



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ESTUDIOS DE PROTEÍNAS VIRALES MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE  
MICROSCOPIA DE BARRIDO POR SONDA, Y SU DECORACIÓN CON  
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JOSÉ ANDRÉS DE LA CRUZ RODRÍGUEZ GALVÁN**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. VLADIMIR BASSIOUK EVDOKIMENKO  
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**

**COMITÉ TUTOR: Dra. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Dra. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE 20013.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ESTUDIOS DE PROTEÍNAS VIRALES MEDIANTE LAS TÉCNICAS DE  
MICROSCOPIA DE BARRIDO POR SONDA, Y SU DECORACIÓN CON  
NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JOSÉ ANDRÉS DE LA CRUZ RODRÍGUEZ GALVÁN**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. VLADIMIR BASSIOUK EVDOKIMENKO  
INSTITUTO DE CIENCIAS NUCLEARES**

**COMITÉ TUTOR: Dra. MARÍA DE LOURDES SEGURA VALDEZ  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Dra. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE 20013.**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/572/13

ASUNTO: Oficio de Jurado

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **9 de septiembre de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **RODRÍGUEZ GALVÁN JOSÉ ANDRÉS DE LA CRUZ** con número de cuenta **99287595** con la tesis titulada: **"Estudios de proteínas virales mediante las técnicas de microscopía de barrido por sonda, y su decoración con nanopartículas metálicas"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. VLADIMIR BASSIOUK EVDOKIMENKO**:

Presidente:	DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Vocal:	DRA. ELENA GOLOVATAYA DZHymbEEVA
Secretario:	DRA. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
Suplente:	DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES
Suplente	DRA. MARGARITA RIVERA HERNÁNDEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 21 de octubre de 2013

*M. del Coro Arizmendi Arriaga*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



## AGRADECIMIENTOS

- Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca a nivel de doctorado otorgada para la realización de esta tesis, y por el apoyo mediante el proyecto CONACyT-127299.
- A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la UNAM, por el apoyo mediante proyectos de investigación DGAPA-IN100112 e IN101313.
- A mi Comité Tutor: Dr. Vladimir Basiuk Evdokimenko, Dra. Adela Rodríguez Romero y Dra. María de Lourdes Segura, por la atención y tiempo que me brindaron asesorando cada etapa de mi investigación.
- A mi Comité de Candidatura: Dra. María de Lourdes Segura, Dra. María Cristina Piña Barba, Dra. Laura Colín Barenque, Dr. Julio Arenas Aranda y Dr. Lauro Bucio.
- A los miembros del Jurado: Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dra. Elena Golovataya Dzhymbeeva, Dra. Adela Rodríguez Romero, Dra. Teresa Imelda Fortoul Vander Goes y Dra. Margarita Rivera Hernández, por sus valiosos comentarios que ayudaron a mejorar esta tesis.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales.
- Al Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM, por la infraestructura, espacio y material dotado.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

- ♣ Al Dr. Vladimir Bassiouk Evdokimenko, por su tutoría durante la realización del proyecto.
- ♣ A la Dra. Pilar Carreón Castro por su apoyo durante mi permanencia en el Instituto de Ciencias Nucleares, UNAM.
- ♣ Al Centro de Ciencias Aplicadas y Desarrollo Tecnológico, UNAM, Elena Golovataya Dzhymbeeva, por el espacio y material provisto para este trabajo.
- ♣ Al Laboratorio Central de Microscopia, UNAM, Dra. Margarita Rivera, por su asistencia técnica con el HRTEM.
- ♣ Al M. en C. Iván Puente Lee, por la asesoría técnica en el análisis TEM.
- ♣ A la M.C. Leticia Guzmán Mora por su asistencia en los análisis de citotoxicidad.
- ♣ Al Dr. Flavio Contreras le agradezco por su apoyo durante mi formación académica.
- ♣ Dr. Alejandro Heredia y Dr. Oscar Amellines por su asistencia en muchas fases de mi investigación.
- ♣ A mis amigos que me ayudaron directa o indirectamente durante la elaboración de esta tesis, Martín Gonzales, Marcos Mora, Virginia López, Leticia Guzmán, Flavio Contreras, Alejandro Heredia y Oscar Amellines.
- ♣ Al personal administrativo del posgrado en ciencias biológicas y de la facultad de ciencias por su valiosa ayuda con mis trámites escolares y de titulación.

*A mis padres y hermanos*



# Índice

Índice.....	i
Resumen.....	v
Abstrac.....	vii
<b>1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
2.1 Bionanotecnología y nanobiotecnología.....	5
2.2 Nanomateriales.....	5
2.3 Síntesis de nanomateriales.....	7
2.4 Nanomateriales relevantes.....	7
2.4.1 Cápside vírica.....	7
2.4.2 Nanopartículas de plata.....	7
2.4.3 Nanocúmulos de plata.....	11
2.4.4 Nanotubos de carbono.....	11
2.5 Nanomateriales híbridos.....	12
2.5.1 Síntesis de nanomateriales híbridos.....	13
2.5.2 Ensamble usando plantillas nanoestructuradas.....	13
2.5.3 Síntesis usando plantillas nanoestructuradas.....	13
2.6 Síntesis de nanopartículas de plata.....	14
2.6.1 Síntesis de nanopartículas de plata por proteínas.....	15
2.6.1.1 Proceso activo.....	16
2.6.1.2 Proceso inactivo.....	17
2.7 Biomineralización.....	19

<b>3.</b>	<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	22
3.1	Hipótesis.....	22
3.2	Objetivo general.....	22
3.3	Objetivos específicos.....	22
<b>4.</b>	<b>Materiales y métodos</b> .....	23
4.1	Síntesis de nanomateriales híbridos.....	23
4.2	Caracterización de nanomateriales híbridos.....	24
4.2.1	Espectrometría ultravioleta-visible.....	24
4.2.2	La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier.....	25
4.2.3	Microscopias electrónicas.....	25
4.2.4	Microscopía de barrido por sonda.....	26
4.3	Análisis teórico.....	29
<b>5.</b>	<b>Síntesis de nanocúmulos de plata dirigida por albumina de suero humano</b> .....	30
5.1	Introducción.....	30
5.2	Materiales y métodos.....	30
5.2.1	Materiales.....	30
5.2.2	Síntesis de híbridos AgNCs/HSA.....	31
5.2.3	Formación de conjugados SWCNTs-AgNCs/HSA.....	32
5.2.4	Caracterización UV-vis y FT-IR.....	32
5.2.5	Caracterización por microscopía.....	32
5.3	Resultados y discusión.....	33
5.3.1	Análisis de nanocúmulos de plata.....	33

5.3.2	Conjugación de SWCNTs con nanocúmulos AgNCs/HSA.....	41
5.3.3	Interacción de conjugados con glóbulos rojos.....	46
5.4	Conclusión.....	49
<b>6.</b>	<b>Nanopartículas de plata confinadas en nanodiscos del virus del mosaico del tabaco.....</b>	<b>50</b>
6.1	Introducción.....	62
6.2	Materiales y métodos.....	52
6.2.1	Materiales.....	52
6.2.2	Obtención de nanodiscos.....	52
6.2.3	Síntesis del híbrido AgNPs/NDs.....	52
6.2.4	Caracterización.....	53
6.3	Resultados y discusión.....	54
6.3.1	Síntesis de nanohíbridos.....	55
6.4	Conclusión.....	60
<b>7.</b>	<b>Partículas esféricas derivadas de TMV como plantilla suave para la síntesis de nanopartículas de plata.....</b>	<b>61</b>
7.1	Introducción.....	61
7.2	Materiales y métodos.....	63
7.2	Materiales.....	63
7.2.1	Formación de partículas esféricas.....	63
7.2.2	Síntesis del híbrido AgNPs/SPs.....	64
7.2.3	Caracterización de híbridos.....	64
7.3	Resultados y discusión.....	65
7.3.1	Síntesis de nanopartículas de plata sobre SPs.....	68

7.4	Conclusión.....	71
<b>8.</b>	<b>Partículas virales como plantillas suaves para la síntesis de nanopartículas de plata.....</b>	<b>72</b>
8.1	Introducción.....	72
8.2	Materiales y métodos.....	75
8.2.1	Materiales.....	75
8.2.2	Síntesis de híbridos AgNPs/ TVP6.....	75
8.2.3	Caracterización.....	76
8.2.4	Cálculos teóricos.....	76
8.3	Resultados y discusión.....	77
8.3.1	Resultados experimentales.....	77
8.3.2	Resultados teóricos.....	86
8.4	Conclusión.....	89
<b>9.</b>	<b>Conclusiones generales.....</b>	<b>91</b>
<b>10.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>93</b>
11.	Productos generados.....	105
11.1	Artículos publicados.....	105
11.2	Presentaciones en congresos.....	105

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue la preparación y caracterización de nanoestructuras híbridas usando proteínas y estructuras supramoleculares de proteínas virales como plantillas para coordinar la nucleación, crecimiento, organización y transformación de nanopartículas metálicas. En particular arquitecturas globulares como la albumina sérica humana (HSA), estructuras esféricas y toroides generadas a partir del virus del mosaico del tabaco (TMV) y tubos ensamblados de la proteína viral VP6 se funcionalizaron con nanopartículas de plata (AgNPs).

La funcionalización de las plantillas se generó in situ en un medio acuoso mediante la reducción química de precursores metálicos como nitrato de plata y acetato de plata. Los híbridos generados se caracterizaron usando varias técnicas como; Espectrometría ultravioleta-visible (UV-vis), espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía de efecto túnel (STM). Además se analizó la actividad tóxica de los híbridos generados usando la albumina sérica (HSA/AgNPs), finalmente se analizó la capacidad de conducción eléctrica de los híbridos generados con los tubos de la proteína VP6 (VP6/AgNPs).

Los resultados indicaron que las plantillas empleadas poseen grupo funcionales con afinidad por los precursores metálicos, ya que se logró la síntesis in situ de nanopartículas de plata. La utilización de estructuras altamente organizadas permitió la formación de

materiales híbridos de alta calidad, las plantillas conservaron su macroestructura y la fase inorgánica creció a lo largo de las superficies con grupos funcionales con afinidad por iones de plata. El número de grupos funcionales por área de superficie y la geometría de la plantilla definieron el grado de funcionalización y las características de las nanopartículas metálicas. Los materiales mostraron ser estables en fase acuosa hasta por varios meses. En particular los híbridos HSA/AgNPs no presentan toxicidad para los glóbulos rojos. Finalmente, la capacidad de conducción eléctrica de los híbridos VP6/AgNPs tienen un comportamiento eléctrico semejante a la del bulto.

