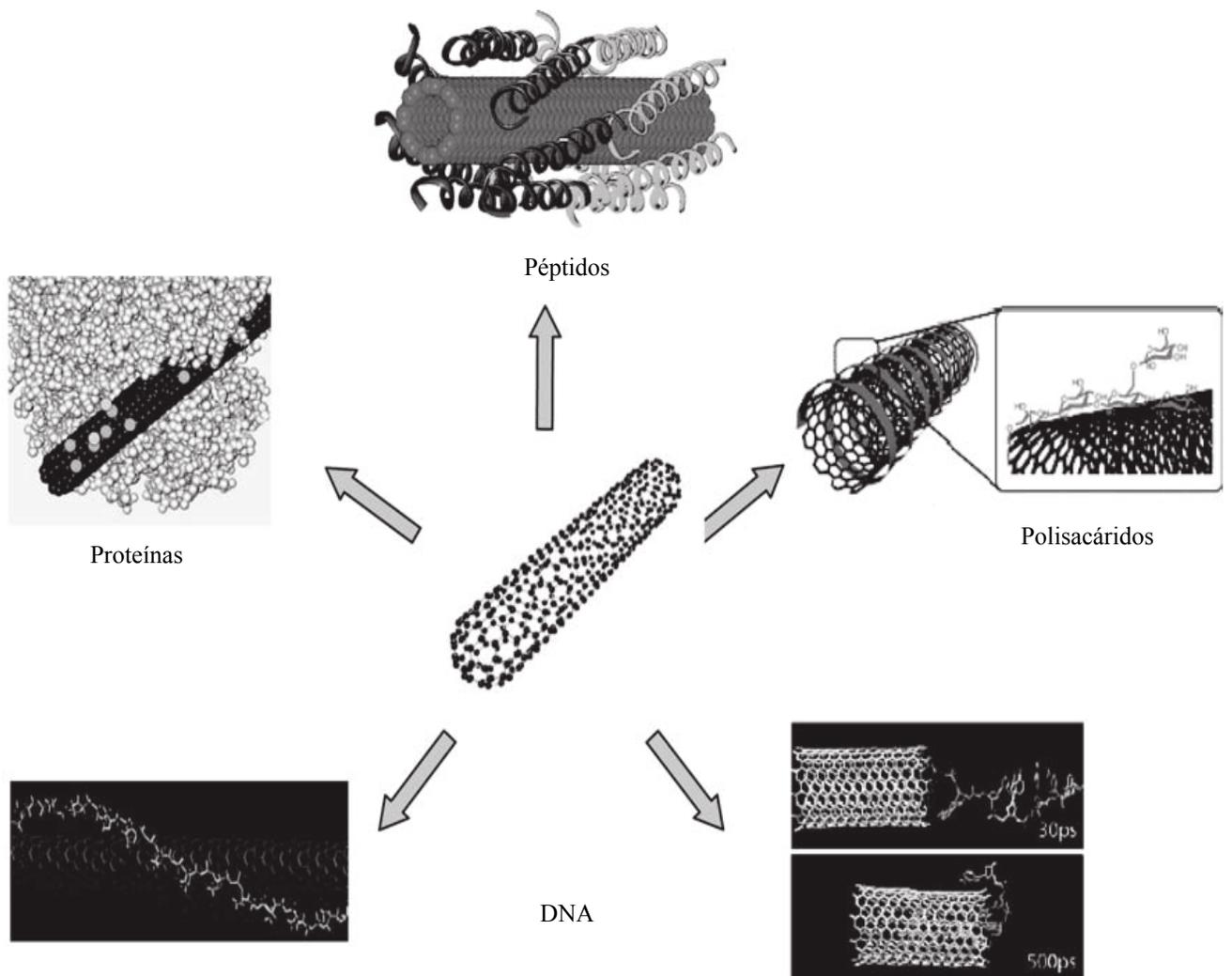


Figura 13. Nanotubos de carbono funcionalizados con biomoléculas. Imagen tomada de Lin et al., 2008.

La NSB ha sido estudiada (Chen et al., 2001) a través de diversas técnicas bioquímicas y de microscopía, por ejemplo de transmisión (TEM) y de fuerza atómica (AFM), sin embargo, hasta la fecha no conocemos ningún trabajo que haya empleado que la microscopía de efecto túnel (STM).

Nuestro trabajo se enfoca en el estudio de la absorción de la albúmina de suero humano (HSA, por sus siglas en inglés) y nanotubos de carbono de pared sencilla (SWNTs) con la microscopía STM, ya que posee mayor resolución que las técnicas de microscopía convencionales (Yarotski et al., 2009). Además, desempeña un papel importante en el estudio de la geometría y propiedades electrónicas de nanotubos de carbono (Odom et al., 2002) y de igual forma, ha mostrado su eficacia al estudiar biomoléculas como ADN, proteínas y virus depositadas en superficies conductoras como oro y carbono (Xu et al., 2006). En ese contexto la microscopía de STM puede proveer información a nivel molecular que ayudará a incrementar el conocimiento que se tiene de la absorción de proteínas en nanotubos. La HSA es una de las proteínas más abundantes en el sistema circulatorio (Sugio et al., 1999), desempeña un papel importante en la solubilización, transporte y distribución de ácidos grasos, metabolitos, y fármacos (Zunszain et al., 2003). Además es una proteína que ha sido empleada en trabajos teóricos de la interacción entre HSA y superficies de carbono y nanotubos (Raffaini y Ganazzoli, 2007). Este capítulo se estructura de la siguiente manera: primero damos una pequeña introducción de nanotubos de carbono y mencionamos algunas bioaplicaciones, mencionamos algunos trabajos que estudian la interacción entre CNTs y proteínas, después describimos a la albúmina en términos de su estructura 2D vía STM, planteamos los objetivos, la metodología, planteamos nuestros resultados y discusión, y finalmente damos nuestras conclusiones.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 NANOTUBOS DE CARBONO (CNTs)**

El carbono es uno de los elementos más extendidos en la naturaleza y es crítico para un número importante de estructuras biológicas y geológicas. Su importancia química radica en que puede formar enlaces con hibridación  $sp$ ,  $sp^2$  y  $sp^3$ , permitiendo la producción de un amplio número de geometrías y por tanto de compuestos. Se conocen alótropos del carbono: grafito, diamante, fulerenos y nanotubos de carbono. El fullereno más común ( $C_{60}$ )

es una estructura rígida y altamente simétrica, consiste de 60 átomos de carbono que forman 20 hexágonos y 12 pentágonos arreglados en un icosaedro truncado (Giacalone y Martín, 2006). Los nanotubos de carbono (CNTs) son estructuras cilíndricas huecas, formadas por hojas de grafito se enrolladas. Desde el descubrimiento de los nanotubos de carbono, se han invertido en su estudio grandes esfuerzos gubernamentales y de agencias privadas por el potencial de aplicaciones que prometen.

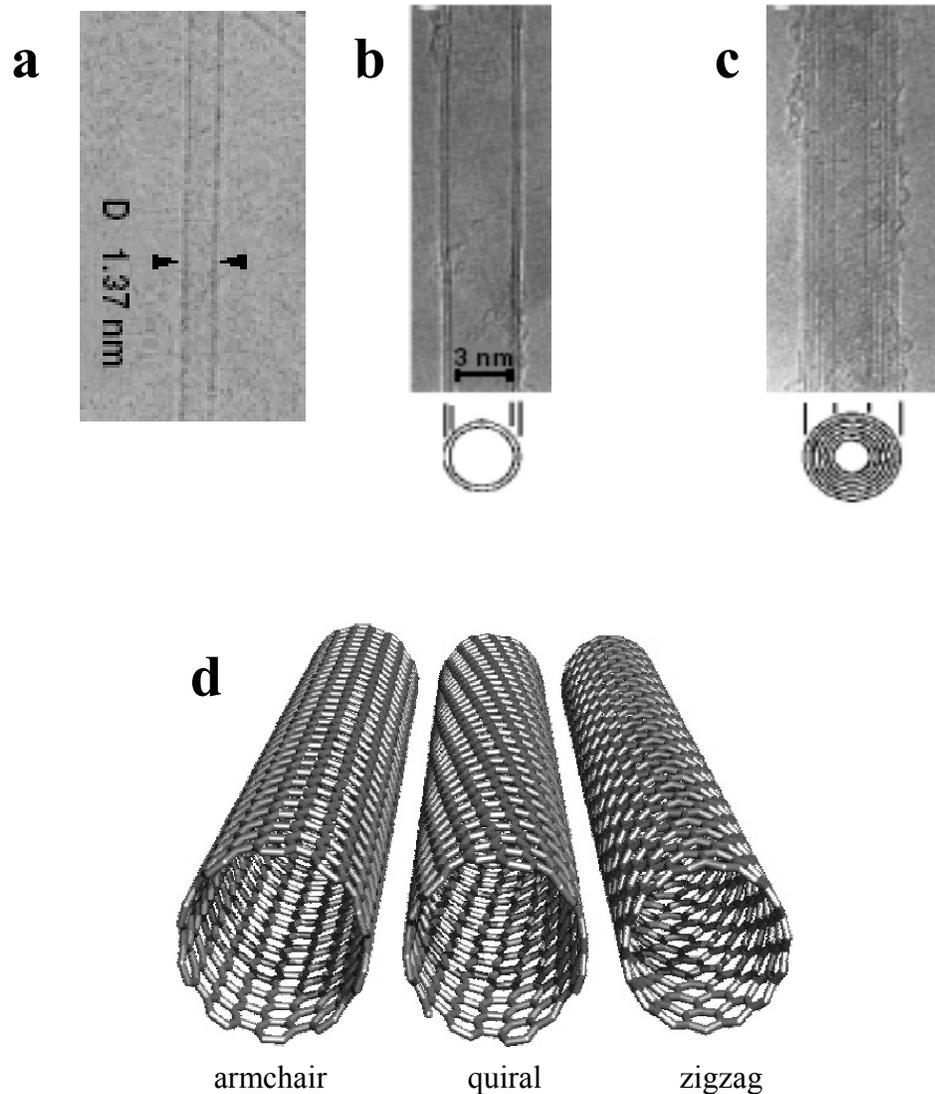


Figura 14. Imágenes, TEM de (a) SWNT, (b) DWNT, (c) MWNT y en (d) se muestran esquemas de un tubo armchair, quiral y zigzag, tomadas de Bekyarova et al., 2005 y Katz, y Willner, 2004.

Los nanotubos por el número de capas ocurren de tres tipos, de simple (SWNT), doble (DWNT, que en ocasiones atribuyen a MWNTs) y múltiple capas (MWNT), vea Figura 14. Los tubos de múltiples capas consisten de varios cilindros coaxiales, cada uno hecho de una capa simple de grafito, enrollados uno sobre otro. Las técnicas más comunes para su producción son arco eléctrico y deposición química de vapor (CVD), el crecimiento de los MWNTs pueden requerir un catalizador, el diámetro exterior de MWNTs es de 2 a 100 nm, mientras que el interior es de 1–3 nm y su longitud es de hasta varios  $\mu\text{m}$ . Un SWNT puede verse como una estructura cilíndrica hueca que se forma cuando una hoja de grafito se enrolla, su diámetro varía y depende del método de producción: los más comunes oscilan entre 0.4 y 2.0 nm y la longitud es cercana a 1mm. Los tubos de capa simple se producen por arco eléctrico, ablación por láser, CVD, proceso catalítico en fase de gas (HiPco), y su crecimiento requiere metales como catalizadores, usualmente Fe, Ni, Co, Mo (Bekyarova et al., 2005). Teóricamente sus propiedades mecánicas, eléctricas y térmicas dependen de su quiralidad. Pueden distinguirse tres quiralidades diferentes, armchair, zigzag y quiral, vea Figura 14. Los SWNTs son semiconductores o metálicos dependiendo de su diámetro y quiralidad. Todos los armchair son metálicos, mientras que los de tipo zigzag y quiral pueden ser metálicos o semiconductores. Los semiconductores en el diseño son altamente sensibles, sus propiedades han acaparado poderosamente la atención ya que sus propiedades eléctricas cambian drásticamente cuando algunas moléculas se adsorben en su superficie, esto se debe a que todos sus átomos están en la superficie y los efectos de la adsorción en su superficie se manifiestan críticamente en sus propiedades físicas, incluyendo electrónicas. Esa distorsión de sus propiedades ha arrojado los primeros prototipos de biosensores (Kong y Dai 2001).

### **3.2 BIOAPLICACIONES DE NANOTUBOS DE CARBONO**

Es difícil encontrar un área en las actividades humanas que no sea influenciada por la moderna nanotecnología. Entre varios nanomateriales que existen actualmente, los nanotubos de carbono son pilares de gran cantidad de nuevos dispositivos. Como se

mencionó, existen diferentes métodos de producción y algunos progresos se han hecho en el control de crecimiento de una población de nanotubos, en otras palabras, que se produzcan nanotubos monodispersos con propiedades uniformes en quiralidad, diámetro y longitud, y en consecuencia nanotubos con propiedades ópticas y eléctricas uniformes. Esta falta de uniformidad es una de las principales razones por lo cual los nanotubos son raramente usados en aplicaciones comerciales actualmente. Para tratar de sobrepasar esta limitación, se han dedicado esfuerzos en desarrollar estrategias pos-síntesis, por ejemplo: química selectiva, destrucción selectiva, separación electroforética, cromatografía y ultracentrifugación, las cuales han mostrado resultados sobresalientes (Hersam, 2008).

### **Aplicaciones en la captura de bacterias**

Un excelente ejemplo de la aplicación de nanotubos es la demostración de usar SWNTs funcionalizados con carbohidratos como un sistema para la agregación de esporas de anthrax (*Bacillus anthracis*). Debido a la formación de agregados de esporas es supuesto para reducir el riesgo por de transmisión por inhalación de la enfermedad (Wang et al., 2006). Se han explorado estrategias para desinfección de bacterias empleando nanotubos, el óxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) se sabe puede producir radicales hidroxilo, los cuales son oxidantes fuertes para desinfección microbiana. Por lo cual MWNTs se han cubierto con  $\text{TiO}_2$  y han mostrado una mayor eficiencia en la inactivación de *Bacillus cereus* que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  comerciales (Lee et al., 2006).

### **Ingeniería de tejido e implantes**

Debido a su rigidez mecánica y estable naturaleza química (no se degradan), el uso de nanotubos como nano-refuerzo para materiales biocompatibles y biodegradables ha sido explorado. Kiernan et al. 2003, reportó que el uso de nanotubos mezclados con PmPv y PU es viable para producir músculos artificiales. Li et al., 2005, estudio cubiertas hechas de

titanio y nanotubos para la adhesión de osteoblastos. Harrison y Atala, 2007, mostraron que arreglos de nanotubos pueden ser usados para formar redes neuronales ya que encontraron que las neuronas disociadas se auto-organizan en redes compactas. Las ventajas de usar nanotubos de carbono en aplicaciones biomédicas son su biocompatibilidad en contacto con la sangre, hueso, cartílago y tejido suave, además su bio-funcionalidad ya que pueden reforzar o mejorar las funciones de implantes y propiedades de tejidos (Lau et al., 2008).

### **Biotransportadores**

La liberación exitosa de pequeños fármacos, genes y péptidos en tejidos, células, o componentes celulares es de particular interés biomédico debido a las enormes implicaciones en áreas de terapia génica. Generalmente, las moléculas terapéuticas, no tienen la habilidad para trasladarse directamente dentro de las células, varios transportadores han sido explorados para asistir la traslocación de cargas y liberarlas en una célula blanco. La forma como de aguja de los nanotubos inspiró la imaginación que los nanotubos podrían penetrar en las células, y tener una ventaja sobre los biotransportadores convencionales (liposomas, polímeros (PEG, polipéptidos), nanopartículas y otros nanomateriales inorgánicos). El potencial ha sido demostrado experimentalmente por varios grupos, uno de los grupos más adelantados en este tema es el de H. Dai et al., 2007 quien es su más reciente trabajo, mostró que nanotubos de simple capa funcionalizados covalente y no covalente por surfactantes, pueden ser cargados en su superficie externa con doxorubicina (fármaco ampliamente usado para tratar varios tipos de cáncer), el anclaje de doxorubicina ocurre en el espacio entre el surfactante. El complejo puede liberar doxorubicina en las células cancerígenas (el fármaco se libera en función del pH celular) y provoca su inhibición. Ellos mostraron resultados realmente interesantes ya que demostraron que el complejo nanotubo-doxorubicina tiene una eficacia superior a doxorubicina. Además una toxicidad inferior a doxorubicina: esto se debe a que los tubos funcionalizados tuvieron una mayor afinidad a las células cancerígenas (Liu et al., 2007).

## **Puntas para microscopía de barrido por sonda**

La microscopía de fuerza atómica es una herramienta importante en biología y química debido a su habilidad única de poder trabajar en distintos ambientes, y el nivel de información obtenido depende críticamente del tamaño y forma de la punta. Las puntas comerciales son de nitruro de silicio y actualmente existen puntas de nanotubos de carbono las cuales tienen varias ventajas sobre las convencionales: i) elevada proporción de aspecto para muestras de características profundas y estrechas, ii) baja adherencia entre la punta y la muestra, iii) la habilidad para doblarse elásticamente, cuando se aplican grandes fuerzas, iv) el potencial para tener resolución  $< 0.5$  nm en el caso de nanotubos de capa simple individuales (Cheung et al., 2000).

### **3.3 NANOTUBOS DE CARBONO-PROTEÍNAS (INTERACCIÓN INESPECÍFICA)**

Se ha reportado un amplio número de proteínas que son adsorbidas espontáneamente en la superficie de nanotubos de carbono (Tabla 1). La naturaleza de tales interacciones aun no es totalmente conocida y pocos son los estudios que la tratan. Actualmente el tema se encuentra en una etapa muy temprana. La teoría más apoyada por resultados experimentales y teóricos radica en la interacción de aminoácidos o motivos hidrofóbicos con la superficie de nanotubos y fulerenos. El estudio teórico realizado por Braden et al. (2000) sugiere que interacciones débiles como hidrofóbicas y enlaces  $\pi$  ( $\pi$  stacking) participan en la interacción fulereno-anticuerpo IgG, donde aminoácidos aromáticos Trp, Tyr, Phe, así como, Asn y Gln participan en la interacción. En un estudio posterior demostraron a través de microscopía de fuerza atómica que el anticuerpo IgG es también adsorbido en la superficie externa de nanotubos de capa simple (Erlanger, B.F., et al., 2001).

La participación de aminoácidos aromáticos es muy sugerida en la interacción inespecífica CNTs-proteína (Wang, S., et al., 2003). La técnica de fago mostrador (display phage) ha

servido para mostrar la afinidad de péptidos (ya que se expresa gran cantidad de secuencias en la superficie de fagos o bacterias) por algunos nanomateriales y con esta técnica ha mostrado que algunos polipéptidos tienen una afinidad selectiva por SWNTs, esas secuencias, son ricas en His y Trp, donde Trp tiene una interacción particular con la superficie de SWNTs y desempeña el papel principal en la interacción (Wang et al., 2003). Un trabajo teórico corrobora que los aminoácidos histidina y triptófano contribuyen en la interacción del polipéptido y SWNTs (De Miranda y Walsh, 2007).

Tabla 1. Proteínas que se ha observado son adsorbidas espontáneamente en nanotubos de carbono

PROTEÍNA	FUNCIÓN	PESO MOLECULAR (KDA)	DIÁMETRO (NM)	PI	TIPO CNTS	DECARGA NEUTRO	A	PH
Citocromo C	Transferencia de electrones	13	3	10.8	SWNT	positiva		
Ferritin	Almacenamiento de Hierro	440	12	4.6	SWNT	negativa		
Glucosa Oxidase	Oxidación de glucosa	160	8	4.2	SWNT	negativa		
Catalasa	Desprotonación de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	260	9	5.5	SWNT	negativa		
C1q	Proteína implicada en respuesta de sistema inmune.	460	Cabeza globular= 5 x 7 brazos= 11.5x 1.5 Tallo= 12	9.2-9.3	DWNT	positiva		
Streptavitin	Propiedades Antibióticas	53	1.8	5.0	MWNT	negativa		

Todas las proteínas de la Tabla 1 tienen diferente peso molecular, dimensiones (diámetro), punto isoeléctrico (pI) y carga, y son adsorbidas en SWNTs, DWNTs y MWNTs. Lo que puede sugerir que proteínas con características similares a las de la Tabla 1 pueden ser ancladas en nanotubos de carbono prístinos. Tabla modificada de Salvador-Morales et al., 2008.

Por otro lado, resulta de gran interés en la interacción proteína/CNT la integridad de las proteínas, ya que algunos estudios mencionan que las proteínas se despliegan para que sus residuos hidrofóbicos interactúen con la superficie de nanotubos; esto se ha comprobado experimentalmente y teóricamente (Karajanagi et al., 2003; Shen et al., 2008). En ese contexto, la región catalítica, que en su mayoría es rica en residuos hidrofóbicos, podría interactuar con el nanotubo y afectar su afinidad por el ligando y por tanto en su actividad catalítica. Sin embargo este es un tema que permanece en discusión ya que algunos trabajos reportan cambios en la estructura tridimensional de las proteínas cuando son adsorbidas en nanotubos (Karajanagi et al., 2003), y otros han encontrado que conservan su estructura (Nepal y Geckeler, 2006). En este sentido debemos recordar que cada proteína será un caso particular ya que unas son más estables que otras.

### **3. 4 ALBÚMINA SÉRICA HUMANA (HSA)**

La albúmina sérica humana (HSA) es una de las proteínas más abundantes en el sistema circulatorio (Sugio et al., 1999), desempeña un papel importante en la solubilización, transporte y distribución de ácidos grasos, metabolitos, y fármacos. HSA se caracteriza por la gran cantidad de sitios de unión a ligandos hidrofóbicos, como; ácidos grasos, bilirrubina, tiroxina y hemina (Zunszain et al., 2003). Además ayuda a mantener la presión osmótica y el pH del plasma sanguíneo (Sugio et al., 1999).

La albúmina sérica humana es un monómero de 66.5 KDa, se compone de tres dominios homólogos (I–III), adicionalmente cada dominio se divide en dos subdominios, A y B. Cada dominio muestra características estructurales y funcionales específicas (Dockal et al., 2000). Todos los dominios son predominantemente hélices  $\alpha$  (70 %) e incluyen giros, además tiene una gran cantidad de puentes disulfuro (alrededor de 17). La HSA es un polipéptido de 585 residuos (Sugio et al., 1999) de los cuales cerca del 42 % son hidrofóbicos, 11% aromáticos y 23% básicos, en la Tabla 2 se muestran los porcentajes, además muestran los porcentajes de otras proteínas, que se sabe también son adsorbidas en

las superficies de CNTs (Matsuura et al., 2006). Como dato extra se sabe que la secuencia de aminoácidos de la albúmina de sérica bovina (BSA) es muy parecida (76 %) a la sérica humana (El Kadi et al., 2006), la cual ha sido anclada covalentemente en MWNTs (Jiang et al., 200).

Estudios cristalográficos en HSA han revelado que ésta proteína tiene una estructura que recuerda la forma de un corazón, sus dimensiones aproximadas son  $8 \times 8 \times 3$  nm (Sugio et al., 1999). HSA consiste de dos cadenas distintas A y B unidas por interacciones hidrofóbicas y puentes salinos, la forma nativa se denomina como forma “N”. En solución acuosa, se sabe que HSA tiene isoformas en función del pH, la forma “N” es estable a pH neutro, pero si el pH disminuye alrededor de 4.0 la estructura se desestabiliza y adopta la forma “F”, en un pH menor a 3.5 adopta la forma “E”, en pH alrededor de 8.0 la forma “B” y en pHs superiores a 8.0 la forma “A” (Li et al., 2008), vea Figura 15.

Tabla 2. Porcentajes de residuos hidrofóbicos, aromáticos y básicos en proteína HSA\*

PROTEÍNA	RESIDUOS HIDROFÒBICOS <sup>a</sup> (%)	RESIDUOS AROMÁTICOS <sup>b</sup> (%)	RESIDUOS BÁSICOS <sup>c</sup> (%)	PUNTO ISOELÉCTRICO (PI)
Papain	31	14	24	7
Pepsin	35	11	9	2
Lisina	35	10	25	10
HSA	42	11	23	5

<sup>a</sup> Ile, Val, Leu, Cys, Met, Ala.

<sup>b</sup> Trp, Phe, Tyr, His.

<sup>c</sup> Asn, Arg, Glu, Lys, His.

\*Modificada de Matsuura et al., 2006.

## **4. OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **4.1 GENERAL**

Como mencionamos en la introducción, los nanotubos de carbono son materiales con un gran potencial en bioaplicaciones; sin embargo, se tiene poco conocimiento en la absorción de proteínas en nanotubos de carbono de capa simple. En ese sentido, este capítulo se dirige al estudio de la adsorción de la proteína albúmina sérica humana (HSA) en la superficie de nanotubos de capa simple (SWNT) para lo cual se empleamos la microscopía de efecto túnel.

### **4.1 PARTICULARES**

- 1- Analizar la absorción de HSA en la superficie de grafito pirolítico altamente ordenado empleando la microscopía STM.
- 2- Caracterizar la absorción de HSA en la superficie externa de nanotubos de capa simple con ayuda de microscopía de efecto túnel.
- 3- Analizar la integridad de HSA cuando es absorbida en la superficie de nanotubos de capa simple.

## **5. MÉTODO Y MATERIALES**

La proteína de suero humano (HSA) se obtuvo de Sigma Aldrich (codigo). Se analizaron diferentes concentraciones de HSA en agua desionizada (0.1, 0.5 and 1.0 mg/1 ml). Gotas de diferentes concentraciones se depositaron en superficies de grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG) por la prueba de gota y spin coating. Nanotubos de carbono de capa simple producidos por el proceso de descarga eléctrica (95% de pureza, diámetro de 1–1.2 nm y una longitud de cientos de nm) se obtuvieron de ILJIN (Nanotech Co., Inc., Korea). Las muestras de tubos se dispersaron en cloroformo 0.1 mg/ml y después se colocaron en

ultrasonido por 20 minutos. Los tubos se depositaron en las superficies de HOPG y después sobre estos se depositó la muestra de HSA por la prueba de gota.

Las imágenes de STM se obtuvieron en un microscopio JSPM-5200 de la firma JEOL (Japón) en modo de corriente constante a temperatura ambiente. Se emplearon puntas de Pt-Ir, cortadas manualmente. Las condiciones de voltaje (Vs) y corriente (It) se optimizaron para cada paso en particular. El software de Nanotec Electronica WSxM© Scanning Probe Microscopy se usó para el análisis de las imágenes (Horcas et al., 2007).

Se empleó un microscopio AFM, 5500 AFM/SPM de Agilent (California). Las muestras se depositaron sobre HOPG, sin embargo, en este caso se depositó una gota de una solución HSA-nanotubos (0.1mg/ml), ya que el análisis de las muestras por la técnica anterior mostraron que la HSA tiende a formar grandes películas sobre los nanotubos y a pesar que varios lavados se realizaban, la película impedía observación de los tubos.