En este trabajo se demuestra que el uso de plantillas como la albumina de suero humano, esferas y discos derivados de TMV, así como de los tubos de la proteína VP6 es un método práctico para la síntesis de nanobjetos híbridos con arquitecturas notables.

La actual facilidad de escalar la producción de plantillas biológicas, combinado con el método preciso y reproducible empleado en este trabajo hace de los híbridos, materiales útiles en aplicaciones nanotecnológicas que pueden ir desde bactericidas hasta elementos en dispositivos electrónicos.

## ABSTRACT

The goal of this work is the preparation and characterization of hybrid nanostructures using proteins and supramolecular structures like viral protein as templates for the coordination, nucleation, transformation, growth, and organization of metal ions into metal nanoparticles. Here, globular architectures as human serum albumin (HSA), spherical and toroid structures formed from tobacco mosaic virus (TMV) and assembled tubes from the VP6 viral protein were particularly functionalized with silver nanoparticles (AgNPs).

The template functionalization was generated in situ in aqueous medium through the chemical reduction of metallic precursors as silver nitrate and silver acetate. The generated hybrids were characterized by a number of tools as UV-vis spectroscopy, Infrared spectroscopy (IR spectroscopy), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), scanning tunneling microscopy (STM), as well as dynamic light scattering (DLS). Additionally the cytotoxicity of the hybrids produced with human serum albumin (AgNPs/HSA) was tested. Finally the electric conductivity of the VP6 hybrids (VP6/AgNPs) was analyzed.

The results showed the templates employed have several functional groups with affinity for metallic precursors because the in situ synthesis of silver nanoparticles was obtained. The use of highly organized structures led to the formation of high quality hybrid materials, the templates kept their macrostructure and the inorganic phase grew-up along the surfaces with functional groups with silver affinity. The number of functional groups by surface area and the geometry of the template defined the functionalization grade and the final metallic

nanopartículas characteristics. The final materials showed stability in aqueous phase for months. In particular, the HSA hybrids showed cytotoxicity for human red blood cells (RBCs). Finally, the VP6 hybrids displayed an electric conductivity similar to the silver bulk.

In summary in this work we showed the use of HSA, disks and spheres derived from TMV and VP6 tubes, as templates it is a practical method for the synthesis of hybrid nanobjects with notable architectures. The easy production of biological templates in combination with a precise and reproductive method makes the hybrids, materials with a potential use in nanotechnology with applications from bactericides to electronic devices.



## 1. Introducción

La nanociencia y la nanotecnología han tenido un crecimiento importante en los últimos 20 años, se han propagado en muchas áreas de investigación por su enorme potencial para generar beneficios y están atrayendo rápidamente un incremento en inversión de gobiernos y empresas en muchas partes del mundo. Se calcula que la cantidad total anual de nanomateriales en el mercado mundial es de unos 11 millones de toneladas, con un valor de mercado de aproximadamente \$30,000 millones. En la actualidad, un amplio porcentaje se utiliza en investigación y solo el mínimo forma parte de los componentes en productos comerciales<sup>1</sup>.

Hoy en día hay un amplio espectro de nanomateriales con propiedades físicas y químicas únicas. Sin embargo, los nanomateriales híbridos, biomoléculas/nanopartículas, han llamado la atención en los últimos años. El hecho de que las dimensiones de las biomoléculas sean comparables a las de las nanopartículas sugirió que la sinergia de sus propiedades individuales, podría resultar en nanomateriales con características novedosas.

Uno de los sistemas híbridos que más atención ha recibido es el de proteínas/nanopartículas metálicas, esto se debe a que la combinación de las propiedades eléctricas, ópticas y catalíticas de las nanopartículas metálicas con las propiedades estructurales, catalíticas, dinámicas, y de reconocimiento molecular de las proteínas. Esta combinación resulta en nanomateriales complejos con propiedades y funciones avanzadas<sup>2</sup>. En los últimos años ha habido un progreso substancial en la síntesis de los sistemas híbridos. Uno de los más adelantados se basa en el uso de cápsides virales como plantillas para la síntesis de

nanopartículas<sup>3</sup>. Anteriormente los virus eran considerados solo como patógenos; sin embargo, desde hace 10 años esta perspectiva cambió ya que los virus por primera vez fueron definidos como nanopartículas virales. Actualmente son considerados como nanocontenedores para encapsular nanopartículas, y como plantillas o moldes para sintetizar y organizar nanomateriales en sus superficies<sup>4</sup>.

Las cápsides poseen características que las hacen ideales para su uso en nanotecnología: (i) Son estructuras supramoleculares con un gran número de grupos funcionales que pueden conjugarse con materiales orgánicos e inorgánicos. (ii) Cuentan con estructura y simetría definida. (iii) Tienen una periodicidad precisa de grandes dimensiones. (iv) La información genética de las proteínas de la cápside es accesible, por lo tanto, sus propiedades pueden ser modificadas y diseñadas a través de ingeniería genética. (v) Con los avances actuales en biotecnología la producción en masa de las cápsides es posible con relativa facilidad<sup>5,6</sup>.

Por otra parte los avances recientes en los métodos de síntesis han permitido la producción de materiales híbridos homogéneos, monodispersos y en la cantidad suficiente para iniciar su exploración en diversas aplicaciones, las cuales pueden dividirse en áreas clave: (i) El desarrollo de películas y arreglos para aplicaciones que van desde electrónicos hasta ingeniería de tejidos. (ii) El diseño de dispositivos electrónicos y de almacenamiento de datos. (iii) La producción de dispositivos inteligentes para imagen y terapia dirigidos a tejidos específicos<sup>5</sup>.

Como mencionamos se cuenta con un progreso sustancial en la síntesis de los sistemas híbridos. Desafortunadamente la mayoría de los esfuerzos se han enfocado en la decoración

de las plantillas virales con nanopartículas de oro y poco se ha hecho usando nanopartículas de plata, esto, a pesar de que este material cuenta con características particulares que pueden ser explotadas. La plata tiene la más alta conductividad térmica y eléctrica entre los metales, haciéndola un componente ideal para interconexiones eléctricas. Sus propiedades ópticas la hacen el material más importante en plasmónica (rama de la Nanofotónica que se basa en el estudio de los procesos de interacción entre la radiación electromagnética y los electrones de conducción en interfaces metal-dieléctrico). Sus aplicaciones en esta área van desde ensayo y detección de moléculas hasta la concentración y manipulación de la luz. Además, la plata tiene propiedades bactericidas ampliamente reconocidas que la hacen un material ideal para recubrir dispositivos con aplicaciones médicas<sup>7,8</sup>.

Tomando en consideración los avances en los métodos de síntesis de nanomateriales híbridos y las propiedades notables de las nanopartículas de plata, el objetivo de esta tesis fue la síntesis de este tipo de nanomateriales novedosos, los cuales se construyeron usando proteínas y proteínas virales como plantillas para sintetizar nanopartículas de plata.

En particular arquitecturas globulares como la albumina sérica humana (HSA), estructuras esféricas y toroides generadas a partir del virus del mosaico del tabaco (TMV) y tubos ensamblados de la proteína viral VP6 se usaron como plantillas. Se seleccionaron estructuras con geometrías diferentes con la finalidad de demostrar el alcance de este método para generar estructuras híbridas heterogéneas altamente estables. Especialmente se demuestra que la distribución espacial y densidad en la plantilla de los grupos funcionales que interactúan con la plata determinan la ubicación y forma de las nanopartículas de plata. Además, se contribuye incrementado el repertorio de estructuras híbridas disponibles.

La tesis está compuesta por once puntos, en el punto uno se da una breve introducción sobre los materiales híbridos, cómo se fabrican y sus posibles aplicaciones. También se enfatiza en el por qué de sintetizar nanomateriales híbridos usando proteínas virales y nanopartículas de plata. En el punto dos se definen conceptos relevantes como nanobiotecnología y bionanotecnología. Es importante señalar que se define que es un nanomaterial y además se da su clasificación. Por otro lado, además se mencionan las propiedades y aplicaciones de las nanopartículas de plata y por último se profundiza en los métodos de síntesis de nanomateriales híbridos. En el punto tres se plantean la hipótesis, el objetivo y los objetivos particulares. En el punto cuatro se da una breve introducción a las biomoléculas empleadas como plantillas y a las técnicas empleadas para caracterizar los materiales híbridos. El punto cinco se enfoca en la síntesis de nanocúmulos metálicos a partir de la proteína albumina de suero humano, después formamos un conjugado usando nanotubos de carbono como plantilla para depositar los nanocúmulos y analizamos su efecto tóxico en glóbulos rojos. En el apartado seis se presenta un nuevo método para obtener discos a partir de TMV, éstos se usaron como nanoreactores para sintetizar nanopartículas de plata. En el punto siete se construyó un híbrido usando nanoesferas (producidas térmicamente a partir de la cápside TMV) como plantilla para la síntesis de nanopartículas metálicas. Cabe mencionar que es la primera vez que las esferas se usan como plantillas. En el apartado ocho usamos partículas virales en forma de tubos de la proteína VP6 para sintetizar nanoalambres de plata, adicionalmente fabricamos electrodos de oro para medir sus conductividad, finalmente se realiza un estudio teórico de la interacción de los grupos funcionales que participan en la síntesis de las nanopartículas de plata. En el punto nueve se plantean las conclusiones generales, en el punto diez se da la literatura citada y finalmente en el punto once se mencionan los productos generados.

## **2. Antecedentes**

En este capítulo damos una introducción a conceptos que son utilizados en esta tesis, se revisan conceptos como bionanotecnología, definimos que es nanomaterial y como se clasifican. Damos un panorama general acerca de las nanopartículas de plata y sus propiedades. Definimos que es un nanomaterial híbrido, sus aplicaciones y las rutas para sintetizarlos, describimos en qué consiste la síntesis dirigida por proteínas y revisamos el concepto de biomineralización.