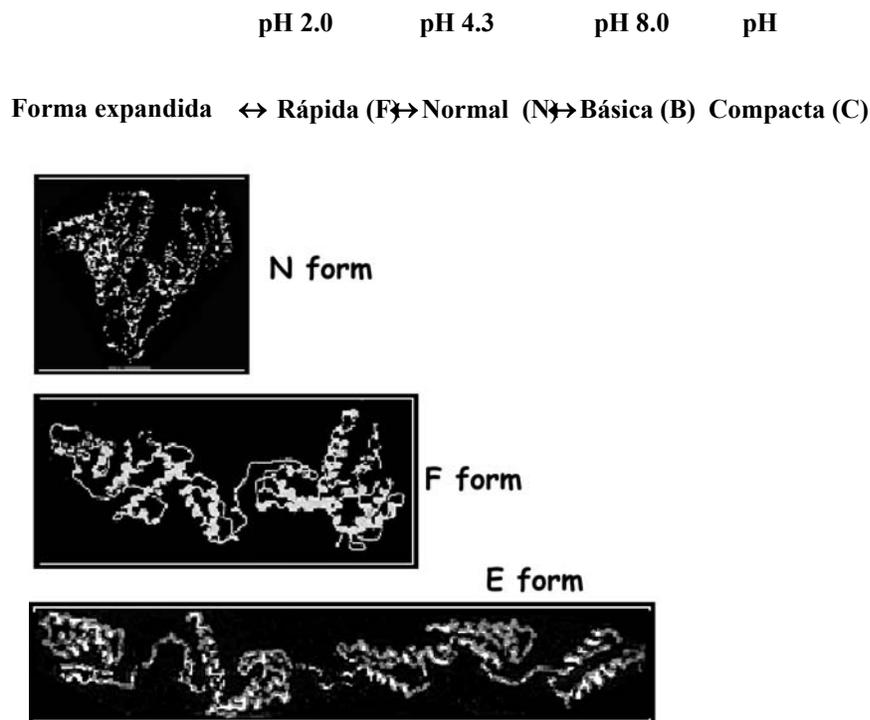


Figura 15. Conformaciones de albúmina sérica humana (HSA) a diferente pH. Imagen modificada de Li et al., 2008.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 ABSORCIÓN EN SUPERFICIE DE GRAFITO

La muestra de albúmina sérica humana se depositó sobre el sustrato, HOPG, para su análisis con STM. La Figura 16 (a y b) son imágenes de HOPG antes y después de depositar HSA, respectivamente. Las terrazas y escalones del grafito son claramente observados en la Figura 16 (a). La altura de los escalones observados fue de 1.5 a 3.7 nm, que corresponden a escalones múltiples (la distancia entre cada plano de grafito es de 0.35 nm). Después de depositar la muestra de albúmina, la superficie se cubrió de depósitos, los cuales probablemente son agregados de proteína. Los agregados se encontraron dispersos aleatoriamente sobre las terrazas, adicionalmente, pequeñas moléculas individuales con un tamaño aparente de 10-30 nm se observaron dispersas en la superficie del plano basal, las cuales por su tamaño, como se comprobó más adelante, fueron moléculas individuales de albúmina.

En algunos casos, agregados fueron localizados en los ejes de los escalones Figura 16 (c). Los ejes de los escalones tienen diferentes grupos funcionales (fenol, carboxilos, y grupos cetónicos) los cuales son principalmente hidrofílicos y contienen oxígeno, esos grupos cargados e hidrofílicos pudieron interactuar con regiones hidrofílicas de la proteína, a través de ambos puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, y por lo tanto este proceso pudo promover la nucleación y agregación de albúmina en los ejes de los escalones (Losic et al., 2006).

Como se mencionó en materiales y métodos, se analizaron diferentes concentraciones de HSA 0.1, 0.5 y 1.0 mg/ml, y se encontró que en altas concentraciones (0.5 y 1.0 mg/ml) grandes agregados de HSA son más frecuentes, y en pocas ocasiones se pueden distinguir moléculas individuales. El análisis de muestras a baja concentración de proteína (0.1 mg/ml) mostraron pocos aglomerados y gran cantidad de moléculas individuales, vea

Figura 16 (b), esta tendencia fue similar con los dos métodos de deposición que se utilizaron, prueba de gota y spin-coated.

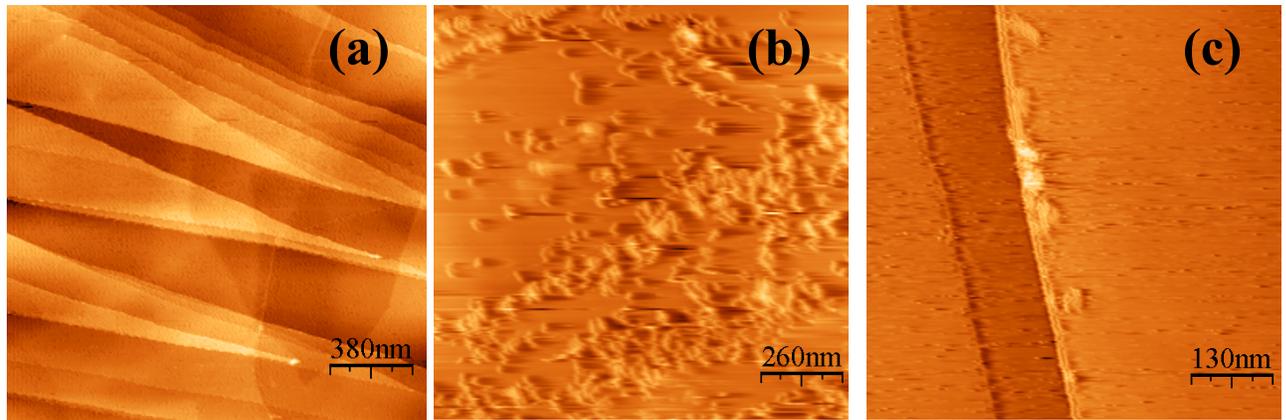


Figura 16. Imágenes de sustrato, HOPG, antes y después de depositar la muestra de HSA, (a y b respectivamente) e imagen de agregados en ejes de escalones del sustrato (c).

Se analizaron las moléculas aisladas, que fueron heterogéneas en tamaño y forma. Las formas más comunes fueron de ovaladas de 35 a 40 nm ( flechas azules en Figura 17 (c y d)) y rectangulares de  $\sim 30 \times 45$  nm ( flechas amarillas en Figura 17 (c y d)). Además se encontraron algunas moléculas con forma de "V", cada brazo tubo  $\sim 6.0$  nm de ancho y  $\sim 8.0$  nm de largo (vea Figura 17 (b)). Como se mencionó en la introducción, la albúmina sérica humana es un monómero de  $8 \times 8 \times 3$  nm de dimensiones, y su estructura secundaria se compone en un 90 % de alfa hélices y el resto son giros (Sugio et al., 1999). La HSA puede ser vista como dos cadenas diferentes unidas, estas cadenas son estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y puentes salinos. La estructura nativa es estable a pH 7.0 y se denomina forma "N", vea Figura 17 (a).

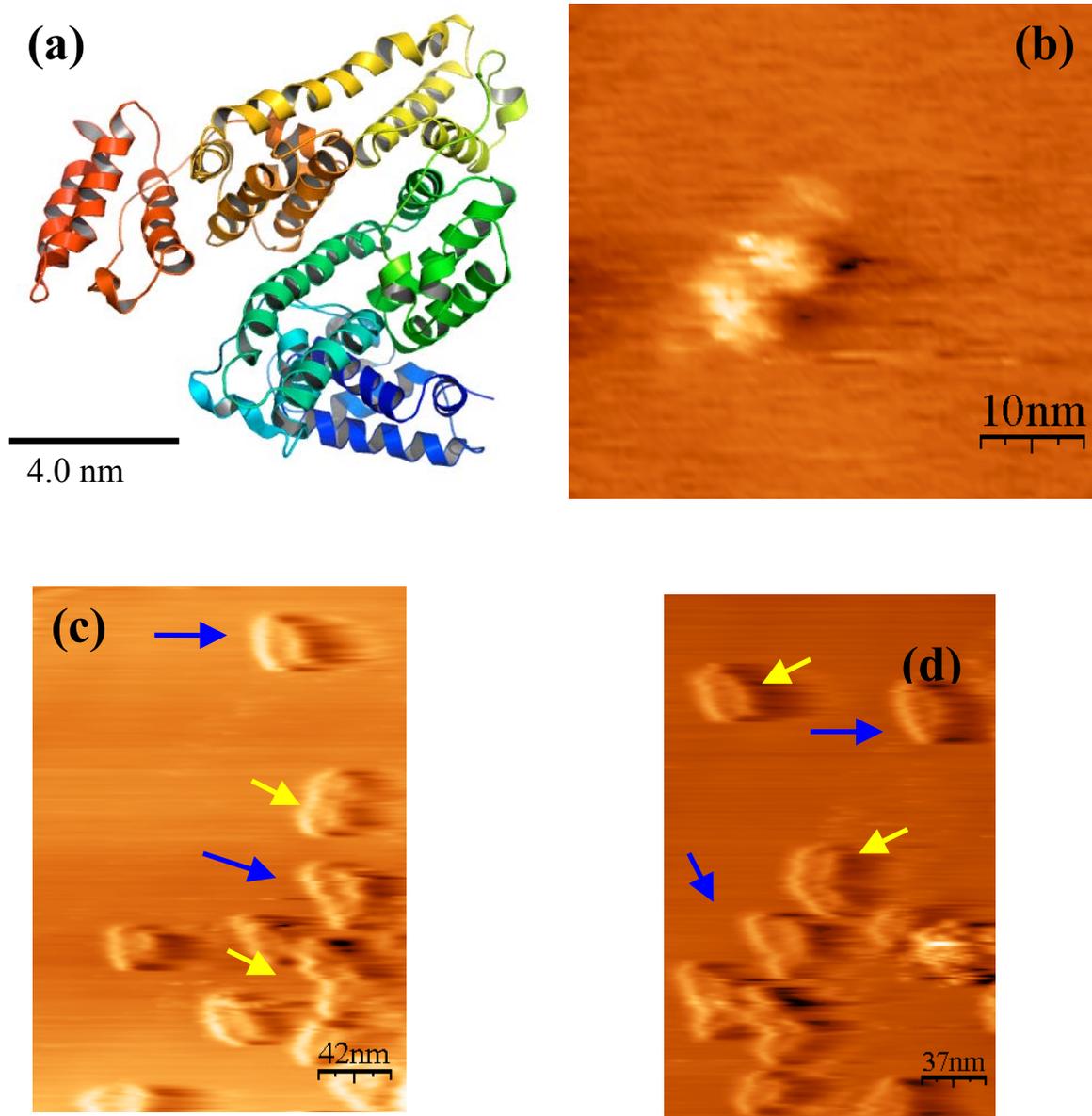


Figura 17. Representación de listones de HSA, pdb: 1UOR (a), e imágenes STM de HSA en su forma nativa (b) y desnaturalizada (c, d).

Los cambios estructurales de HSA en función deL pH han sido bien estudiados por un amplio numero de métodos, y se caracterizan por cambios en su estructura secundaria, así como terciaria (Dockal et al., 2000). Se conocen tres isómeros de la proteína, B, F, y E. El

isómero B se obtiene en rangos de pH de 8.0-10.0, mientras que en valores bajos 3.5 - 5, una transición del isómero B al F se observa resultando en una forma alongada de  $2.1 \times 5 \times 10.6$  o  $2.7 \times 6.3 \times 8.2$  nm de dimensiones. Mientras que en valores de pH inferiores a 3.5 el isómero E se observa y sus dimensiones son de  $2.1 \times 2.1 \times 25$  nm (Li et al., 2008). Una detallada inspección de las imágenes STM de las moléculas encontradas y por comparación con los isómeros conocidos para HSA, las moléculas con forma en “V” corresponden a la forma nativa, N, mientras las moléculas ovaladas corresponden al isómero F, y en el caso de las moléculas rectangulares al isómero E.

La albúmina es clasificada como una proteína suave con una baja estabilidad estructural y una alta tendencia a desnaturar y es bien conocido que cuando una proteína se absorbe en una superficie hidrofóbica la absorción puede inducir cambios conformacionales en la molécula (Déjardin, 2006). Raffaini y Ganazzoli, (2003) recientemente usaron subdominios de HSA para simular su interacción con grafito; los modelos consistieron de 1) solo de hélices hidrofílicas y 2) mezcla de hélices hidrofóbicas e hidrofílicas, interactuando con la superficie de grafito. Como se esperaba la mayor energía de interacción se encontró en el fragmento con hélices hidrofóbicas e hidrofílicas, además en ambos casos los modelos fueron desnaturados y formaron una monocapa en el plano del grafito, esa desnaturación es consistente con la observación en STM.

Nuestras imágenes muestran, que es posible encontrar en la superficie hidrofóbica de grafito la forma nativa, a sí como, los isómeros desnaturados de albúmina, F y E. Estos resultados son diferentes a los reportados en estudios biofísicos donde, en un dado pH, únicamente una población está presente (Dockal et al., 2000). Esto es debido a que el mecanismo llamado cambios conformacionales inducidos por superficie, es diferente de la desnaturación inducida en solución por temperatura, pH o agentes desnaturantes (Déjardin, 2006).

## 6.2 ADSORCIÓN EN SUPERFICIE DE NANOTUBOS

La Figura 18 (a) muestra imágenes STM de SWNTs de ~5 nm de diámetro y 18 (b) un pequeño grupo de SWNTs ~20 nm de diámetro. El diámetro observado en la Figura 18 (a) es mas grande que el típico diámetro de CNTs sintetizados por el método de descarga eléctrica (1–1.2 nm), sin embargo, eso se debe al efecto bien conocido de convolucion de la punta del STM. El grupo consiste de algunos SWNTs unidos por interacciones de van der Waals. Después de la adición de la muestra de HSA sobre los nanotubos, la adsorción de la proteínas fue evidente como muestra la Figura 19. La adsorción no específica (NSB) en SWNTs y MWNTs ha sido observada como un fenómeno general en la mayor parte de las proteínas que han sido estudiadas, e. j. estreptavidina, avidina, albúmina sérica bovina, papaina, pepsina y  $\alpha$ -glucosidasa (Chen et al., 2003). Como se menciona las características y naturaleza de la NSB aun no son bien conocidas. Actualmente es visto como un fenómeno complejo, y es necesario considerar varios tipos de interacciones, por ejemplo, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno interacciones pi, así como, las características de los nanotubos tales como defectos y diámetros, características que pueden desempeñar un papel en la NSB (Salvador-Morales, 2008).

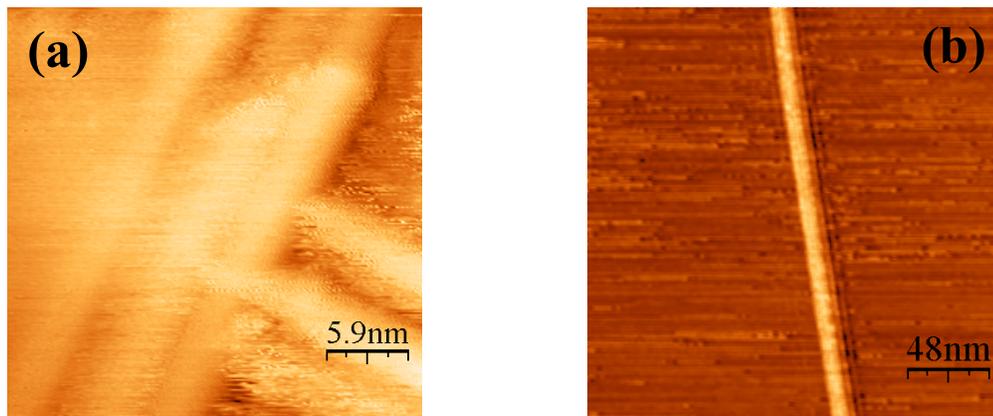


Figura 18. Imágenes representativas de nanotubos de capa simple (a) y un grupo de nanotubos (b).