### **2.1 Bionanotecnología y nanobiotecnología**

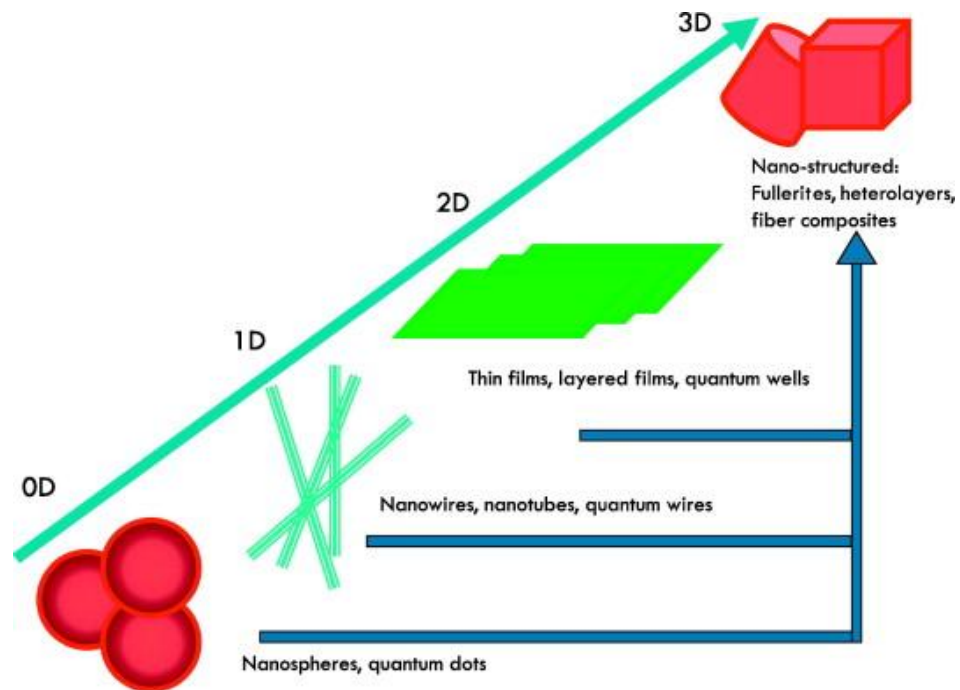
Actualmente, no hay una clara definición de bionanotecnología y nanobiotecnología, sin embargo ambos términos se ubican en la interface entre nanotecnología y biología. En esta interface, la bionanotecnología está interesada en las propiedades y aplicación de biomoléculas con fines tecnológicos. Esto es, usando técnicas de nanofabricación y procesos de autoensamble molecular, la bionanotecnología permite la producción de materiales y dispositivos que pueden ser usados en medicina, electrónica y energía, solo por mencionar algunas. Por otro lado, la nanobiotecnología está interesada en el uso de nanomateriales y herramientas diseñadas a través de la nanotecnología para analizar sistemas biológicos<sup>1</sup>.

### **2.2 Nanomateriales**

Un nanomaterial es un objeto que tiene al menos una dimensión igual o menor a 100 nanómetros con propiedades marcadamente diferentes a las del bulto. Los factores que provocan que sus propiedades difieran son: un incremento del área de superficie relativa y

efectos cuánticos. Hay variantes en la clasificación los nanomateriales (ej., morfología, dimensionalidad y composición), sin embargo, siempre es útil hacerlo de acuerdo con el número de dimensiones de confinamiento<sup>9</sup>:

- (a) 0D nanomateriales que están confinadas en sus tres dimensiones (puntos cuánticos, nanocúmulos);
- (b) 1D nanomateriales con dos dimensiones en la escala nanométrica y sin confinamiento a lo largo de una dimensión (nanoalambres);
- (c) 2D nanomateriales con una dimensión en la escala nano y sin confinamiento a lo largo de las otras dos dimensiones (cubiertas y películas); y,
- (d) 3D materiales nanoestructurados (organizaciones con nanomateriales 0D, 1D, o 2D como ladrillos).



**Figura 1:** Clasificación de nanomateriales por su direccionalidad<sup>9</sup>.

## **2.3 Síntesis de nanomateriales**

En la actualidad, hay una amplia variedad de técnicas que permiten la creación de nanoestructuras con varios grados de calidad, velocidad y costo. Estas, en general caen en dos categorías: de “abajo hacia arriba” y de “arriba hacia abajo”. El método de arriba hacia abajo consiste en iniciar con un bloque de material y grabar o fresar hacia abajo hasta obtener la forma deseada (ej. litografía). Mientras que la construcción de abajo hacia arriba implica el ensamble de subunidades pequeñas (átomos o moléculas) para hacer estructuras más grandes (ej. autoensamble). El reto para la técnica de arriba hacia abajo es la creación de estructuras más pequeñas con suficiente precisión, en tanto que para la técnica de abajo hacia arriba es hacer estructuras suficientemente grandes, y con calidad para ser usadas como materiales<sup>1</sup>.

## **2.4 Nanomateriales relevantes**

En este apartado nos enfocamos en describir diferentes materiales que son de interés particular para este trabajo.

### **2.4.1 Cápside vírica**

La cápside vírica es la cubierta de proteína que encapsula el material genético en los virus. Está constituida por capsómeros que se forman de una o varias proteínas distintas. Las cápsides se clasifican comúnmente según su simetría en helicoidales y esféricas.

### **2.4.2 Nanopartículas de plata**

Tomando en cuenta la clasificación anterior, las nanopartículas de plata (AgNPs) son nanomateriales 0D, que tienen propiedades nuevas o diferentes comparadas con partículas

grandes del mismo material. Por ejemplo, un fragmento de plata es de color plateado, en contraste, las nanopartículas de plata son generalmente de color amarillo. Además, presentan una gran área de superficie y efectos cuánticos debido a su tamaño. El incremento de superficie se debe a que conforme una partícula disminuye su tamaño un mayor número de átomos están presentes en su superficie comparados con el número de átomos dentro. Este incremento de área de superficie además les otorga una mayor reactividad <sup>1,10</sup>.

La plata probablemente es el material más importante en plasmónica, además de reflejar la luz, tiene la propiedad de que bajo ciertas condiciones la luz puede viajar por su superficie sin alejarse de ella (la luz queda atrapada en la superficie), esa luz superficial es una onda más complicada que la luz normal ya que consiste en la onda en un campo electromagnético y los electrones libres presentes en el metal, estas ondas complejas reciben el nombre de “plasmones superficiales”<sup>8</sup>.

Además, en las partículas esféricas de plata existe un fenómeno conocido como “resonancia de plasmones superficiales localizados (LSPR)”. Cuando una partícula esférica pequeña irradiada por luz (con una longitud de onda de mayor tamaño que la partícula) el campo eléctrico oscilante se localiza alrededor de la superficie del metal y causa que los electrones de conducción oscilen coherentemente, cuando la nube de electrones es desplazada con respecto del núcleo, fuerzas restauradoras surgen de la atracción de coulomb entre los electrones y el núcleo, que resulta en una oscilación o resonancia de la nube de electrones relativa al núcleo. Debido a su fuerte confinamiento en la superficie del metal, los LSPR se muestran muy sensibles a la presencia de moléculas absorbidas en la superficie de las NPs.



Tomando ventaja de esta propiedad, han surgido varios conceptos de sensores para detectar moléculas simples y biomoléculas. Estos se basan en la cuantificación del cambio de la frecuencia de resonancia de LSPR provocado por un cambio en el ambiente dieléctrico de las NPs cuando una molécula es absorbida en su superficie<sup>8</sup>.

Cuando un haz de luz incide sobre una molécula, parte de esa luz se dispersa y parte es remitida por la molécula. A través del espectro de emisión, las moléculas pueden ser identificadas ya que este difiere de una molécula a otra, en otras palabras, el espectro de una molécula es como su huella dactilar. Desafortunadamente, la señal de moléculas individuales pequeñas es difícil de detectar. Sin embargo, cuando las moléculas están adsorbidas sobre la superficie de las NPs metálicas el espectro de emisión aumenta de 10 a 15 órdenes de magnitud. Tomando ventaja de esta propiedad, Das y colaboradores<sup>11</sup> y Quian y colaboradores<sup>12</sup> funcionalizaron AgNPs con marcadores y anticuerpos que se unen a receptores en células tumorales. Después, excitando los marcadores con un láser con una longitud en el infrarrojo cercano, pudieron localizar e identificar tumores pequeños de forma no invasiva usando la espectroscopia de Raman.

Por otro lado, las nanopartículas de plata están acumulando interés ya que es bien conocido que la plata puede actuar como agente antibacteriano. Es ampliamente aceptado que el efecto antibacteriano es mediado por su oxidación parcial y liberación de iones de plata. Los iones de plata interactúan con la pared celular de péptidoglicanos y la membrana plasmática, causando lisis celular; interfiriendo con la replicación del DNA e inhibiendo la síntesis de proteínas. Las nanopartículas de plata han estado en el mercado por años; por ejemplo, la industria del vestido incorpora nanopartículas en las fábricas y explotar su

actividad antibacteriana para neutralizar la formación de olores generados por bacterias<sup>13</sup>. Además, nanopartículas de plata han sido integradas en materiales que tienen contacto con alimentos, plásticos usados para fabricar contenedores de alimentos y superficies de refrigeradores con el pretexto de preservar los alimentos por más tiempo previniendo la formación de microorganismos<sup>13</sup>.

Las nanopartículas de plata también han sido usadas en la industria médica, la Sulfadiazina de plata es ampliamente usada en el tratamiento tópico de pacientes con quemaduras. Hay productos disponibles comercialmente que contienen AgNPs como Acticioat<sup>TM</sup>, Silverline, SilvaSorb, y ON-Q SilverSoaker<sup>TM</sup> con propiedades antibacterianas y como potentes desinflamatorios. Actualmente, se investiga el uso de nanopartículas de plata en diversos accesorios médicos por ejemplo; implantes cardiovasculares como válvulas del corazón son recubiertas con AgNPs para reducir o evitar la colonización de bacterias en la válvula, y así reducir la inflamación del corazón que es provocada por infecciones bacterianas. También, se investiga el uso de AgNPs como recubrimiento en catéteres con la finalidad de evitar la colonización de bacterias. Estudios prolongados en ratones muestran que no hay efectos tóxicos debido al recubrimiento de AgNPs. De igual forma se plantea usarlos en aplicaciones odontológicas, por ejemplo, se han sintetizado cementos para prótesis dentales con AgNPs como aditivos antibacteriales, y se ha visto la colonización de bacterias es menor comparada con cementos convencionales<sup>13</sup>.

La toxicidad de NPs en humanos es un tema abierto ya que existen pocos estudios. Solo se tiene conocimiento de que las AgNPs tienen efectos nocivos en diferentes líneas celulares incluyendo NIH3T3 fibroblastos de ratón, THP-1 monocitos, BRL 3a células de hígado de

rata y C18-4 células germinales de ratón. Las evidencias sugieren que la citotoxicidad se debe a la interacción de NPs con la mitocondria y la inducción de apoptosis a través de la producción de especies reactivas del oxígeno lo que lleva a las células a la muerte<sup>13</sup>.

### **2.4.3 Nanocúmulos de plata**

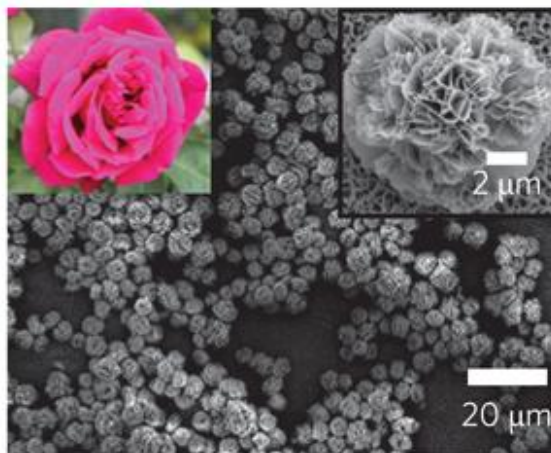
Los nanocúmulos metálicos (NCs) son estructuras que consisten de pocos a cientos de átomos y tienen tamaños inferiores a 2 nm, una característica relevante es que a pesar de su tamaño, interactúan con la luz y poseen espectros de absorción y emisión. Dentro de los varios NCs metálicos, los nanocúmulos de plata (AgNCs) son de especial interés, debido a su propiedad de fluorescencia, estabilidad y biocompatibilidad<sup>10,14</sup>.

### **2.4.4 Nanotubos de carbono**

Los Nanotubos de carbono (CNTs) recibieron un gran impulso tras la publicación de Sumio Iijima en 1991. Pueden verse como hojas de grafito enrolladas sobre sí mismas, formando estructuras cilíndricas huecas. Dependiendo de su estructura, se clasifican en dos tipos: nanotubos de capa simple (un tubo) y nanotubos de múltiples capas (varios tubos concéntricos). Ambos tienen de pocos a decenas de nanómetros de diámetro y de varios micrómetros a milímetros de longitud. Los CNTs son asumidos como importantes por sus propiedades químicas y físicas. Son fuertes mecánicamente (dureza cercana al diamante), presentan flexibilidad y son excelentes conductores. Sus aplicaciones son muy amplias: por ejemplo, en compuestos reforzados, sensores, nanoelectrónicos y pantallas<sup>15</sup>.

## 2.5 Nanomateriales híbridos

Como mencionamos en la introducción, los nanomateriales híbridos son materiales hechos de materiales orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, para nuestros fines una mejor definición es: un objeto construido usando componentes orgánicos para coordinar la nucleación, crecimiento, organización, y transformación de nanofases inorgánicas, para producir objetos discretos integrados o estructuras altamente ordenadas<sup>16</sup>. Uno de los ejemplos que mejor representa un material híbrido son las nanoflores sintetizadas por Ge y colaboradores (vea figura 2), ellos usaron proteínas globulares para sintetizar estructuras con forma de nanoflores a partir iones de cobre. El modelo propuesto para la formación de estos sistemas consiste en tres pasos: 1) Las moléculas de proteína forman complejos con los iones de cobre, en los cuales se inicia la nucleación para formar nanopartículas de cobre. 2) Los complejos (proteína/cobre) con nanopartículas interactúan entre ellos y forman una estructura de mayor complejidad con formas que recuerdan los pétalos de una rosa, la cual permite un mayor crecimiento de los cristales de cobre. 3) Finalmente, el crecimiento de las partículas resulta en una estructura que recuerda la arquitectura de una rosa<sup>2</sup>.



**Figura 2:** Imágenes SEM de nanoflores sintetizadas a partir de cobre y proteínas globulares<sup>2</sup>.

### **2.5.1 Síntesis de nanomateriales híbridos**

Se reconocen diferentes estrategias para sintetizar nanomateriales híbridos, sin embargo, dos son las más populares.

### **2.5.2 Ensamble usando plantillas nanoestructuradas.**

Esta se refiere a la conjugación de nanopartículas esféricas de diferente tamaño y composición con plantillas supramoleculares que actúan como plataforma central para controlar el acoplamiento de las nanopartículas. La especificidad entre las partículas y la plantilla se obtiene ligando moléculas orgánicas complementarias a la superficie de las nanopartículas y/o la plantilla, tal que los componentes se pueden unir (a través de reconocimiento molecular, interacciones electrostáticas o enlaces covalentes). Por ejemplo, Blum y colaboradores<sup>17</sup> funcionalizaron nanopartículas de oro con grupos maleimido, los cuales específicamente fueron enlazados covalentemente con los grupos tiol de los aminoácidos de cisteína expuestos en la superficie de la cápside del virus Cowpea Mosaic Virus (vea figura 3).

### **2.5.3 Síntesis usando plantillas nanoestructuradas.**

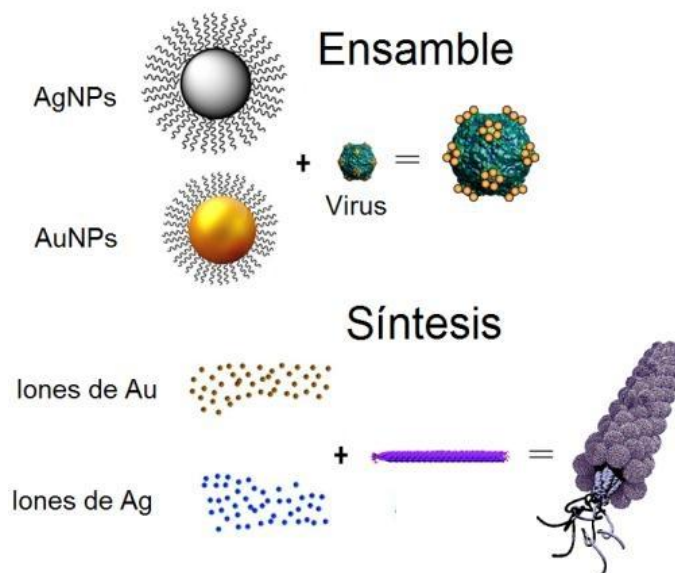
Esta se refiere al uso de plantillas orgánicas para coordinar la nucleación, crecimiento, organización, y transformación de las nanopartículas. La síntesis ocurre en solución acuosa bajo condiciones suaves de pH, fuerza iónica y a temperatura ambiente que favorecen la interacción específica de la fase inorgánica con la superficie orgánica, por lo tanto, la deposición inorgánica ocurre preferentemente a lo largo de la superficie accesible de la plantilla (vea figura 3). De forma práctica, es la unión subestequiométrica de iones metálicos a la superficie de la plantilla, después el depósito o cristalización es promovida

(químicamente). Este procedimiento es ampliamente usado para la sintetizar nanopartículas en la superficie de estructuras biológicas como cápsides virales. Por ejemplo, Bromley y colaboradores<sup>18</sup> incubaron iones de oro con la cápside de virus del mosaico del tabaco (TMV), después agregaron un agente reductor y bajo las condiciones adecuadas, lograron sintetizar nanopartículas de oro de tamaño homogéneo las cuales cubrieron uniformemente la superficie del TMV (Vea figura 3). La síntesis y deposición se basa en la complementariedad de carga entre los iones de oro ( $\text{Au}^+$ ) y los grupos funcionales presentes en la superficie de la plantilla (aminoácidos con carga positiva como lisina y arginina). En ambos casos la plantilla es quien guía y dirige la arquitectura final del sistema híbrido ya que las partículas son depositadas sobre la superficie accesible de la plantilla. Una de las limitantes del ensamble es que las nanopartículas y/o plantilla tienen que ser funcionalizadas con moléculas orgánicas para facilitar una interacción específica. En contraste, la síntesis se basa únicamente en la interacción entre los iones y los grupos funcionales presentes en la plantilla.

## **2.6 Síntesis de nanopartículas de plata**

Generalmente las nanopartículas de plata pueden ser preparadas y estabilizadas por métodos físicos y químicos. Uno de los métodos más ampliamente aceptados consiste en la reducción de iones de  $\text{Ag}^+$  en solución acuosa con agentes reductores como boro hidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), citrato de sodio, vitamina C, e hidrogeno elemental. Los agentes reductores llevan a la formación de átomos de plata  $\text{Ag}^0$ , los cuales se aglomeran en cúmulos oligoméricos que eventualmente llevan a la formación de partículas de Ag coloidal. En estos métodos y en general para los de fase acuosa, se requiere de agentes estabilizantes ya que una vez sintetizadas las nanopartículas se aglomeran y precipitan. Para evitar este

obstáculo, las NPs son funcionalizadas con moléculas orgánicas pequeñas, polímeros o biomoléculas que les otorgan estabilidad y evitan su agregación<sup>19</sup>.



**Figura 3:** Representación de las diferentes estrategias para sintetizar nanomateriales híbridos. Imagen modificada de<sup>17,18</sup>.

### 2.6.1 Síntesis de nanopartículas de plata por proteínas

Se sabe que las proteínas juegan el papel principal en la síntesis de nanopartículas en algunos organismos a través del proceso de biomineralización (vea punto 2.3), por lo tanto, el uso de proteínas en la síntesis in vitro de nanopartículas metálicas resultó un paso lógico. En este trabajo las proteínas tienen características que las hacen ideales para dirigir la síntesis y crecimiento de nanopartículas, son arquitecturas flexibles, tienen superficies activas químicamente, topologías y cavidades/huecos. Diferentes proteínas han sido usadas para investigar la síntesis de nanopartículas metálicas, donde su papel puede ser catalogado como activo e inactivo. En el proceso activo, las proteínas actúan como agente estabilizante

y agente reductor, en tanto que en el proceso inactivo, solo actúan como agente estabilizante y se usan reductores exógenos.