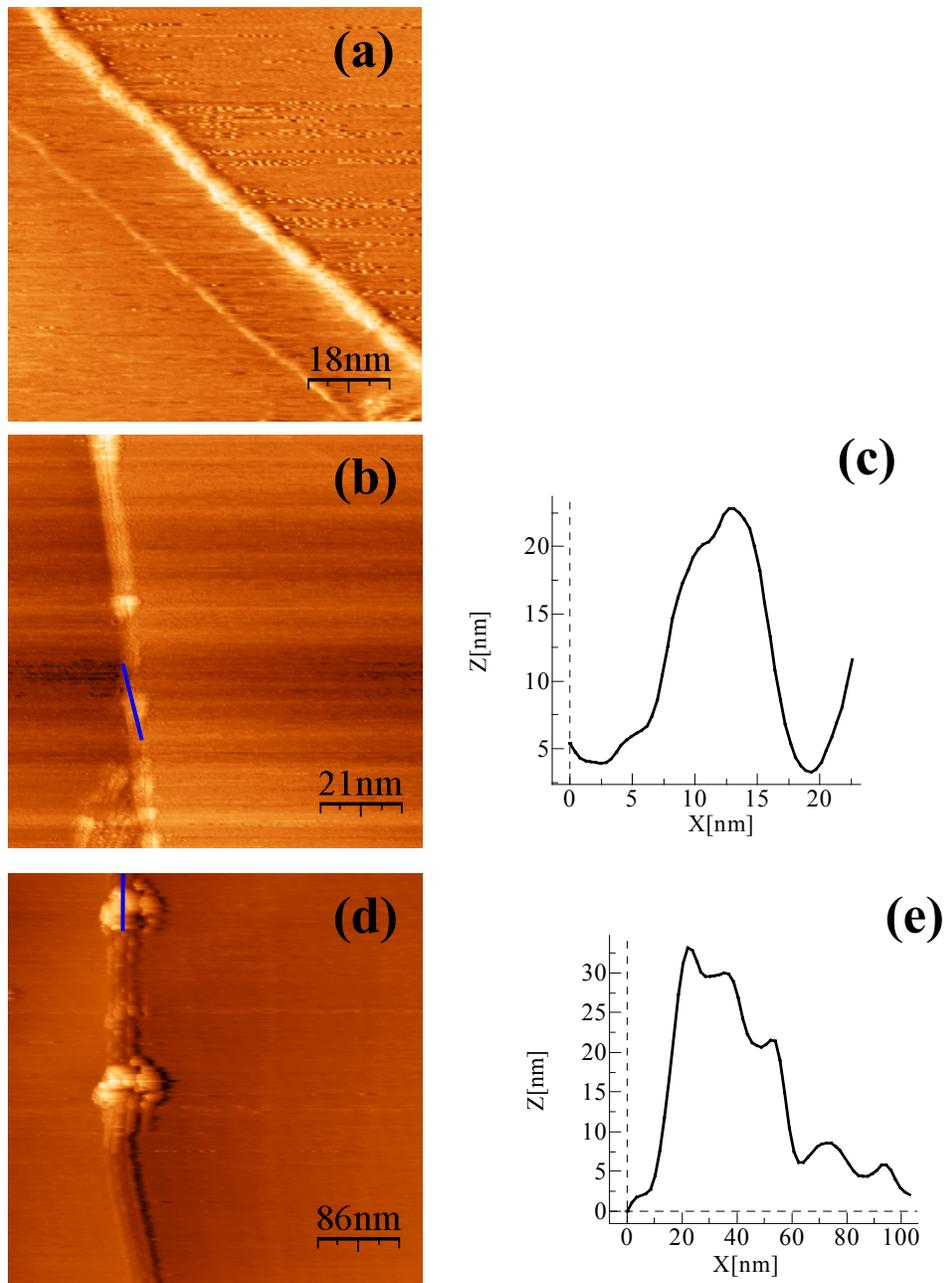


Figura 19. Imágenes de HSA adsorbida en SWNTs (puntos a lo largo del tubo), además se muestra su adsorción en un grupo de tubos.

Una imagen característica de la NSB de HSA en SWNTs se muestra en la Figura 19 (a). La albúmina decoró densamente el nanotubo y es evidente que no hay agregación transversal, y en la Figura 19 (b) algunas moléculas cubrieron parcialmente algunas zonas de un nanotubo. La albúmina es visible con una forma globular, esas moléculas encontradas en

los nanotubos son diferentes de la reportadas en HOPG (formas nativa y desnaturalizadas), sin embargo, las moléculas encontradas en los nanotubos tienen una forma similar a las descritas para albúmina sérica bovina unida covalentemente a SWNTs y MWNTs analizadas por microscopía de fuerza atómica (Jiang et al., 2004).

Todas las moléculas mostraron una forma globular pero con diferentes tamaños de 5 a 10 nm y alturas de 4 a 10 nm, vea flechas en Figura 19 (c). La presencia de este amplio rango de dimensiones sugiere que la HSA sufrió una desnaturalización sobre los SWNTs (Karajanagi et al., 2003). En un artículo reciente Shen et al., (2008) indica que un fragmento de 62 aminoácidos de HSA sufre una desnaturalización cuando es adsorbida sobre la superficie de SWNTs, lo cual es consistente con nuestros resultados en imágenes STM. Para corroborar la desnaturalización empleamos la microscopía de fuerza atómica para analizar las alturas de HSA ya que se sabe la altura en STM no es una característica estructural sino más bien de sus propiedades conductoras. Este análisis nos permitió corroborar que las alturas en STM eran correctas y si ocurre una desnaturalización de la proteína, vea Figura 20.

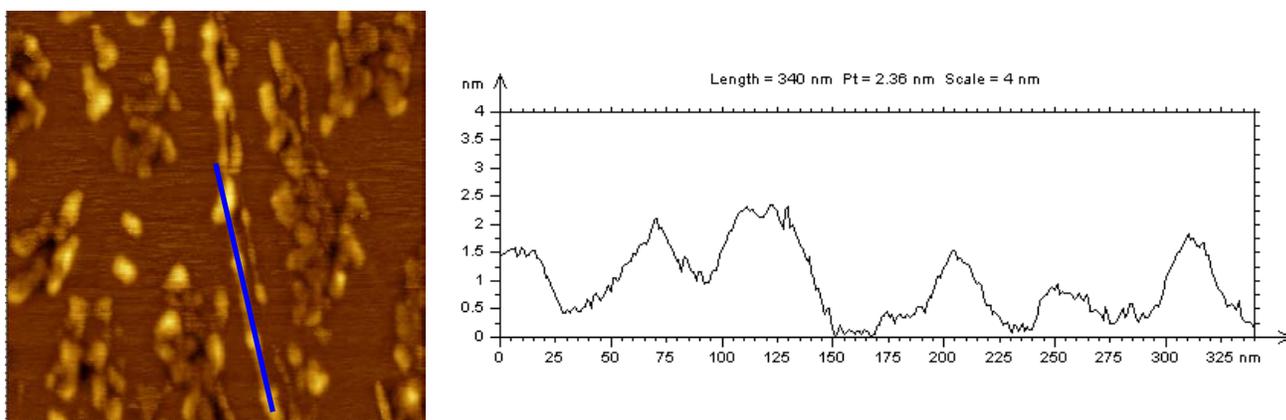


Figura 20. Imagen de fuerza atómica de HSA absorbida en SWNTs (puntos a lo largo del tubo), además se muestra el perfil de la zona indicada con la línea azul (la imagen es un barrido de  $500 \times 520$  nm).

Matsuura, K., et al., 2006, sugiere que en solución algunos dominios hidrofóbicos de proteínas parcialmente desplegadas de albúmina sérica bovina tienden a anclar en la superficie de SWNTs y además mencionan que la desnaturalización de la proteína ocurre por colocar la muestra en el ultrasonido y es promovido por un incremento de la temperatura, y después ocurre la unión en los nanotubos. En nuestro trabajo los SWNTs fueron primero dispersados y depositados en el sustrato, después se depositó la muestra de albúmina sin someter a ultrasonido, esto nos sugiere que simplemente la interacción de HSA con la superficie de SWNTs promueve la desnaturalización de la proteína. Esto corresponde con el modelo propuesto donde la desnaturalización de la proteína incrementa su hidrofobicidad y por tanto su afinidad a nanotubos, y que estos cambios conformacionales estabilizan la adsorción de la proteína en la superficie del nanotubo (Shen et al., 2008).

Las imágenes STM muestran que las proteínas son adsorbidas en nanotubos tanto individuales como en grupos. Si comparamos las imágenes de STM y AFM (19 y 20 respectivamente) podemos notar que en las de STM no se observan moléculas en la superficie del sustrato a diferencia de AFM donde hay gran cantidad de moléculas en el grafito. Esa observación nos sugiere que la albúmina tiene una fuerza de interacción mayor sobre la superficie de los nanotubos que en la superficie de HOPG, ya que si tomamos en cuenta las diferencias en la forma del barrido entre STM y AFM, las moléculas sobre el sustrato fueron removidas con mayor facilidad en el STM en comparación con AFM y permanecieron en los nanotubos en ambos casos. Roman et al., 2006, encontraron que la adsorción de glicina es más fuerte con los nanotubos comparada a la encontrada para el grafito, lo que concuerda con nuestras observaciones. Ese estudio de un aminoácido es difícil de extrapolar a una proteína debido a que son polímeros de aminoácidos (set de 20) con una estructura intrincada y compleja. Sin embargo, el estudio de aminoácidos y fragmentos de péptidos pueden servir como el primer paso para extender el sistema a proteínas.

La mayoría de los tubos observados con HSA fueron tubos individuales, sin embargo, también grupos pequeños mostraron moléculas de HSA. La Figura 19 (d) muestra un grupo de SWNTs cubierto con moléculas de albúmina vea flechas amarillas, además, también se observan dos aglomerados densos (vea flechas azules), esta clase de aglomerados no se observó en nanotubos individuales. Los aglomerados pudieron ser promovidos por defectos en los nanotubos, ya que se sabe que las técnicas de purificación de nanotubos de carbono, producen nanotubos abiertos y hoyos en las paredes de los tubos. Esos defectos tienen grupos carbonilo y carboxilo (Tasis, D., et al., 2006), los cuales pudieron promover la nucleación y agregación de albúmina en algunas regiones de los grupos funcionales de nanotubos.

## **7. CONCLUSIONES**

1. La microscopía de efecto túnel permite observar moléculas de albúmina sérica humana sobre superficies de grafito pirolítico altamente ordenado; además, permite observar los distintos cambios conformacionales que puede sufrir a consecuencia de su desnaturalización inducida por la superficie hidrofóbica.
2. La albúmina sérica humana se absorbe aleatoriamente en la superficie externa de nanotubos de capa simple.
3. La albúmina sufre una desnaturalización cuando es adsorbida en la superficie de nanotubos de capa simple.
4. La albúmina presenta una mayor fuerza de interacción con los nanotubos comparada con el grafito pirolítico.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Barone, P.W., Baik, S., Heller, D.A., Strano, M.S. (2005) Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes, *Nature Materials*, Vol. 4 (1), pp. 86-92 137.

Basiuk, E.V., Basiuk, V.A., Santiago, P., Puente-Lee, I. (2007) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with porphyrins: Meso-tetraphenylporphine and its transition metal complexes, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 7 (4-5), pp. 1530-1538.

Bekyarova, E., Yingchun N., Malarkey E. B., Montana V., McWilliams J. L., Haddon R. C., and Parpura V. (2005) Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Vol. 1, pp. 3–17,

Braden, B.C., Goldbaum, F.A., Chen, B.-X., Kirschner, A.N., Wilson, S.R., Erlanger, B.F. (2000) X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: Biomolecular recognition of C60, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 (22), pp. 12193-12197.

Chen, R.J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K.A., Wong Shi Kam, N., Shim, M., Li, Y., Kim, W., Dai, H. (2003) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 100 (9), pp. 4984-4989.

Cheung, C.L., Hafner, J.H., Lieber, C.M. (2000) Carbon nanotube atomic force microscopy tips: Direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 (8), pp. 3809-3813.

Davis, J.J., Green, M.L.H., Hill, H.A.O., Leung, Y.C., Sadler, P.J., Sloan, J., Xavier, A.V., Tsang, S.C. (1998) The immobilisation of proteins in carbon nanotubes, *Inorganica Chimica Acta*, Vol. 272 (1-2), pp. 261-266.

De Miranda Tomásio, S., Walsh, T.R. (2007) Atomistic modelling of the interaction between peptides and carbon nanotubes, *Molecular Physics*, Vol. 105 (2-3), pp. 221-229.

Déjardin P. (2006) *Proteins at Solid-Liquid Interfaces*, Springer, cap 6, pp.134.

Dieckmann, G.R., Dalton, A.B., Johnson, P.A., Razal, J., Chen, J., Giordano, G.M., Muñoz, E., Draper, R.K. (2003) Controlled assembly of carbon nanotubes by designed amphiphilic peptide helices, *Journal of the American Chemical Society*, Vol 125 (7), pp. 1770-1777.

El Kadi, N., Taulier, N., Le H., J.Y., Gindre, M., Urbach, W., Nwigwe, I., Kahn, P.C., Waks, M. (2006) Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: Ultrasound and structural studies, *Biophysical Journal*, Vol. 91 (9), pp. 3397-3404.

Erlanger, B.F., Chen, B.-X., Zhu, M., Brus, L. (2001) Binding of an Anti-Fullerene IgG Monoclonal Antibody to Single Wall Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, Vol. 1 (9), pp. 465-467.

Gao, H., Kong, Y., Cui, D., Ozkan, C.S. (2003) Spontaneous insertion of DNA oligonucleotides into carbon nanotubes, *Nano Letters*, Vol. 3 (4), pp. 471-473.

Giacalone, F., Martín, N. (2006) Fullerene polymers: Synthesis and properties, *Chemical Reviews*, Vol. 106 (12), pp. 5136-5190.

Harrison, B.S., Atala, A. (2007) Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials*, Vol. 28 (2), pp. 344-353.

Hersam, M.C. (2008) Progress towards monodisperse single-walled carbon nanotubes, *Nature Nanotechnology*, Vol. 3 (7), pp. 387-394.

Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baro, A.M. (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Review of Scientific Instruments*, Vol. 78 (1), art. no. 013705.

Jiang, K., Schadler, L.S., Siegel, R.W., Zhang, X., Zhang, H., Terrones, M. (2004) Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 14 (1), pp. 37-39.

Katz, E., Willner, I. (2004) Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics, *ChemPhysChem*, Vol. 5 (8), pp. 1084-1104.

Kiernan, G., Barron, V., Blond, D., Drury, A., Coleman, J., Murphy, R., Cadek, M., Blau, W. (2003) characterization of nanotube-based artificial muscle materials, *Proc. of SPIE: Optics and Photonics Tech Appl*, Vol. 4876, pp. 775-782.

Karajanagi, S.S., Vertegel, A.A., Kane, R.S., Dordick, J.S. (2004) Structure and function of enzymes adsorbed onto single-walled carbon nanotubes, *Langmuir*, Vol. 20 (26), pp. 11594-11599.

Kong, J., Dai, H. (2001) Full and modulated chemical gating of individual carbon nanotubes by organic amine compounds, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 105 (15), pp. 2890-2893.

Krishnakumar, S.S., Panda, D. (2002) Spatial relationship between the prodan site, Trp-214, and Cys-34 residues in human serum albumin and loss of structure through incremental unfolding, *Biochemistry*, Vol. 41 (23), pp. 7443-7452.

Lau, K.-T., Cheung, H.-Y., Lu, J., Yin, Y.-S., Hui, D., Li, H.-L. (2008) Carbon nanotubes for space and bio-engineering applications, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, Vol. 5 (1), pp. 23-35.

Lee, S.-H., Pumprueg, S., Moudgil, B., Sigmund, W. (2005) Inactivation of bacterial endospores by photocatalytic nanocomposites, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 40 (2), pp. 93-98.

Lin Chun, A., Moralez, J.G., Webster, T.J., Fenniri, H. (2005) Helical rosette nanotubes: A biomimetic coating for orthopedics?, *Biomaterials*, Vol. 26 (35), pp. 7304-7309.

Li, L., Hitchcock, A.P., Cornelius, R., Brash, J.L., Scholl, A., Doran, A. (2008) X-ray microscopy studies of protein adsorption on a phase segregated polystyrene/polymethylmethacrylate surface. 2. Effect of pH on site preference, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 112 (7), pp. 2150-2158.

Lin, Y., Taylor, S., Li, H., Fernando, K.A.S., Qu, L., Wang, W., Gu, L., Sun, Y.-P. 2004 Advances toward bioapplications of carbon nanotubes, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 14 (4), pp. 527-541.

Lin, Y., Huaping Li, Lingrong G., Pengju G. Luo, L. M. Veca, H. Wang, Y.-P. Sun, (2008) Bioapplications of carbon nanotubes, *Chemistry of Carbon Nanotubes*, American Scientific publisher, Vol. 2, Cap.11.

Liu, Z. X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, (2007) Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery, ACS Nano, Vol. 1 (1), pp. 50-56.

Losic, D., Martin, L.L., Aguilar, M.-I., Small, D.H. (2006)  $\beta$ -amyloid fibril formation is promoted by step edges of highly oriented pyrolytic graphite, Biopolymers-Peptide Science Section, Vol. 84 (5), pp. 519-526.

Matsuura, K., Saito, T., Okazaki, T., Ohshima, S., Yumura, M., Iijima, S. (2006) Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions, Chemical Physics Letters, Vol. 429 (4-6), pp. 497-502.

Nepal, D., Geckeler, K.E. (2006) PH-sensitive dispersion and debundling of single-walled carbon nanotubes: Lysozyme as a tool, Small, Vol. 2 (3), pp. 406-412.

Numata, M., Asai, M., Kaneko, K., Bae, A.-H., Hasegawa, T., Sakurai, K., Shinkai, S. (2005) Inclusion of cut and as-grown single-walled carbon nanotubes in the helical superstructure of schizophyllan and curdlan ( $\beta$ -1,3-glucans), Journal of the American Chemical Society, Vol. 127 (16), pp. 5875-5884.

Odom, T.W., Huang, J.-L., Lieber, C.M. (2002) STM studies of single-walled carbon nanotubes, Journal of Physics Condensed Matter, Vol. 14 (6), pp. R145-R167.

Roman, T., Diño, W.A., Nakanishi, H., Kasai, H. (2006) Glycine adsorption on single-walled carbon nanotubes, Thin Solid Films, Vol. 509 (1-2), pp. 218-222.

Raffaini, G., Ganazzoli, F. (2003) Simulation study of the interaction of some albumin subdomains with a flat graphite surface, Langmuir, Vol. 19 (8), pp. 3403-3412.

Raffaini, G., Ganazzoli, F. (2007) Understanding the performance of biomaterials through molecular modeling: Crossing the bridge between their intrinsic properties and the surface adsorption of proteins, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 7 (5), pp. 552-566.

Salvador-Morales C., Green, M. L.H., Sim, R. B., (2008) Interaction between carbon nanotubes and Biomolecules, *Chemistry of carbon nanotubes*, American Scientific Publisher, Vol, 3, Cap1, pp.1-23.

Shen, J.-W., Wu, T., Wang, Q., Kang, Y. (2008) Induced stepwise conformational change of human serum albumin on carbon nanotube surfaces, *Biomaterials*, Vol. 29 (28), pp. 3847-3855.

Shim, M., Kam, N.W.S., Chen, R.J., Li, Y., Dai, H. (2002) Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition, *Nano Letters*, Vol. 2 (4), pp. 285-288.

Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Engineering*, Vol. 12 (6), pp. 439-446.

Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., Prato, M. (2006) Chemistry of carbon nanotubes, *Chemical Reviews*, Vol. 106 (3), pp. 1105-1136.

Tsang, S.C., Davis, J.J., Green, M.L.H., Hill, H.A.O., Leung, Y.C., Sadler, P.J. (1995) Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: High-resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, Vol. (17), pp. 1803-1804.

Wang, S., Humphreys, E.S., Chung, S.-Y., Delduco, D.F., Lustig, S.R., Wang, H., Parker, K.N., Jagota, A. (2003) Peptides with selective affinity for carbon nanotubes, *Nature Materials*, Vol. 2 (3), pp. 196-200.

Wang, H., Gu, L., Lin, Y., Lu, F., Meziani, M.J., Luo, P.G., Wang, W., Sun, Y.-P. (2006) Unique aggregation of anthrax (*Bacillus anthracis*) spores by sugar-coated single-walled carbon nanotubes, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 128 (41), pp. 13364-13365.

Xu, S., Dong, M., Rauls, E., Otero, R., Linderoth, T.R., Besenbacher, F. (2006) Coadsorption of guanine and cytosine on graphite: Ordered structure based on GC pairing, *Nano Letters*, Vol. 6 (7), pp. 1434-1438.

Yarotski, D. A. Svetlana V. Kilina, A. Alec Talin, Sergei Tretiak, Oleg V. Prezhdo, Alexander V. Balatsky, Antoinette J. (2009) Taylor Scanning Tunneling Microscopy of DNA-Wrapped Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, Vol. 9 (1), 12-17.

Zheng, M., Jagota, A., Semke, E.D., Diner, B.A., McLean, R.S., Lustig, S.R., Richardson, R.E., Tassi, N.G. (2003) DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes, *Nature Materials*, Vol. 2 (5), pp. 338-342.

Zunzain, P.A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., Curry, S. (2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid, *BMC Structural Biology*, Vol 3, art. no. 1, pp. 1-9.

## CONCLUSIONES

### Capítulo 1: **Microscopía de barrido de efecto túnel del autoensamble de la proteína viral VP6 en nanotubos y nanoesferas**

- 1- La microscopía de efecto túnel permite observar tubos y esferas, de la proteína viral VP6, de grandes dimensiones ( $> 40$  nm). Esto resulta de gran importancia ya que es la primera vez que se observan biomoléculas de esas dimensiones con ayuda del STM.
- 2- Las condiciones óptimas para observar los ensambles de VP6 a través de la microscopía STM variaron sin embargo el rango óptimo de voltaje y corriente fueron:  $V_s = 0.2 - 1.5$  V y  $I_t = 1.0 - 1.34$  nA.
- 3- El STM permite observar las unidades estructurales de los tubos y esferas, es decir el trímero de VP6, de igual forma permite observar algunas de sus características estructurales, las cuales corresponden con los datos de cristalografía de rayos X que se tienen.
- 4- La microscopía de efecto túnel permite observar a nivel molecular la estructura de tubos y esferas de proteína viral VP6 a nivel molecular, la cual concuerda con algunas características que se han obtenido por microscopía electrónica y Crioelectrónica.

### Capítulo 2: **Estudio STM de la adsorción de albúmina sérica humana en la superficie de nanotubos de capa simple**

1. La microscopía de efecto túnel permite observar moléculas de albúmina sérica humana sobre superficies de grafito pirolítico altamente ordenado; además, permite observar los distintos cambios conformacionales que puede sufrir a consecuencia de su desnaturalización inducida por la superficie hidrofóbica.
2. La albúmina sérica humana se adsorbe aleatoriamente en la superficie externa de nanotubos de capa simple.

3. La albúmina sufre una desnaturalización cuando es adsorbida en la superficie de nanotubos de capa simple.
4. La albúmina presenta una mayor fuerza de interacción con los nanotubos comparada con el grafito pirolítico.

## **APENDICE**

### **MICROSCOPIA DE BARRIDO DE EFECTO TUNEL (STM)**

La búsqueda de mejores técnicas para la caracterización de superficies inspiró la invención del microscopio de barrido de efecto túnel (STM). Desarrollado en los años 80 y alcanzando su madurez 10 años después, el STM es el producto del trabajo del Dr. Gerald Binning y Heinrich Rohrer. El STM puede alcanzar una resolución lateral y vertical de 0.1 nm y 0.01 nm, respectivamente. Esto hace posible detectar el arreglo de átomos de la superficie de algunos materiales. Permite estudiar las propiedades físicas y químicas relacionadas con el comportamiento de los electrones de la superficie. De igual forma, el STM hace posible apreciar una nueva realidad en la que las moléculas pueden ser individualmente dirigidas, ordenadas y ensambladas una a una. Finalmente, permite estudiar todo tipo de propiedades a escala nano. Una de sus principales características que lo distinguen de las demás técnicas convencionales de microscopía (con excepción del microscopio de fuerza atómica, AFM) es que el STM puede desempeñarse en diferentes ambientes. Es decir, puede trabajar en alto y ultra alto vacío, aire; a bajas o altas temperaturas o en condiciones ambientales de temperatura y presión. De igual forma, se tiene reportado que puede trabajar en medios acuosos (Otero et al., 2006). El principio del funcionamiento del STM es complicado, y se basa en el fenómeno físico del “efecto túnel”.

### **EFECTO TUNEL**

Este fenómeno físico relaciona la capacidad que tienen las partículas subatómicas como los electrones, para pasar, en ciertas circunstancias, a través de barreras de energía aparentemente impenetrables (vea Figura 21). Imaginemos que estamos en un juego de tenis. Supongamos que colocamos una red muy resistente entre los jugadores. En esta

cancha podemos llevar la pelota de un lado a otro sin mucho esfuerzo y si intentamos ponerla encima de la red necesariamente caerá de un lado u otro de la cancha. A sí, el efecto túnel es como sí un jugador, con la fuerza normal con la que ejecuta su disparo, pudiera hacer que la bola atravesara la red. Aun en contra de nuestro sentido común, una naturaleza intrínseca del mundo de las partículas subatómicas. Si la barrera de energía (red) es lo suficientemente fuerte, un electrón (bola) disparado a ella se limitará a rebotar. Sin embargo, a diferencia de una pelota de tenis, un electrón parece reaccionar a cuantas limitaciones que supone el obstáculo al cual se acerca y sobre todo, lo supera. Este efecto tiene consecuencias mensurables en el plano de la vida diaria. Por ejemplo puede ser utilizado para amplificar ciertas señales electrónicas, es causante también de la radioactividad nuclear (el núcleo actúa como barrera que aprisiona a las partículas en su interior pero que estas logran escapar mediante el efecto túnel).

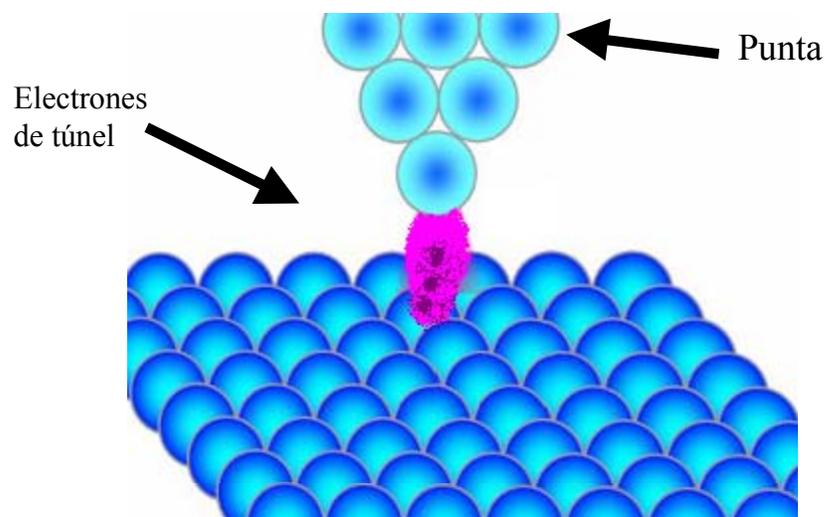


Figura 21. Cuando la punta de nuestro microscopio es conductora de electrones, como un cable de cobre, y la muestra también, electrones de la muestra o de la punta pueden atravesar una barrera de energía y salen de los átomos, generando una corriente (imagen modificada de [http://domino.watson.ibm.com/comm/pr.nsf/pages/rsed.spinflip-pica.html/\\$FILE/samm\\_22.jpg](http://domino.watson.ibm.com/comm/pr.nsf/pages/rsed.spinflip-pica.html/$FILE/samm_22.jpg)).