### **2.6.1.1 Proceso activo**

El poder reductor de las proteínas ha sido bien estudiado por Xie y colaboradores<sup>20</sup>. Usando una proteína extraída (proteína de algas, Pa) del alga verde *C. Vulgaris* demostraron los residuos de tirosina están involucrados en la reducción de los iones de plata. La evidencia se basa en el análisis de los espectros de fluorescencia y FTIR antes y después de la reacción de “Pa” con iones de plata. Los espectros de FTIR mostraron la pérdida de la señal del grupo fenólico de las tirosinas después de la reacción con los iones de plata, conjuntamente apareció la señal de estiramiento de un grupo carbonilo. Según los autores, la aparición de este pico representa la formación de un óxido fenólico resultado de la oxidación del grupo fenólico de la tirosina. Esto se corroboró analizando la fluorescencia de la tirosina, que es sensible a oxidación. Aquí, los espectros mostraron la pérdida de la fluorescencia después de la reacción de la proteína con los iones de plata. Además, confirmaron la habilidad reductora de los residuos de tirosina ya que cuando son acetilados por N-acetylimidazol el poder reductor de la proteína “Pa” se pierde y es recobrado cuando se remueve la modificación química. Además, de la tirosina se ha identificado al triptófano como elemento reductor para la formación de nanopartículas de plata. Se han sintetizado AgNPs empleando péptidos cortos con triptófano en condiciones alcalinas. Los resultados sugieren que bajo condiciones alcalinas los grupos indol son desprotonados, después los electrones son cedidos para la reducción de la plata, este proceso lleva a la formación del radical neutro triptófil, el cual eventualmente puede transformarse a triptófano nativo o formar el dímero di triptófano o adoptar la forma quinurenina<sup>21</sup>.



Como mencionamos, las cadenas laterales de los aminoácidos tirosina y triptófano están relacionadas con la reducción de los iones de plata. Sin embargo, hay evidencias de que las amidas presentes en la cadena principal de los péptidos también están involucradas en la reducción de la plata. Estas afirmaciones se basan en espectros de FTIR, ya que después de la reacción con iones de plata, las proteínas extraídas de *Capsicum annum L.* muestran la ausencia de la señal de torsión del grupo NH, indicando una relación entre la reducción de la plata y la oxidación de la amida<sup>22</sup>. En el proceso activo, la proteína actúa como reductor y estabilizante. Los ejemplos anteriores muestran el poder reductor de sus cadenas laterales. La proteína como polímero cubre las partículas y les dan estabilidad, evitan su aglomeración y su precipitación. Una de las desventajas de este método es el poco control que se tiene de la partícula final.

#### **2.6.1.2 Proceso inactivo**

En la naturaleza, la mayoría de las proteínas que forman ensamblajes supramoleculares no tienen la capacidad de biomineralizar, pero tienen geometrías únicas y “cadenas laterales cargadas positiva o negativamente” que funcionan como sitios de unión a metales que pueden ser explotadas en la síntesis de nanopartículas metálicas. En el proceso inactivo las proteínas actúan como plataforma de unión a iones metálicos y el poder reductor proviene de reductores químicos o físicos. Está bien documentado que aminoácidos con carga negativa como ácido glutámico (Glu) y ácido aspártico (Asp) participan en la síntesis inactiva de nanopartículas de plata. Nam y colaboradores<sup>23</sup> proponen que el ácido glutámico y aspártico expuestos al solvente se coordinan con los iones de plata a través de los grupos carboxílicos, mencionan que al formarse el complejo ( $\text{Ag}^+ - \text{COO}^-$ ) la barrera de energía de reducción de los iones disminuye comparada con la de los iones de plata solos.

También mencionan que los aminoácidos permiten una alta concentración local, lo cual es favorable para su reducción. Recientemente Roy y Banerjee<sup>23</sup> reportaron Fmoc-fenilalanina forma un hidrogel estable capaz de reducir nanopartículas de plata en la presencia de un agente reductor. Proponen la formación es debido a la formación de complejo  $\text{Ag}^+ - \text{COO}^-$ . Adhikari y Banerjee<sup>23</sup> reportaron que péptidos cortos de valina y ácido aspártico pueden formar nanoalambres de plata. Guo e Irudayaraj<sup>24</sup> usaron la proteína albumina de suero bovino y borohidruro de sodio para la síntesis de nanocúmulos de plata. En un trabajo similar pero usando la proteína lisozima desnaturalizada, Zhou y colaboradores<sup>25</sup> lograron sintetizar nanopartículas de 1.5 nm de diámetro.

Además de proteínas globulares, se han utilizado estructuras supramoleculares como plantillas para sintetizar y organizar nanopartículas de plata, tomando ventaja de aminoácidos con carga negativa. Como resultado las dimensiones físicas y características de la plantilla se preservan en la estructura final. Por ejemplo; se han sintetizado NPs dentro de la cavidad de la proteína ferritina, las partículas resultantes conservan las dimensiones de la cavidad, el control en el tamaño final de las NPs se debe a que la proteína actúa como un recipiente de síntesis para constreñir una reacción. La superficie externa de ensamblajes supramoleculares también ha sido empleada para la fabricación de nanotubos y nanolambres de plata. Eisele y colaboradores<sup>26</sup> emplearon nanotubos ensamblados de surfactantes anfipáticos como plantillas para sintetizar nanolambres con altas relaciones de aspecto dentro de la cavidad de los nanotubos. Yu y colaboradores<sup>27</sup> utilizaron nanotubos ensamblados de péptidos anfipáticos cortos como plantillas para sintetizar nanopartículas de plata. Ellos obtuvieron nanotubos densamente cubiertos con nanopartículas de plata con forma poligonal. Cápsidas virales helicoidales también han sido

usadas como plantillas para la síntesis de nanopartículas de plata, por ejemplo; Dujardin y colaboradores<sup>28</sup> utilizaron cápsides del virus del mosaico del tabaco (TMV) para sintetizar y organizar arreglos lineales de nanopartículas discretas. Ellos sintetizaron nanopartículas en la cavidad interna de la cápside viral empleando luz UV como agente reductor, en contraste con un virus modificado de TMV, lograron sintetizar nanopartículas en la superficie externa de TMV. En otro estudio Reches y Gazit<sup>29</sup> usando péptidos cortos ensamblaron tubos y sintetizaron nanopartículas de plata dentro de la cavidad de los tubos, y a través de una degradación enzimática eliminaron la cubierta orgánica y obtuvieron nanoalambres de plata con un diámetro de alrededor de 20 nm. Kumara y colaboradores<sup>30</sup> demostraron que nanopartículas de plata pueden ser sintetizados y arreglados en la superficie externa de flagelos de *E. coli* como plantillas, ellos obtuvieron nanoalambres cubiertos homogéneamente con nanopartículas esféricas. Además, de los trabajos mencionados hay un gran número de reportes que mencionan la presencia de ácidos carboxílicos participan en la síntesis de AgNPs, sin embargo, su papel no ha sido bien elucidado.

## **2.7 Biomineralización**

Ya que la habilidad de organismos de usar biomoléculas para controlar la nucleación y crecimiento de biominerales ha servido como inspiración en la síntesis de materiales híbridos, resulta útil dar una revisión a este tema. La biomineralización engloba la extracción selectiva y uso de elementos del ambiente local y su incorporación en estructuras funcionales bajo un estricto control biológico<sup>31</sup>. Los organismos vivos son bien conocidos por explotar las propiedades de materiales amorfos y minerales cristalinos cuando construyen materiales híbridos orgánicos-inorgánicos para una amplia variedad de

propósitos; navegación, soporte mecánico, fotónica y protección de partes blandas del cuerpo. Ejemplos bien conocidos son los organismos biosilificantes como las algas unicelulares como diatomeas y radiolarios. Estos son endosimbiontes secundarios fotosintéticos que se encuentran en ambientes marinos y de agua dulce. Se sabe son los mayores productores de biosilicio en los océanos<sup>32</sup>. Estos usan la silicio para construir sus paredes celulares y microesqueleto los cuales son modelados a escala micro y nano. La formación de silicio ocurre en un órgano especializado llamado vesícula de depósito de silicio.

Otro ejemplo interesante es el esqueleto de la esponjas cristalina *Euplectella* que habitan en océanos a profundidades de entre 35 a 5000m. El esqueleto mineralizado de *E. aspergillum* es soportado por alambres de vidrio que se interconectan para formar una malla cilíndrica, esta malla tiene propiedades mecánicas que sobrepasan las del vidrio convencional. Otra clase de minerales producidos por organismos son los óxidos de hierro, estos se usan para diversas funciones tales como almacenamiento de hierro, navegación, detección de campos magnéticos, y reforzamiento de tejidos y dientes. Por ejemplo, la bacteria magnetotáctica produce nanopartículas de magnetita o greigite, las cuales usa para navegar a través de campos magnéticos en ambientes acuáticos. Los nanocristales están alineados en una cadena intracelular donde cada cristal se encuentra en un compartimiento especializado denominado magnetosoma. Finalmente, hay un gran número de organismos que usan carbonato de calcio para producir estructuras con fines estructurales y de defensa. Por ejemplo, los erizos de mar sintetizan espinas para su defensa, los moluscos sintetizan conchas con fines estructurales, los crustáceos sintetizan caparazones con fines estructurales y de defensa<sup>33</sup>. Los minerales biogénicos presentan un control fino en su

morfología, hábitos cristalinos, composición, estructura y tamaño que resulta en materiales con propiedades fascinantes que contrastan con aquellos minerales análogos de origen geológico y sintético.

A pesar de que no se tiene un conocimiento detallado sobre los diferentes mecanismos que llevan a la formación de minerales biogénicos, se han identificado diferentes parámetros que controlan la mineralización: a) Control químico (control sobre la composición iónica y de biomoléculas especializadas). b) Control espacial (el mineral es formado en un espacio delimitado donde los iones y moléculas son transportados selectivamente, por lo tanto hay un control sobre la química y cinética de crecimiento del cristal). c) Control estructural (es cuando un molde orgánico funcionalizado con grupos químicos activos moldea la mineralización). d) Control morfológico (es el control de la morfología ejercida por la precipitación del mineral dentro de un espacio cerrado). e) Control construccional (es cuando estructuras jerárquicas se producen del ensamble de ladrillos basados en minerales)<sup>31</sup>.

## **3. Hipótesis y objetivos**

### **3.1 Hipótesis**

El uso de estructuras virales supramoleculares permite sintetizar nanomateriales híbridos, mediante la formación de nanopartículas de plata.

### **3.2 Objetivo**

Preparar y caracterizar nanobjetos híbridos usando como plantillas proteínas o estructuras supramoleculares de proteínas virales.

### **3.3 Objetivos específicos**

**3.3.1** Caracterizar mediante técnicas de microscopia de barrido por sonda la albumina de suero humano, las esferas y anillos generados a partir del virus del mosaico del tabaco y los tubos ensamblados a partir de la proteína VP6, estructuras biológicas supramoleculares que serán utilizadas como platillas para la fabricación de nanobjetos híbridos.

**3.3.2** Establecer las condiciones de reacción para lograr la funcionalización de las plantillas biológicas con nanopartículas de plata.

**3.3.3** Realizar la caracterización de los objetos híbridos formados por la funcionalización de las plantillas biológicas con nanopartículas de plata mediante técnicas de espectroscopia de absorción UV-vis, espectroscopia infrarroja, de microscopía electrónica, microscopía electrónica de barrido, microscopia de fuerza atómica y de efecto túnel, así como dispersión dinámica de luz.

## **4. Materiales y métodos**

En este capítulo damos una breve introducción a las biomoléculas empleadas como plantillas y a las técnicas empleadas para caracterizar los materiales híbridos.

### **4.1 Síntesis de nanomateriales híbridos**

Como se mencionó en la introducción en este trabajo se seleccionaron estructuras con geometrías que divergen, con la finalidad de mostrar el gran alcance del uso de plantillas biológicas para obtener arreglos en forma programada de nanopartículas de plata. En la síntesis de los materiales híbridos empleamos las biomoléculas: albumina de suero humano (HSA), virus del mosaico del tabaco y la proteína viral VP6. En particular, HSA es una proteína modelo ampliamente usada, en los sistemas biológicos es el principal constituyente proteico del sistema circulatorio<sup>34</sup>, tiene funciones fisiológicas importantes como el transporte de una amplia variedad de biomoléculas hidrófobas y moléculas inorgánicas como metales<sup>35</sup>. En el área de materiales, la HSA es ampliamente usada para dispersar materiales de carbono y además se emplea como plantilla en la síntesis de nanopartículas y nanocúmulos de plata<sup>36</sup>.

El virus del mosaico del tabaco (TMV) es la plantilla modelo en nanotecnología, es ampliamente usado en la síntesis de nanoalambres metálicos<sup>26</sup>. Desde el surgimiento de TMV como plantilla y hasta la fecha el virus se usa en su forma nativa (forma de tubo), sin embargo, cuenta con un polimorfismo que ha sido poco valorado. TMV puede ser moldeado para formar esperas y toroides, estructuras altamente estables, con geometrías divergentes y con una redistribución espacial de aminoácidos con carga negativa. Estas

características son empleadas para formar diferentes materiales híbridos a partir de la una estructura inicial. Finalmente, también utilizamos tubos de la proteína VP6 (proteína de la cubierta de rotavirus) para sintetizar nanoalmbres de plata debido a que es bien sabido la proteína VP6 tiene sitios de unión a diversos metales como oro y plata<sup>37</sup>.

Como mencionamos en el proceso inactivo se requiere de un agente reductor externo para facilitar la síntesis de nanopartículas de plata, en este trabajo se usó borohidruro de sodio en HSA y las estructuras polimórficas de TMV, mientras que se usó acetato de plata en el caso de VP6. Las condiciones particulares se indicaron en la metodología de cada caso.

## **4.2 Caracterización de nanomateriales híbridos.**

La caracterización de los materiales híbridos es esencial para elucidar sus características estructurales, la interacción entre ellos y sus propiedades. En este apartado mencionamos las herramientas empleadas para su caracterización.

### **4.2.1 Espectrometría ultravioleta-visible.**

La espectrometría ultravioleta-visible (UV-vis) implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y el ultravioleta (UV) cercano. En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas. Esta técnica se emplea para obtener información de la presencia de material biológico como proteínas, esto se debe a que aminoácidos aromáticos como triptófano (Trp), fenilalanina (Phe) y tirosina (Tyr) absorben a longitudes específicas, 279 nm, 274 nm y 258 nm respectivamente<sup>38</sup>. Por otro lado, como mencionamos en el apartado 2.4.2 en las nanopartículas los electrones libres pueden oscilar y absorber radiación



electromagnética a ciertas longitudes en el espectro ultravioleta-visible<sup>14</sup>. La longitud e intensidad a la que absorben depende de factores como composición, tamaño, forma, grupos funcionales presentes, temperatura y del solvente en el que se encuentran dispersas. Esta técnica es ampliamente usada porque da información rápida de concentración. Tamaño y forma de las nanopartículas de plata<sup>14</sup>.

#### **4.2.2 La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier**

La espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético. Esta se usa para identificar un compuesto o elucidar la composición de una muestra. En el área biológica es una técnica que permite analizar rápidamente cambios conformacionales en biomoléculas como proteína<sup>20</sup>.

#### **4.2.3 Microscopias electrónicas.**

Las técnicas microscópicas son ampliamente utilizadas para caracterizar nanopartículas metálicas. Estas técnicas pueden dar información precisa de la forma y tamaño de los materiales. La microscopia electrónica de barrido (SEM) permite la visualización de nanomateriales a grandes dimensiones, se puede obtener información de su distribución y características a macroescala. La microscopia electrónica de transmisión (TEM) arroja la información más precisa de tamaño y forma de nanopartículas individuales, además permite visualizar la cristalinidad de las partículas<sup>39</sup>.

#### **4.2.4 Microscopía de barrido por sonda.**

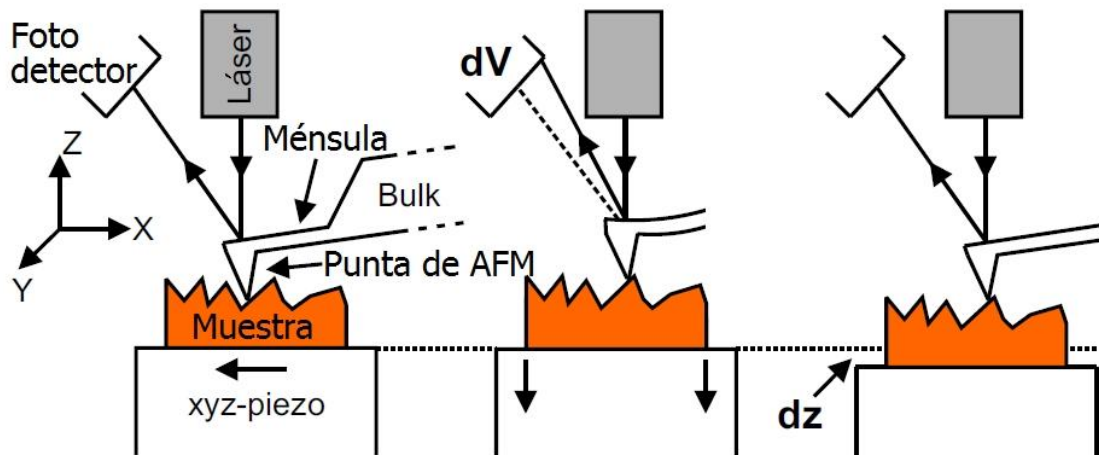
La búsqueda de mejores técnicas para caracterizar las superficies inspiró la invención de la microscopía de barrido por sonda, que incluye la microscopía de efecto túnel (STM) y la microscopía de fuerza atómica (AFM). El STM fue desarrollado en los años 80 y alcanzó su madurez 10 años después. Puede alcanzar una resolución, lateral y vertical de 0.1 nm y 0.01 nm respectivamente, lo cual ha permitido observar el arreglo atómico de un gran número de materiales. El AFM se inventó 5 años después, ambos STM y AFM son producto del trabajo de Gerald Binnig y Heinrich Rohrer cuando trabajaban en la división de investigación de la compañía IBM en los laboratorios de Zúrich. En un principio los microscopios se pensaron para caracterizar la superficie de materiales, pero la creatividad de los investigadores produjo el desarrollo de nuevos modos de operación, por ejemplo; pueden trabajar en una gran variedad de condiciones controladas (líquidos, baja y altas temperaturas, campos magnéticos solo por mencionar algunos) y más importante, cuando las puntas son modificadas el número de aplicaciones biológicas y químicas se incrementa. Con todas esas características hacen de la microscopía de barrido por sonda una poderosa herramienta de trabajo. En nuestra tesis emplearemos la microscopía de fuerza atómica y de efecto túnel para analizar la topografía de nuestros materiales unidimensionales<sup>40,41</sup>.

La invención del microscopio de barrido de efecto de túnel (STM) y del microscopio de fuerza atómica (AFM) fue seguida por un rápido desarrollo de nuevas técnicas para ver y analizar superficies (fuerza magnética y mediciones de fricción entre muchas otras). Los microscopios de barrido por sonda (SPM) son usados en todos los campos, pasando desde semiconductores físicos a ciencias de la vida. La idea para los todos los SPM es muy simple: una muestra es puesta sobre un cristal piezoresistivo que es deformado con una

precisión de sub angstroms ( $\text{\AA}$ ) en sus tres dimensiones por la aplicación de un voltaje para cada dirección. En combinación con puntas de SPM tan agudas que tienen un simple átomo en su ápice, es posible investigar átomos simples o moléculas en toda clase de superficies con diferentes métodos. Los SPMs difieren en los parámetros que usan para detectar la distancia entre la punta y la muestra. Para la operación del STM un pequeño voltaje es aplicado entre la punta del microscopio y la muestra, aquí la corriente de túnel es medida. Debido a que la corriente es muy sensible a la distancia entre la punta y la muestra, esta puede ser usada como un parámetro de retroalimentación para obtener imágenes topográficas. Sin embargo, el requisito de la corriente de túnel limita el STM a superficies conductoras. Esa limitante fue superada con la invención del microscopio de fuerza atómica. La principal diferencia entre el STM y el AFM es el parámetro usado para medir la interacción entre la punta y la muestra. Un AFM opera en la siguiente forma: la punta de AFM está en contacto directo con la muestra y mide la fuerza entre la muestra y la punta. Comparado con el STM, esta aproximación alternativa para la retroalimentación es una gran ventaja para el AFM, ya que permite la investigación de toda clase de materiales desde aislantes hasta células vivas. Debido a esas habilidades, el AFM se convirtió en una de las herramientas más importantes para el análisis de superficies, en investigación y aplicaciones industriales.

Hay diferentes modos de trabajo para investigar una superficie con una punta de AFM, los denominados de contacto, no contacto y contacto intermitente. La figura 4 es una imagen esquemática de los componentes básicos de un microscopio de fuerza atómica. La punta de un AFM consiste de una ménsula que soporta una punta. La ménsula está conectada a un chip que es necesario para el manejo de las puntas de AFM con pinzas. Normalmente, el

sistema completo consistiendo de una punta, ménsula, y chip es fabricado del mismo material, comúnmente silicio. En un esquema simple, la ménsula es descrita como un resorte laminar con una constante elástica  $k$ . En el modo de contacto, una fuerza constante  $F_c$  es aplicada entre la punta y la superficie durante el barrido de la superficie con un  $xyz$  cristal piezoresistivo (Piezo). El proceso se esquematiza en la figura 4. Con la constante elástica  $k$  de la ménsula la fuerza  $F_c$  es fácilmente calculada con la ley de Hooke:  $F_c = k\Delta z$ , donde  $\Delta z$  es la deflexión de la ménsula fuera de equilibrio.