La fusión nuclear que se produce en los núcleos de los átomos de hidrógeno generando la energía en el interior del sol también es explicada a través del efecto túnel. Este fenómeno responde a una ecuación exponencial. Esto quiere decir que pequeños cambios en uno de

sus parámetros generará un cambio en la respuesta que es altamente detectable. Así, la corriente que se genera a partir de la interacción de estas dos partes (punta-muestra), y que es denominada efecto túnel, tiene dos variables a medir: la modificación de la distancia de interacción, y el flujo de corriente. Resulta que la corriente de electrones se modifica enormemente al haber cambios muy pequeños en la distancia punta-muestra. Debido a que la corriente en este túnel es una función exponencial de la distancia de separación, entonces un cambio en el 10% de la distancia (si la separación es de 10 Å el 10% es 1 Å) generará un cambio de un orden de magnitud (Heredia, 2006).

## **PRINCIPIO DE OPERACIÓN DE STM**

El funcionamiento del STM es algo complicado, para entenderlo, de manera mas sencilla, puede colocar diferentes objetos sobre una superficie, el dedo índice de forma vertical con respecto a la superficie manteniendo una distancia (dedo-superficie) de 1 a 2 cm. Desplacemos el dedo horizontalmente en dirección de los objetos; al encontrarlos intentemos evadirlos tratando de mantener la distancia (1 a 2 cm) con respecto a la superficie de los objetos. A sí, en el STM, la punta al igual que el dedo, tiene que modular la distancia (punta-superficie) con respecto a las variaciones que encuentra al desplazarse sobre la superficie de la muestra tratando siempre de conservar la misma distancia (10–0.2 Å) punta-muestra (Figura 22).

El STM se basa en el control de la corriente de túnel,  $I_T$ , que atraviesa la barrera de energía entre la superficie de la muestra y la punta (Figura 22). Cuando se realiza un barrido a través de una barrera de túnel plana y de altura constante, una masa de electrones libres podrá fluir a través de la muestra generando una corriente de túnel constante. Sin embargo si hay un cambio en la altura de la barrera, como un pequeño escalón de 2 a 5 Å de altura, la corriente de túnel variará, generando un cambio de hasta tres ordenes de magnitud. El cambio en este parámetro es registrado y un sistema de realimentación es usado para reajustar la posición,  $z$ , para mantener una función de trabajo constante (voltaje), que en

consecuencia mantendrá la corriente del túnel y la distancia (punta-muestra) constante (Binning et al., 1982).

Las piezas conductoras  $P_x$  y  $P_y$  desplazan la punta a través de la superficie del material. La unidad de control CU aplica el voltaje apropiado  $V_p$  a la pieza conductora  $P_z$  para mantener una corriente de túnel  $J_T$  y un voltaje de túnel  $V_T$  constante. Los voltajes aplicados a las piezas conductoras  $P_x$ ,  $P_y$ , y  $P_z$  son traducidos para producir la topografía de la superficie del material (Binning et al., 1982).

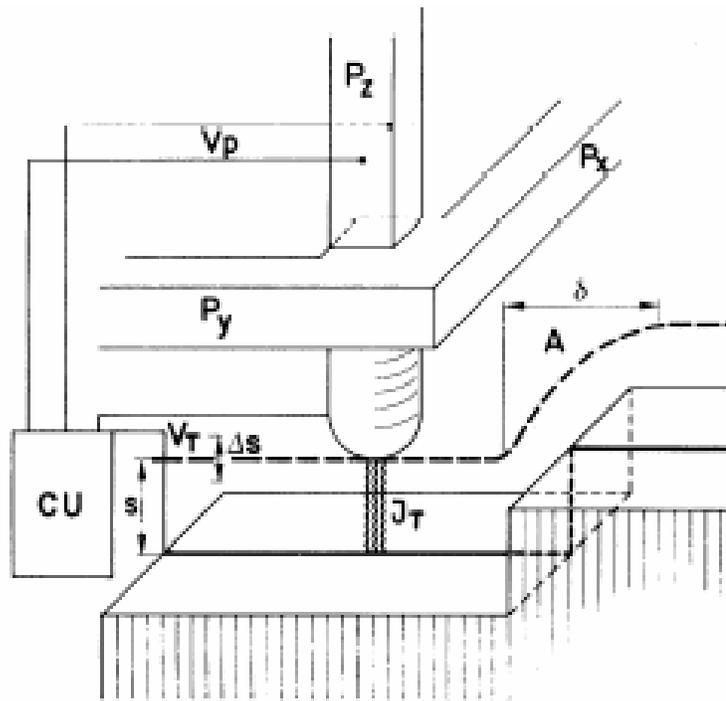


Figura 22. Esquema del principio de operación del microscopio de efecto de túnel. Las líneas punteadas indican el desplazamiento de la punta en dirección de A donde hay una variación de altura de la barrera (a través de un escalón). Imagen tomada de Binning et al., 1982.

## PIEZOELECTRICIDAD

El descubrimiento por los hermanos Paul Jacques y Pierre Curie de la piezoelectricidad se dio alrededor de año 1880. Gracias a este fenómeno, se pueden hacer circuitos digitales. Ellos descubrieron que algunos cristales, (e.j. cuarzo) generan una carga eléctrica cuando se les aplica una presión. Inversamente, se obtienen variaciones mecánicas al aplicar oscilaciones eléctricas a estos cristales. El efecto piezoeléctrico permaneció como una curiosidad de laboratorio por más de tres décadas. Una de las aplicaciones masivas de estos materiales fue en la construcción de sonares para detectar submarinos durante la primera guerra mundial por el año de 1917 por P. Langevin en Francia. Estos sólidos deben sus propiedades a que cuando se les aplica una fuerza, los electrones de los átomos modifican sus nubes electrónicas haciendo que generen un potencial en el sólido. Al contrario, si se le aplica un potencial al sólido, modifican su estructura generando cambios en la geometría de la muestra (Heredia-Barbero, 2006).

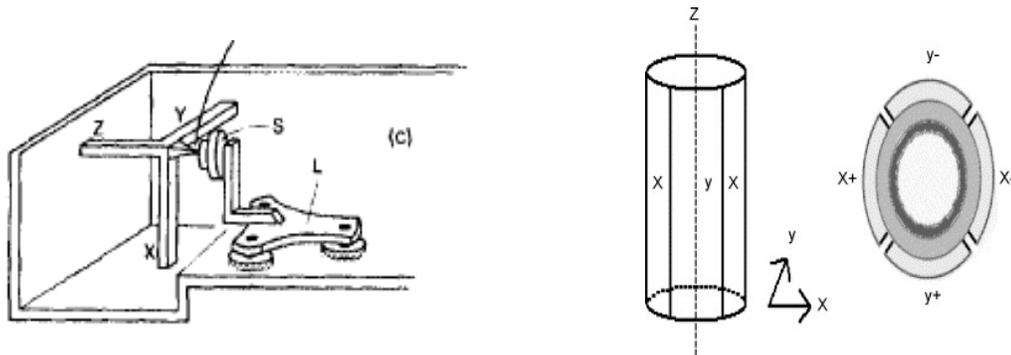


Figura 23. Esquema del primer escáner empleado por el primer STM (izquierda), que rápidamente fue sustituido por un simple tubo (tomado de Bhikkaji et al., 2007).

La alta resolución del STM se debe en gran medida a los materiales piezoeléctricos (Figura 23). Este tipo de materiales se ocupan para desplazar la punta a través de la superficie de la muestra (x, y) y para controlar la separación punta-muestra (z). El STM original, inventado por Binnig y Rohrer, contaba con tres barras piezoeléctricas ortogonales fijadas a un soporte. El movimiento independiente de las tres barras lo realizaban en las tres direcciones

(x, y, z). Sin embargo, rápidamente fue sustituido por un simple tubo que en la actualidad es el sistema más empleado por diversas ventajas (Bhikkaji et al., 2007). Los piezoeléctricos por lo general son de titanato de zirconio  $[\text{Pb}(\text{Ti,Zr})\text{O}_3]$  o de titanato de bario, y se manufacturan de distintas formas como en cintas, placas y tubos.

## **MODOS DE OPERACIÓN**

La microscopía de barrido de efecto túnel puede operar en distintas modalidades:

a) Corriente constante.- Cuando la punta y la superficie están lo bastante cerca, genera un espacio tan estrecho ( $10\text{--}0.2 \text{ \AA}$ ) que al aplicar un voltaje apropiado ( $2\text{--}2000\text{mV}$ ) la corriente de túnel JT (de igual forma en el texto se emplea el símbolo  $I$ ) puede fluir y ser monitoreada (Figura 24). La punta se desplaza a través de la superficie realizando el barrido, y la corriente JT es sensible a los cambios de la barrera. Un sistema de realimentación ajusta la altura del piezo Pz para tratar de mantener una corriente constante, la cual varía exponencialmente con respecto al espacio  $s$  entre la punta y la superficie, permitiendo mantener constante la distancia. La imagen consiste en un mapa de  $z$  (x-y), la altura de  $z$  se grafica contra la posición lateral de  $x$ , y la imagen se construye por los múltiples desplazamientos en  $y$ , dirección.

b) Altura constante.- En este modo de operación se mantiene la altura y el voltaje constantes. La corriente de túnel es monitoreada (Figura 24). En este caso, la red de realimentación responde lo bastante rápido para mantener la corriente constante, y las variaciones en la corriente debido al paso de la punta sobre las características de la superficie como los átomos, son graficadas contra la posición del barrido. La imagen consiste en un mapa de JT (x-y), las variaciones de JT se grafican contra  $x$ , y los múltiples desplazamientos laterales en  $y$ .

En el modo de altura constante es también posible mantener la altura y la corriente constantes, donde el voltaje es monitoreado. En este caso la realimentación ocurre para mantener un voltaje constante. Las rápidas variaciones en el voltaje son debido al paso de la punta sobre las características de la superficie como átomos, y lo que se grafica es el voltaje contra la posición en  $x$ ,  $y$ . Ambos modos de operación poseen sus ventajas. Históricamente el modo de corriente constante fue el primero en desarrollarse, y se usa en superficies que no son atómicamente planas, generalmente en topografías entre 1.0 nm. El modo de altura constante es más apropiado para superficies planas ya que únicamente la corriente o voltaje responden a las características de la superficie y no el piezo  $z$ , haciendo que su velocidad de barrido sea mucho mas rápida. La desventaja en altura constante es que requiere la calibración de la altura del piezo  $z$ . La velocidad de barrido es importante ya que podría permitir el estudio de procesos dinámicos en superficies, reducir el tiempo de recolección de datos, y la distorsión en las imágenes causada por la interacción (arrastré o colisión) de la punta con la muestra, suprimiendo o reduciendo la histéresis y variaciones termale (Hansman y Tersoff, 1987).

## **IMÁGENES**

La imagen representa la estructura electrónica de la superficie, que generalmente esta relacionada con la topografía de la superficie (Pong y Durkan, 2005). Las imágenes consisten en un mapa que resulta de graficar la altura  $z$ , o la corriente  $IT$ , o el voltaje  $V$ , contra los múltiples desplazamientos en  $x$ ,  $y$ . Idealmente, el STM sólo revela la estructura de las superficies en tanto que el interior permanece invisible. Las imágenes se presentan en una escala de color que sirve como referencia para describir las características de la topografía de la superficie. Los colores claros representan las zonas más altas o las regiones de mayor conductividad, y entre más oscuro la zona es baja o menos conductora. El STM muestra en tercera dimensión la estructura de las superficies con una gran resolución. El entendimiento y formación de las imágenes es una de las áreas de mayor actividad para la física teórica, debido a que el STM en algunos casos no muestra el arreglo atómico de las

superficies. Un típico ejemplo, es el grafito donde el STM solo muestra los átomos de carbono  $\beta$ , en tanto que los  $\alpha$  permanecen ocultos (Pong y Durkan, 2005).



Figura 24. La microscopía de efecto túnel puede operar en el modo de corriente constante (superior) o altura constante (inferior). Imagen tomada de Bai, 2000.

## PUNTAS

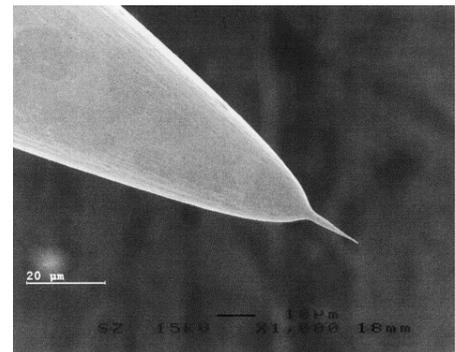
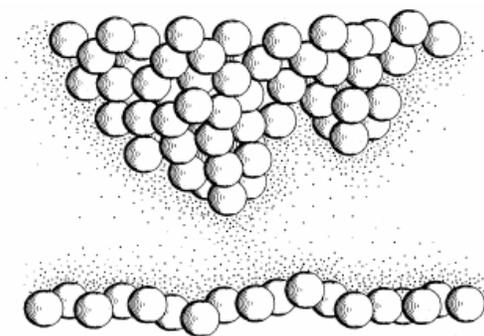
Las propiedades de la punta son de gran importancia en el STM (Figura 25). Una punta atómicamente aguda (un átomo, idealmente) y estable es necesaria para la resolución atómica. Los diámetros de las puntas oscilan entre los 10 nm. Se han realizado estudios teóricos de la estructura electrónica ideal para las puntas con lo que se pretende obtener imágenes que reflejen óptimamente la información de la muestra. Las puntas se fabrican de distintos materiales como tungsteno (W), oro (Au), platino (Pt), o aleaciones como platino / iridio (Pt/Ir). Generalmente son preparadas por métodos electrolíticos (electroquímico) pulido / etching y cortadoras mecánicas entre otros. El desarrollo de técnicas para la producción de puntas con geometrías adecuadas y reproducibles es importante ya que ningún método es aplicable para todos los materiales de interés (Melmed, 1991). La forma de la punta puede contribuir a la distorsión de las imágenes (Park et al., 1987). El caso más usual es la formación de minipuntas que ocurre frecuentemente como resultado de los métodos de preparación. Si diferentes átomos o pequeños grupos de átomos actúan independientemente durante el barrido, la imagen resultante será una superposición de imágenes que reflejará diferencias con respecto a la muestra (imágenes de diferentes periodos en el grafito) (Colton et al., 1988). Así, la forma y arreglo de las minipuntas son factores que pueden afectar la estabilidad de la imagen, Durante el barrido de la muestra la estructura electrónica de la punta es modificada lo que repercute en la imagen. La identidad química de los átomos de la punta es también importante. En estudios con varios tipos de átomos (Na y Ca) mostraron que el grafito es sensible a estos átomos. El entendimiento de

las anomalías así como su origen, ayudará para descartar propiedades que no son de la muestra.