**Figura 4:** Dibujo esquemático de un AFM. Este consiste en una punta, un cristal piezoresistivo  $xyz$ , foto detector y un láser<sup>42</sup>.

El circuito de retroalimentación mide la fuerza de contacto entre la punta y la superficie con la ayuda de un láser que es enfocado sobre la punta. El haz del láser es reflejado de la superficie de la ménsula y sobre en un foto detector. La deflexión y en consecuencia el cambio de la fuerza de contacto es monitoreando midiendo la variación del voltaje  $dV$  en el detector (figura 4). La información de la altura es obtenida registrando los voltajes

aplicados al  $xyz$  piezo, los cuales son necesarios para mantener la señal del fotodetector constante. Finalmente, la topografía de la muestra es visualizada por la conversión del voltaje aplicado al  $z$  piezo en información de altura  $dz$  y graficando el arreglo de datos en imágenes codificadas por color. En modo de contacto intermitente trabaja en forma similar, sin embargo, la ménsula es puesta a oscilar a una frecuencia dada y el circuito de retroalimentación mide el cambio de la amplitud de oscilación. Este método tiene ventajas sobre el modo de contacto, ya que la punta mantiene un contacto intermitente con la superficie por consiguiente las fuerzas que pueden alterar o re arreglar la muestra durante el barrido son reducidas o eliminadas<sup>42</sup>.

### **4.3 Análisis teórico**

La interface proteínas-nanopartículas de plata es de gran importancia desde el campo biológico como en ciencia materiales<sup>43</sup>. En particular la interacción puede ocasionar desde cambios conformacionales, desestabilizantes, desnaturalización de proteínas o cambios en la actividad de enzimas. Por otro lado, las biomoléculas también pueden promover cambios en las nanopartículas, por ejemplo; oxidación, reducción, promover cambios en tamaño y forma. El estudio atomístico de la interacción entre los aminoácidos glutámico (Glu) y aspártico (Asp) con AgNPs puede dar información del fenómeno que ocurre con proteínas. En este trabajo se empleó la teoría del funcional de la densidad (DFT) para analizar la interacción de Asp y Glu con un cúmulo de plata de cuatro átomos Ag<sub>4</sub>. La teoría DFT representa una herramienta eficiente para estudiar sistemas complejos como el planteado. Esta ha sido anteriormente para estudiar la interacción entre aminoácidos y nanopartículas de oro, cobre y plata<sup>23</sup>.

## **5. Síntesis de nanocúmulos de plata dirigida por albumina de suero humano.**

### **5.1 Introducción**

Los nanocúmulos metálicos de plata (AgNCs) están constituidos de pocos a cientos de átomos ( $\leq 100$  átomos) y sus tamaños son inferiores a 2 nm. Debido a su tamaño, los NCs tienen propiedades que son intermedias entre átomos y grandes nanopartículas. Los NCs a pesar de su tamaño interactúan con la luz y poseen espectros de absorción y emisión. Una de sus propiedades más interesantes es su fluorescencia y propiedades relacionadas como fotoestabilidad, amplios desplazamientos de Stokes y altas tasas de emisión<sup>10</sup>. Además, presentan una superficie altamente reactiva debido a su amplio porcentaje de átomos superficiales. Los AgNCs son sintetizados con frecuencia como sus grandes contrapartes (NPs), sin embargo se requieren condiciones experimentales adecuadas para abolir la aparición de grandes NPs ( $>2$  nm) y restringir su crecimiento a un número reducido de átomos. El uso de polímeros (dendrimeros y polímeros con tioles) con una fuerte interacción por los átomos metálicos es una forma efectiva de síntesis. Desafortunadamente los polímeros usados comúnmente son tóxicos para sistemas biológicos y tienen que ser conjugados con biomoléculas para otorgarles biocompatibilidad para aplicaciones biomédicas<sup>14</sup>. Actualmente, la síntesis de AgNCs mediada por proteínas se está popularizando, ya que las proteínas tienen la habilidad de secuestrar iones metálicos. Por esta razón se usan como plantillas para concentrar, estabilizar y dispersar nanocúmulos metálicos en soluciones acuosas, además les otorgan biocompatibilidad. Un número de proteínas como albumina de suero bovino, insulina y lisozima se han usado en la preparación de NCs<sup>44,45,25</sup>.

Debido a sus propiedades fisicoquímicas y tamaño subnanométrico, los NCs han sido explorados en ciencias básicas y aplicaciones tecnológicas. Estas varían desde sensores químicos, fotografía, catálisis, sondas fluorescentes en bioimagen, biomedicina, sensores y seguridad<sup>14</sup>.

Motivados en el hecho de que los AgNCs están atrayendo mucha atención, en este capítulo sintetizamos AgNCs usando la proteína albumina sérica humana (HSA) como plantilla. Además, exploramos su uso como sondas fluorescentes para rastrear la biodistribución de nanotubos de carbono en células.

## **5.2 Materiales y métodos**

### **5.2.1 Materiales**

El Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), la proteína albumina de suero humana (HSA, Mw ~67 KDa) y boro hidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) e hidróxido de potasio (KOH) se obtuvieron de sigma-Aldrich. Todos los reactivos se usaron como se recibieron. En todos los experimentos se usó agua desionizada (18.2 M $\Omega$ .cm) de un sistema de purificación Millipore. Los nanotubos de capa simple oxidados (SWCNTs, 95 % de pureza) se compraron de ILJIN Nanotech Co., Korea.

### **5.2.2 Síntesis de híbridos AgNCs/HSA**

El complejo AgNCs/HSA se preparó usando el procedimiento modificado de Mathew y colaboradores<sup>44</sup>. Brevemente, 100  $\mu\text{l}$  de una solución de albumina (50 mg/ml) se incubó con 100  $\mu\text{l}$  de nitrato de plata (1 mM) por 5 min, después el pH de la solución se ajustó a 12 con hidróxido de sodio (1 M) y se dejó reposar por 5 min, por último se agregó 20  $\mu\text{l}$  de

boro hidruro de sodio (10 mM), vea Figura 5.

### **5.2.3 Formación de conjugados SWCNTs-AgNCs/HSA**

La formación de los conjugados se obtuvo a través el siguiente procedimiento: 1 ml (1 mg/ml) de nanotubos dispersos en agua destilada se mezcló con 1 ml (10 mg/ml) de nanocúmulos sintetizados previamente (AgNCs/HSA), se incubaron en ultrasonido por 15 min, para evitar el calentamiento de las muestras el agua se cambió constantemente. Después, los conjugados SWCNTs-AgNCs/HSA se centrifugaron durante 20 min a 16000 g, finalmente el sobrenadante se empleó en los análisis.

### **5.2.4 Caracterización UV-vis y FT-IR**

Las mediciones de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro Cary 100 UV-vis (Varian Inc., Palo Alto, CA). Para el análisis de FT-IR (Perkin Elmer, spectrum 100) soluciones de las muestras se secaron en frío (FreeZone, LABCONCO) y se analizaron en polvo.

### **5.2.5 Caracterización por microscopía**

Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) las muestras se prepararon depositando 5  $\mu$ l de la muestra en rejillas de cobre cubiertas con carbono (Ted Pella). Después de 60 segundos, el exceso de solución se eliminó usando papel filtro y se dejó secar durante la noche. Las muestras se analizaron usando un microscopio JEM-2010F FASTEM. Para el análisis de microscopía de fuerza atómica y de microscopía de efecto túnel se depositaron 100  $\mu$ l de las muestras sobre grafito pirolítico altamente ordenado (HOPG). Después de 15 min, el exceso de muestra se eliminó con



papel filtro. Finalmente, las muestras se lavaron con 1000  $\mu$ l de agua desionizada y se dejaron secar en vacío durante 2 h. El análisis de AFM se realizó en modo de contacto intermitente en condiciones ambientales, y se usaron puntas de silicio ( $F = 40$  N/m). En el análisis de STM se trabajó en el modo de corriente constante en condiciones ambientales y se usaron puntas de Pt/Ir cortadas manualmente. Para los análisis de AFM y STM se usó el microscopio JSPM-5200 de JEOL, Japón.

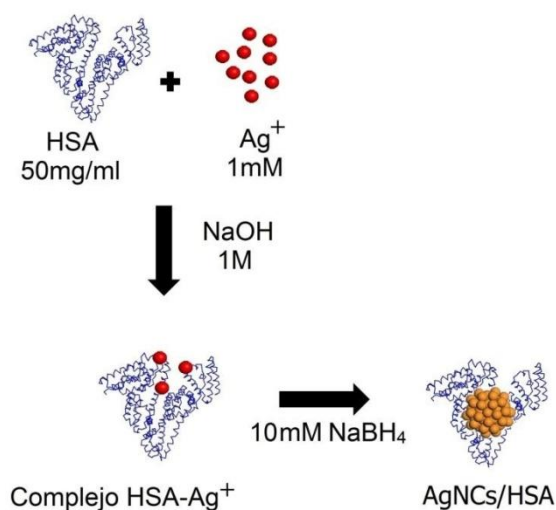


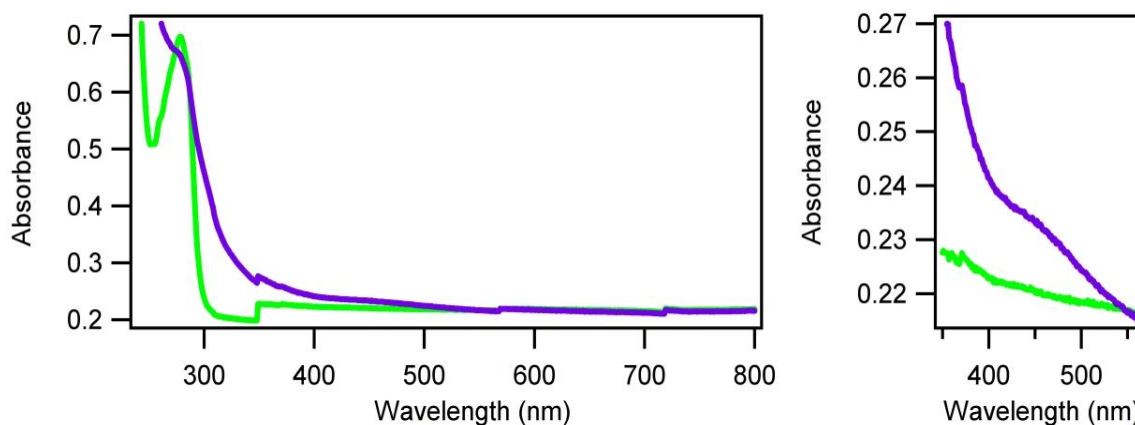
Figura 5: Ilustración esquemática del proceso de preparación de nanocúmulos de plata.