Figura 25. Esquema de una punta de STM (Izquierda), su terminación en simples átomos es necesaria para obtener resolución atómica. (Derecha) Imagen SEM de punta preparada por método electroquímico. Imágenes tomadas de Szkutnik et al., 2000.

## APLICACIONES

La invención del STM resultó ser un evento crucial en la historia de la nanociencia y nanotecnología. Originalmente se diseñó sólo para obtener imágenes de la superficie de distintos materiales, pero debido a su eficiencia se empleó rápidamente para la representación de superficies a escala atómica (Pizzagalli y Baratoff, 2003). Se han obtenido imágenes extraordinarias y en ocasiones hasta dramáticas del arreglo atómico de un gran número de superficies metálicas y semiconductores. Sin duda la más espectacular en la historia de la ciencia de superficies fue la visualización de la estructura geométrica de la reconstrucción ( $7 \times 7$ ) de la superficie del Si (111). La compleja reconstrucción ayudó en la controversia acerca de la estructura del Si (Rosei y Rosei, 2002). El STM juega un rol esencial en el estudio del arreglo atómico y estructura electrónica de los nanotubos de



carbono ya que simultáneamente se pueden monitorear su quiralidad y propiedades electrónicas (Ago, et al., 2004). En 1990 Eigler y Schweizer lograron escribir con el STM el logotipo de IBM con 35 átomos de xenón en una superficie de níquel. Poco después, en el 2000, Manoharan, Lutz y Eigler hicieron un corral cuántico con átomos de hierro en una

superficie de cobre. A sí, se ha mostrado el enorme potencial del STM para manipular átomos individuales (Gerber y Lang, 2006).

Finalmente, el STM puede ser usado para caracterizar y manipular moléculas orgánicas en superficies sólidas y de simples cristales bajo condiciones bien controladas de ultra alto vacío. En este tipo de estudios el STM presenta ventajas sobre otras técnicas convencionales de microscopía y espectroscopia. La manipulación ha revelado nuevas oportunidades para fabricar nanoestructuras arreglando átomos o moléculas una por una, como bloques de construcción (Otero, et al., 2006). De igual forma el STM ha incursionado en muchas disciplinas que van desde física, química, computación cuántica y en las ciencias de la vida como en biología (Gerber y Lang, 2006).

## **BIBLIOGRAFÍA**

Ago, H., Azumi, R., Ohshima, S., Zhang, Y., Kataura, H., Yumura, M. (2004) STM study of molecular adsorption on single-wall carbon nanotube surface, *Chemical Physics Letters*, Vol. 383 (5-6), pp. 469-474.

Bai, C. (2000) *Scanning Tunneling Microscopy and Its Application*. Springer, 2<sup>da</sup> ed. New Cork. pp. 36.

Bhikkaji, B., Ratnam, M., Moheimani, S.O.R. (2007) PVPF control of piezoelectric tube scanners, *Sensors and Actuators, A: Physical*, Vol. 135 (2), pp. 700-712.

Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, Ch., Weibel, E. (1982) Surface studies by scanning tunneling microscopy, *Physical Review Letters*, Vol. 49 (1), pp. 57-61.

Colton R. J., S. M. Baker, R. J. Driscoll, M. G. Youngquist, J. D. Baldeschwieler, and W. J. Kaiser (1988) Imaging graphite in air by scanning tunneling microscopy: Role of the tip, *Journal of Vacuum Science & Technology A*, Vol. 6 (2), pp. 349-353.

Gerber C. y Lang H. P. (2006) How the doors to the nanoworld were opened, *Nature Nanotechnology*, Vol. 1., pp. 3 – 5.

Hansma, P.K., Tersoff, J. (1987) Scanning tunneling microscopy, *Journal of Applied Physics*, Vol. 61 (2), pp. R1-R24.

Heredia B. A. Analisis de materiales de origen biologico en estado cristalino y amorfo: relación estructura-propiedades. Tesis de doctorado. Mexico. 2006, Apéndice.

Melmed A. J. (1991) The art and science and other aspects of making sharp tips, *Journal of Vacuum Science & Technology B*, Vol. 9 (2), pp. 601-608.

Otero R., Rosei, F. y Besenbacher, F. (2006) scanning tunneling microscopy manipulation of complex organic molecules on solid surfaces, *Annual Review of Physical Chemistry*. Vol. 57, pp. 497-525.

Park, S.-I., Nogami, J., Quate, C.F. (1987) Effect of tip morphology on images obtained by scanning tunneling microscopy, *Physical Review B*, Vol. 36 (5), pp. 2863-2866.

Pong, W.-T., y Durkan, C. (2005) A review and outlook for an anomaly of scanning tunnelling microscopy (STM): Superlattices on graphite, *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol. 38 (21), pp. R329-R355.

Pizzagalli, L., y Baratoff, A. (2003) Theory of single atom manipulation with a scanning probe tip: Force signatures, constant-height, and constant-force scans, *Physical Review B* , Vol. 68 (11), No. 115427, pp. 1154271-11542712.

Rosei, F., Rosei, R. (2002) Atomic description of elementary surface processes: Diffusion and dynamics, *Surface Science*, Vol. 500 (1-3), pp. 395-413.

Szkutnik, P.D., Piednoir, A., Ronda, A., Marchi, F., Tonneau, D., Dallaporta, H., Hanbucken, M. (2000) STM studies: Spatial resolution limits to fit observations in nanotechnology, *Applied Surface Science*, Vol. 164 (1-4), pp. 169-174.

## Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
Å	ångstrom
C	carbono
I	corriente
HOPG*	grafito pirolítico altamente ordenado
STM*	microscopio de barrido de efecto túnel
AFM*	microscopio de fuerza atómica
A	amperio
nm	nanómetro
Au	oro
pH	potencial de hidrógeno
Pt /Ir	aleación platino / iridio
V	voltaje, voltio
W	tungsteno

\*Por sus siglas en inglés

## **BIBLIOGRAFÍA**

### **Capítulo I: Microscopía de barrido de efecto túnel del autoensamble de la proteína viral VP6 en nanotubos y nanoesferas**

Ago, H., Azumi, R., Ohshima, S., Zhang, Y., Kataura, H., Yumura, M (2004) STM study of molecular adsorption on single-wall carbon nanotube surface, *Chemical Physics Letters*, Vol. 383, No. 5-6, pp. 470.

Aldaye, F.A., Palmer, A.L., Sleiman, H.F. (2008) Assembling materials with DNA as the guide, *Science*, Vol. 321 (5897), pp. 1795-1799.

Alliata, D., Andolfi, L., Cannistraro, S. (2004) Tip to substrate distances in STM imaging of biomolecules, *Ultramicroscopy*, Vol. 101, No. 2-4, pp. 231-240.

Behrens, S.S. (2008) Synthesis of inorganic nanomaterials mediated by protein assemblies, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 18 (32), pp. 3788-3798.

Bittner, A. M. (2005) Biomolecular rods and tubes in nanotechnology, *Naturwissenschaften*, Vol. 92 (2), pp. 51-64.

Chenxiang L., Yonggang K., Zhe L., James H. W., Yan L., Hao Y. (2009) Mirror Image DNA Nanostructures for Chiral Supramolecular Assemblies, *Nano Letters*, Vol. 9 (1), pp. 433-436.

Charles R. M. y Punit K. (2003) The emerging field of nanotube biotechnology, *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 2, pp. 29-37.

Cheng-Yu L., Chris M. W., Valerie A. K., Leonard H. R., Glen R. N. (2009) Vault Nanoparticles Containing an Adenovirus-Derived Membrane Lytic Protein Facilitate Toxin and Gene Transfer, *ACS Nano*, Vol. 3 (3), pp. 691-699.

Campbell, S. A., Smith, J. R., Jungblut, H., Lewerenz, H. J. (2007) Protein imaging on a semiconducting substrate: A scanning tunnelling microscopy investigation, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, Vol. 599 (2), pp. 313-322.

Carrasco, C., Castellanos, M., De Pablo, P.J., Mateu, M.G. (2008) Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 105 (11), pp. 4150-4155.

Douglas, T., Young, M. (2006) Viruses: Making friends with old foes, *Science*, Vol. 312 (5775), pp. 873-875.

Evans, D.J. (2008) The bionanoscience of plant viruses: Templates and synthons for new materials, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 18 (32), pp. 3746-3754.

Estes, M. K., Crawford, S. E., Penaranda, M. E. (1987) Síntesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expresión system, *Journal of Virology*, Vol. 61, No 5, pp.1488-1494.

Estes, M.K., Kang, G., Zeng, C.Q.-Y., Crawford, S.E., Ciarlet, M. (2001) Pathogenesis of rotavirus gastroenteritis, *Novartis Foundation Symposium* 238, pp. 82-100.

Frederix, P.L.T.M., Bosshart, P. D., Engel, A. (2009) Atomic force microscopy of biological membranes, *Biophysical Journal*, Vol. 96 (2), pp. 329-338.

Fung, S. Y.; Hong, Y.; Dhadwar, S. S.; Zhao, X.; Chen, P. in *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*; Nalwa, H. S., Ed.; American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA USA, 2004.

Fotiadis, D., Jastrzebska, B., Philippsen, A., Muller, D.J., Palczewski, K., Engel, A. (2006) Structure of the rhodopsin dimer: a working model for G-protein-coupled receptors, *Current Opinion in Structural Biology*, Vol. 16 (2), pp. 252-259.

Gaczynska, M., Osmulski, P.A. (2008) AFM of biological complexes: What can we learn?, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Vol. 13 (5), pp. 351-367.

Gaczynska, M., Osmulski, P.A. (2009) Atomic Force Microscopy as a Tool to Study the Proteasome Assemblies. *Methods in Cell Biology*, Chapter 3, Vol. 90, pp. 39-60.

Greig, S.L., Berriman, J.A., O'Brien, J.A., Taylor, J.A., Bellamy, A.R., Yeager, M.J., Mitra, A.K. (2006) Structural determinants of rotavirus subgroup specificity mapped by cryo-electron microscopy, *Journal of Molecular Biology*, Vol. 356, No. 1, pp. 209.

Hermis I., Henrich F., Sirkku H., Nikos F., Janne R., Olli I., Dieter R., Jimmy M., y Nikos H. (2007) architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides. Formation of gene vehicles, *Biomacromolecules*, Vol. 8 (7), pp. 2173-2181.

Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baro, A.M. (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Review of Scientific Instruments*, 78 (1), art. no. 013705.

Iatrou, H., Frielinghaus, H., Hanski, S., Ferderigos, N., Ruokolainen, J., Ikkala, O., Richter, D., Hadjichristidis, N., (2007) Architecturally induced multiresponsive vesicles from well-defined polypeptides Formation of gene vehicles, *Biomacromolecules*, Vol. 8 (7), pp. 2173-2181.

Knez, M., Sumser, M.P., Bittner, A.M., Wege, C., Jeske, H., Hoffmann, D.M.P., Kuhnke, K., Kern, K. (2004) Binding the Tobacco Mosaic Virus to Inorganic Surfaces, *Langmuir*, Vol. 20 (2), pp. 441-447.

Kim, D. T., H. W. Blanch, and C. J. Radke, (2004) *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Marcel Dekker, Inc., New York ,Vol. 4, p. 3041.

Kapikian, A. Z. 2001 A rotavirus vaccine for prevention of severe diarrhoea of infants and young children: development, utilization and withdrawal Novartis Found. Symp. 238, pp. 153-171.

Lepault, J., Petitpas, I., Erk, I., Navaza, J., Bigot, D., Dona, M., Vachette, P., Rey, F.A. (2001) Structural polymorphism of the major capsid of rotavirus, EMBO Journal, Vol. 20 (7), pp. 1498-1507.

Li, Z., Baker, M.L., Jiang, W., Estes, M.K., Venkataram Prasad, B.V. (2009) Rotavirus architecture at subnanometer resolution, Journal of Virology, Vol. 83 (4), pp. 1754-1766.

Libersou, S., Siebert, X., Ouldali, M., Estrozi, L.F., Navaza, J., Charpilienne, A., Garnier, P., Lepault, J. (2008) Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: A potential regulatory switch of viral particle transcription activity, Journal of Virology, Vol. 82 (6), pp. 2844-2852.

Mukherjee, S., Pfeifer, C.M., Johnson, J.M., Liu, J., Zlotnick, A., (2006) Redirecting the coat protein of a spherical virus to assemble into tubular nanostructures, Journal of the American Chemical Society, Vol. 128 (8), pp. 2538-2539.

McMillan, R.A., Howard, J., Zaluzec, N.J., Kagawa, H.K., Mogul, R., Li, Y.-F., Paavola, C.D., Trent, J.D., (2005) A self-assembling protein template for constrained synthesis and patterning of nanoparticle arrays, Journal of the American Chemical Society, Vol. 127 (9), pp. 2800-2801.

McMillan, R.A., Paavola, C.D., Howard, J., Chan, S.L., Zaluzec, N.J., Trent, J.D., (2002) Ordered nanoparticle arrays formed on engineered chaperonin protein templates, Nature Materials, Vol. 1 (4), pp. 247-252

Mathieu, M., Petitpas, I., Navaza, J., Lepault, J., Kohli, E., Pothier, P., Prasad, B.V.V., Rey, F.A., (2001) Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: Implications for the architecture of the virion, EMBO Journal, Vol. 20 (7), pp. 1485-1497.

Muller, D.J., Dufrene, Y.F., (2008) Atomic force microscopy as a multifunctional molecular toolbox in nanobiotechnology, *Nature Nanotechnology*, Vol. 3 (5), pp. 261-269.

Nam, K.T., Lee, Y.J., Krauland, E.M., Kottmann, S.T., Belcher, A.M., (2008) Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds, *ACS Nano*, Vol. 2 (7), pp. 1480-1486.

Nam, K.T., Kim, D.-W., Yoo, P.J., Chiang, C.-Y., Meethong, N., Hammond, P.T., Chiang, Y.-M., Belcher, A.M. (2006) Virus-enabled synthesis and assembly of nanowires for lithium ion battery electrodes, *Science*, Vol. 312 (5775), pp. 885-888.

Odom, T.W., Huang, J.-L., Kim, P., Lieber, C.M. (1998) Atomic structure and electronic properties of single-walled carbon nanotubes, *Nature*, Vol. 391, No. 6662, pp. 62.

Otero, R., Rosei, F., Besenbacher, F. (2006) Scanning tunneling microscopy manipulation of complex organic molecules on solid surfaces, *Annual Review of Physical Chemistry*, Vol. 57, pp. 497-499.

Patton, J.T., Spencert, E. (2000) Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses, *Virology*, Vol. 277 (2), pp. 217-225.

Prasad, B.V.V., Rothnagel, R., Zeng, C.Q.-Y., Jakana, J., Lawton, J.A., Chiu, W., Estes, M.K. (1996) Visualization of ordered genomic RNA and localization of transcriptional complexes in rotavirus, *Nature*, Vol. 382, No. 6590, pp. 471-474.

Ready, K. F. M. y Sabara, M. (1987) In vitro assembly of bovine rotavirus nucleocapsid protein, *Virology* Vol. 157, No. 1, pp. 189.

Rosei, F., Rosei, R. (2002) Atomic description of elementary surface processes: Diffusion and dynamics, *Surface Science*, Vol. 500, No. 1-3, pp. 399.

Rothemund, P.W.K. (2006) Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, *Nature*, Vol. 440 (7082), pp. 297-302.

Ros, P. (2008) Self assembly: Design by DNA, *Nature Nanotechnology*, Vol. 3, pp. 132.

Shapir, E., Yi, J., Cohen, H., Kotlyar, A.B., Cuniberti, G., Porath, D. (2005) The puzzle of contrast inversion in DNA STM imaging, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 109 (30), pp. 14270-14274.

Uchida, M., Klem, M.T., Allen, M., Suci, P., Flenniken, M., Gillitzer, E., Varpness, Z., Douglas, T. (2007) Biological containers: Protein cages as multifunctional nanoplatfoms, *Advanced Materials*, Vol. 19 (8), pp. 1025-1042.

Whyburn, G.P., Li, Y., Huang, Y. (2008) Protein and protein assembly based material structures, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 18 (32), pp. 3755-3762.

Yoo, P.J., Nam, K.T., Qi, J., Lee, S.-K., Park, J., Belcher, A.M., Hammond, P.T. 2006 Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces, *Nature Materials*, Vol. 5 (3), pp. 234-240.

Zhang, S. (2003) Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly, *Nature Biotechnology*, Vol. 21 (10), pp. 1171-1178.

Zhang, S. (2002) Emerging biological materials through molecular self-assembly, *Biotechnology Advances*, Vol. 20 (5-6), pp. 321-339.

Zhao, X., Zhang, S. (2004) Fabrication of molecular materials using peptide construction motifs, *Trends in Biotechnology*, Vol. 22 (9), pp. 470-476.

Zhao, X., Zhang, S. (2007) Designer self-assembling peptide materials, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 7 (1), pp. 13-22.

## Capítulo 2: Estudio STM de la adsorción de albúmina sérica humana en la superficie de nanotubos de capa simple

Barone, P.W., Baik, S., Heller, D.A., Strano, M.S. (2005) Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes, *Nature Materials*, Vol. 4 (1), pp. 86-92 137.

Basiuk, E.V., Basiuk, V.A., Santiago, P., Puente-Lee, I. (2007) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes with porphyrins: Meso-tetraphenylporphine and its transition metal complexes, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 7 (4-5), pp. 1530-1538.

Bekyarova, E., Yingchun N., Malarkey E. B., Montana V., McWilliams J. L., Haddon R. C., and Parpura V. (2005) Applications of Carbon Nanotubes in Biotechnology and Biomedicine. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Vol. 1, pp. 3–17,

Braden, B.C., Goldbaum, F.A., Chen, B.-X., Kirschner, A.N., Wilson, S.R., Erlanger, B.F. (2000) X-ray crystal structure of an anti-Buckminsterfullerene antibody Fab fragment: Biomolecular recognition of C60, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 (22), pp. 12193-12197.

Chen, R.J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K.A., Wong Shi Kam, N., Shim, M., Li, Y., Kim, W., Dai, H. (2003) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 100 (9), pp. 4984-4989.

Cheung, C.L., Hafner, J.H., Lieber, C.M. (2000) Carbon nanotube atomic force microscopy tips: Direct growth by chemical vapor deposition and application to high-resolution imaging, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 97 (8), pp. 3809-3813.

Davis, J.J., Green, M.L.H., Hill, H.A.O., Leung, Y.C., Sadler, P.J., Sloan, J., Xavier, A.V., Tsang, S.C. (1998) The immobilisation of proteins in carbon nanotubes, *Inorganica Chimica Acta*, Vol. 272 (1-2), pp. 261-266.

De Miranda Tomásio, S., Walsh, T.R. (2007) Atomistic modelling of the interaction between peptides and carbon nanotubes, *Molecular Physics*, Vol. 105 (2-3), pp. 221-229.

Déjardin P. (2006) *Proteins at Solid-Liquid Interfaces*, Springer, cap 6, pp.134.

Dieckmann, G.R., Dalton, A.B., Johnson, P.A., Razal, J., Chen, J., Giordano, G.M., Muñoz, E., Draper, R.K. (2003) Controlled assembly of carbon nanotubes by designed amphiphilic peptide helices, *Journal of the American Chemical Society*, Vol 125 (7), pp. 1770-1777.

El Kadi, N., Taulier, N., Le H., J.Y., Gindre, M., Urbach, W., Nwigwe, I., Kahn, P.C., Waks, M. (2006) Unfolding and refolding of bovine serum albumin at acid pH: Ultrasound and structural studies, *Biophysical Journal*, Vol. 91 (9), pp. 3397-3404.

Erlanger, B.F., Chen, B.-X., Zhu, M., Brus, L. (2001) Binding of an Anti-Fullerene IgG Monoclonal Antibody to Single Wall Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, Vol. 1 (9), pp. 465-467.

Gao, H., Kong, Y., Cui, D., Ozkan, C.S. (2003) Spontaneous insertion of DNA oligonucleotides into carbon nanotubes, *Nano Letters*, Vol. 3 (4), pp. 471-473.

Giacalone, F., Martín, N. (2006) Fullerene polymers: Synthesis and properties, *Chemical Reviews*, Vol. 106 (12), pp. 5136-5190.

Harrison, B.S., Atala, A. (2007) Carbon nanotube applications for tissue engineering, *Biomaterials*, Vol. 28 (2), pp. 344-353.

Hersam, M.C. (2008) Progress towards monodisperse single-walled carbon nanotubes, *Nature Nanotechnology*, Vol. 3 (7), pp. 387-394.

Horcas, I., Fernández, R., Gómez-Rodríguez, J.M., Colchero, J., Gómez-Herrero, J., Baro, A.M. (2007) WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Review of Scientific Instruments*, Vol. 78 (1), art. no. 013705.

Jiang, K., Schadler, L.S., Siegel, R.W., Zhang, X., Zhang, H., Terrones, M. (2004) Protein immobilization on carbon nanotubes via a two-step process of diimide-activated amidation, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 14 (1), pp. 37-39.

Katz, E., Willner, I. (2004) Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: Applications in nanobioelectronics, *ChemPhysChem*, Vol. 5 (8), pp. 1084-1104.

Kiernan, G., Barron, V., Blond, D., Drury, A., Coleman, J., Murphy, R., Cadec, M., Blau, W. (2003) characterization of nanotube-based artificial muscle materials, *Proc. of SPIE: Optics and Photonics Tech Appl*, Vol. 4876, pp. 775-782.

Karajanagi, S.S., Vertegel, A.A., Kane, R.S., Dordick, J.S. (2004) Structure and function of enzymes adsorbed onto single-walled carbon nanotubes, *Langmuir*, Vol. 20 (26), pp. 11594-11599.

Kong, J., Dai, H. (2001) Full and modulated chemical gating of individual carbon nanotubes by organic amine compounds, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 105 (15), pp. 2890-2893.

Krishnakumar, S.S., Panda, D. (2002) Spatial relationship between the prodan site, Trp-214, and Cys-34 residues in human serum albumin and loss of structure through incremental unfolding, *Biochemistry*, Vol. 41 (23), pp. 7443-7452.

Lau, K.-T., Cheung, H.-Y., Lu, J., Yin, Y.-S., Hui, D., Li, H.-L. (2008) Carbon nanotubes for space and bio-engineering applications, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*, Vol. 5 (1), pp. 23-35.

Lee, S.-H., Pumprueg, S., Moudgil, B., Sigmund, W. (2005) Inactivation of bacterial endospores by photocatalytic nanocomposites, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 40 (2), pp. 93-98.

Lin Chun, A., Moralez, J.G., Webster, T.J., Fenniri, H. (2005) Helical rosette nanotubes: A biomimetic coating for orthopedics?, *Biomaterials*, Vol. 26 (35), pp. 7304-7309.

Li, L., Hitchcock, A.P., Cornelius, R., Brash, J.L., Scholl, A., Doran, A. (2008) X-ray microscopy studies of protein adsorption on a phase segregated polystyrene/polymethylmethacrylate surface. 2. Effect of pH on site preference, *Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 112 (7), pp. 2150-2158.

Lin, Y., Taylor, S., Li, H., Fernando, K.A.S., Qu, L., Wang, W., Gu, L., Sun, Y.-P. 2004 Advances toward bioapplications of carbon nanotubes, *Journal of Materials Chemistry*, Vol. 14 (4), pp. 527-541.

Lin, Y., Huaping Li, Lingrong G., Pengju G. Luo, L. M. Veca, H. Wang, Y.-P. Sun, (2008) Bioapplications of carbon nanotubes, *Chemistry of Carbon Nanotubes*, American Scientific publisher, Vol. 2, Cap.11.

Liu, Z. X. Sun, N. Nakayama-Ratchford, H. Dai, (2007) Supramolecular Chemistry on Water-Soluble Carbon Nanotubes for Drug Loading and Delivery, *ACS Nano*, Vol. 1 (1), pp. 50-56.

Losic, D., Martin, L.L., Aguilar, M.-I., Small, D.H. (2006)  $\beta$ -amyloid fibril formation is promoted by step edges of highly oriented pyrolytic graphite, *Biopolymers-Peptide Science Section*, Vol. 84 (5), pp. 519-526.

Matsuura, K., Saito, T., Okazaki, T., Ohshima, S., Yumura, M., Iijima, S. (2006) Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions, *Chemical Physics Letters*, Vol. 429 (4-6), pp. 497-502.

Nepal, D., Geckeler, K.E. (2006) PH-sensitive dispersion and debundling of single-walled carbon nanotubes: Lysozyme as a tool, *Small*, Vol. 2 (3), pp. 406-412.

Numata, M., Asai, M., Kaneko, K., Bae, A.-H., Hasegawa, T., Sakurai, K., Shinkai, S. (2005) Inclusion of cut and as-grown single-walled carbon nanotubes in the helical superstructure of schizophyllan and curdlan ( $\beta$ -1,3-glucans), *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 127 (16), pp. 5875-5884.

Odom, T.W., Huang, J.-L., Lieber, C.M. (2002) STM studies of single-walled carbon nanotubes, *Journal of Physics Condensed Matter*, Vol. 14 (6), pp. R145-R167.

Roman, T., Diño, W.A., Nakanishi, H., Kasai, H. (2006) Glycine adsorption on single-walled carbon nanotubes, *Thin Solid Films*, Vol. 509 (1-2), pp. 218-222.

Raffaini, G., Ganazzoli, F. (2003) Simulation study of the interaction of some albumin subdomains with a flat graphite surface, *Langmuir*, Vol. 19 (8), pp. 3403-3412.

Raffaini, G., Ganazzoli, F. (2007) Understanding the performance of biomaterials through molecular modeling: Crossing the bridge between their intrinsic properties and the surface adsorption of proteins, *Macromolecular Bioscience*, Vol. 7 (5), pp. 552-566.

Salvador-Morales C., Green, M. L.H., Sim, R. B., (2008) Interaction between carbon nanotubes and Biomolecules, *Chemistry of carbon nanotubes*, American Scientific Publisher, Vol, 3, Cap1, pp.1-23.

Shen, J.-W., Wu, T., Wang, Q., Kang, Y. (2008) Induced stepwise conformational change of human serum albumin on carbon nanotube surfaces, *Biomaterials*, Vol. 29 (28), pp. 3847-3855.

Shim, M., Kam, N.W.S., Chen, R.J., Li, Y., Dai, H. (2002) Functionalization of Carbon Nanotubes for Biocompatibility and Biomolecular Recognition, *Nano Letters*, Vol. 2 (4), pp. 285-288.

Sugio, S., Kashima, A., Mochizuki, S., Noda, M., Kobayashi, K. (1999) Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution, *Protein Engineering*, Vol. 12 (6), pp. 439-446.

Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., Prato, M. (2006) Chemistry of carbon nanotubes, *Chemical Reviews*, Vol. 106 (3), pp. 1105-1136.

Tsang, S.C., Davis, J.J., Green, M.L.H., Hill, H.A.O., Leung, Y.C., Sadler, P.J. (1995) Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: High-resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity, *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, Vol. (17), pp. 1803-1804.

Wang, S., Humphreys, E.S., Chung, S.-Y., Delduco, D.F., Lustig, S.R., Wang, H., Parker, K.N., Jagota, A. (2003) Peptides with selective affinity for carbon nanotubes, *Nature Materials*, Vol. 2 (3), pp. 196-200.

Wang, H., Gu, L., Lin, Y., Lu, F., Meziani, M.J., Luo, P.G., Wang, W., Sun, Y.-P. (2006) Unique aggregation of anthrax (*Bacillus anthracis*) spores by sugar-coated single-walled carbon nanotubes, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 128 (41), pp. 13364-13365.

Xu, S., Dong, M., Rauls, E., Otero, R., Linderoth, T.R., Besenbacher, F. (2006) Coadsorption of guanine and cytosine on graphite: Ordered structure based on GC pairing, *Nano Letters*, Vol. 6 (7), pp. 1434-1438.

Yarotski, D. A. Svetlana V. Kilina, A. Alec Talin, Sergei Tretiak, Oleg V. Prezhdo, Alexander V. Balatsky, Antoinette J. (2009) Taylor Scanning Tunneling Microscopy of DNA-Wrapped Carbon Nanotubes, *Nano Letters*, Vol. 9 (1), 12-17.

Zheng, M., Jagota, A., Semke, E.D., Diner, B.A., McLean, R.S., Lustig, S.R., Richardson, R.E., Tassi, N.G. (2003) DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes, *Nature Materials*, Vol. 2 (5), pp. 338-342.

Zunzain, P.A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., Curry, S. (2003) Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid, *BMC Structural Biology*, Vol 3, art. no. 1, pp. 1-9.