## 5.3 Resultados y discusión

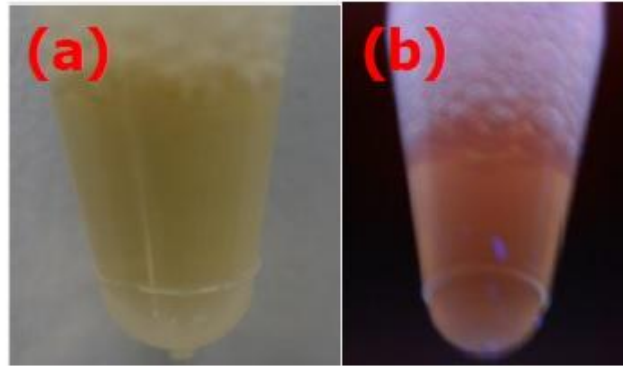
### 5.3.1 Análisis de nanocúmulos de plata

Los nanocúmulos (AgNCs/HSA) sintetizados se caracterizaron por espectroscopia de UV-visible. La figura 6 compara el espectro de absorción de HSA sola (línea verde) y el de los cúmulos de AgNCs/HSA preparados (línea morada). El espectro de absorción de HSA sola muestra un pico único centrado a 280 nm. Mientras que la naturaleza de absorción cambia cuando los nanocúmulos AgNCs/HSA se forman. Se observa un hombro amplio con un

máximo a 280 nm en lugar de un pico bien definido. Además, hay una joroba con un máximo de absorción a 450 nm (vea inserto en figura 6), esta característica no se observó en la HSA sola y se atribuye a los NCs. La absorción a 450 nm se debe al efecto de confinamiento cuántico y no a la resonancia plasmonica de superficie, la cual tiene una absorción característica a 425 nm para partículas grandes<sup>25</sup>. Los NCs sintetizados por otros métodos muestran picos de absorción con una mejor definición. En el caso de la síntesis de NCs con HSA, la poca definición del pico de absorción pudo deberse a que los cúmulos están bien encapsulados por la gran masa de la proteína<sup>44</sup>. Los nanocúmulos AgNCs/HSA mostraron luminiscencia bajo luz UV, la figura 7 muestra que la solución de nanocúmulos preparados bajo luz visible es de un color amarillo- café (a), en tanto que bajo luz UV a 365 nm muestra un brillo rojo (b).



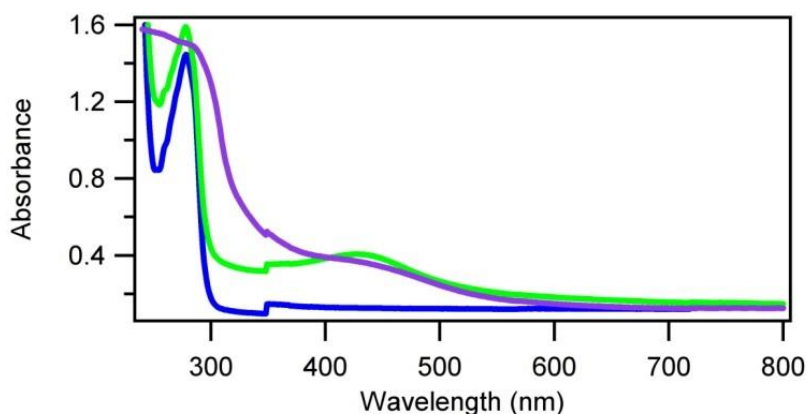
**Figura 6:** Perfiles de absorción de HSA (verde) y nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados (morado). Los perfiles de absorción para HSA sola difieren significativamente cuando los AgNCs/HSA se forman (ver ampliación).



**Figura 7:** Fotografías de AgNCs/HSA sintetizados bajo luz visible (a) y UV a 365 nm (b).

Una característica importante es que se requiere de un medio alcalino (pH 12) para lograr la síntesis de cúmulos, ya que en condiciones neutras se promueve la formación de nanopartículas con diámetros superiores a 2 nm. La figura 8 muestra el espectro de absorción de síntesis de nanocúmulos AgNCs/HSA bajo un pH neutro (línea verde), bajo condiciones básicas (línea morada) y el de albumina sola en condiciones neutras (línea azul). En condiciones neutras el espectro muestra una joroba a 425 nm que es característico para grandes partículas de plata, además, el pico de la albumina permanece centrado a 280 nm. El espectro de HSA muestra solo el pico a 280 nm, en tanto que en el espectro de los NCs sintetizados se observa un hombro con un máximo a 280 nm hay un incremento en la absorción  $< 280$  nm y una joroba pequeña a 208 nm. En el caso de las proteínas la espectroscopia del enlace peptídico, las cadenas laterales y grupos prostéticos determinan el espectro de UV-vis. Este se puede dividirse en regiones de UV cercana (250-300 nm) y lejanas (180-240 nm). La región cercana la describen los aminoácidos aromáticos (máximos de absorción de tirosina, triptófano y fenilalanina a 274, 279, y 258 nm respectivamente), mientras que la región lejana esta descrita por transiciones en el esqueleto de la proteína (desplazamiento de electrones libres en el enlace peptídico que

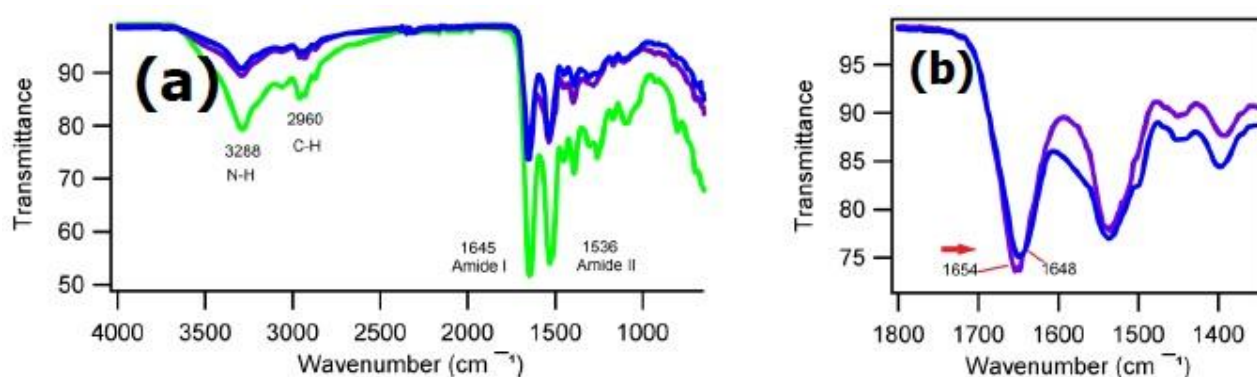
permiten transiciones de orbitales  $n \rightarrow \pi^*$  y  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Los cambios en el espectro de absorción como la aparición del hombro y el incremento en la región de  $< 260$  muestra que hay una perturbación en el microambiente alrededor del enlace peptídico en la proteína por tanto un cambio en el arreglo en la estructura terciaria, fenómeno que ha sido observado en proteínas absorbidas en superficies de carbono<sup>46</sup>.



**Figura 8:** Perfiles de absorción de HSA sola en pH neutro (azul) y nanopartículas de plata Ag/HSA (verde) y nanocúmulos sintetizados AgNCs/HSA (morado).

Los nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados se analizaron por FTIR, la figura 9 (a) muestra el espectro de la albumina sola (línea morada), el espectro de los nanocúmulos AgNCs/HSA (línea azul) y el de las nanopartículas que se forman si la síntesis se da en condiciones neutras (línea verdes). Los tres espectros muestran los picos de vibración característicos de proteínas, la vibración de la amida I en la región  $1600-1700 \text{ cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento de CO) y la banda de la amida II  $\sim 1536 \text{ cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento de C-N acoplada con el doblamiento de N-H), ambos picos tiene una relación con la estructura secundaria de las proteínas. Los picos localizados a  $3288$  y  $2960 \text{ cm}^{-1}$

corresponden a vibraciones de aminas primarias y C-H respectivamente. Es bien conocido que la banda de la amida I es más sensible al cambio en la estructura secundaria de proteínas. Analizando la región de la amida I en nanocúmulos y la HSA sola, observamos un ligero desplazamiento de  $1654\text{ cm}^{-1}$  hacia  $1648\text{ cm}^{-1}$  en el espectro de nanocúmulos metálicos (vea figura 9 (b)). Este desplazamiento es interpretado como cambios en la estructura secundaria de proteínas y se refiere a un incremento en el contenido de hojas beta en la proteína<sup>47</sup>.

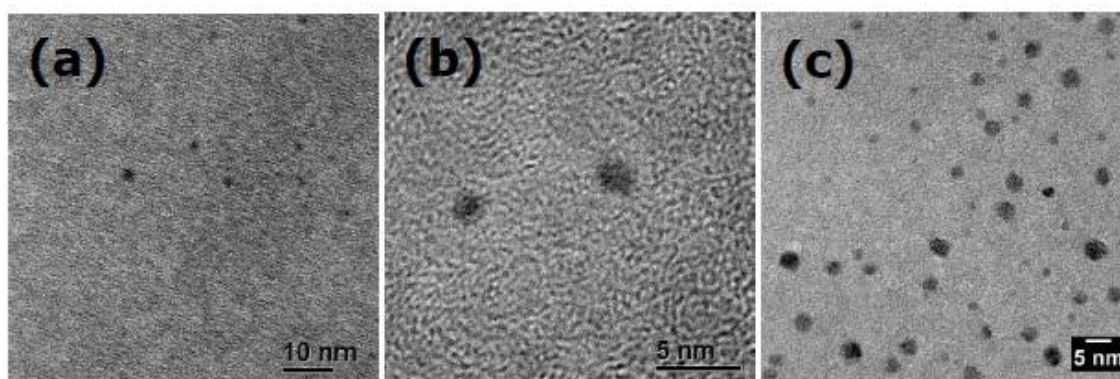


**Figura 9:** Espectro de FTIR de nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados (azul), albumina sérica humana sola (HSA) (morado) y nanopartículas de plata sintetizadas AgNPs (verde) (a). Magnificación de los espectros de nanocúmulos y HSA (b).

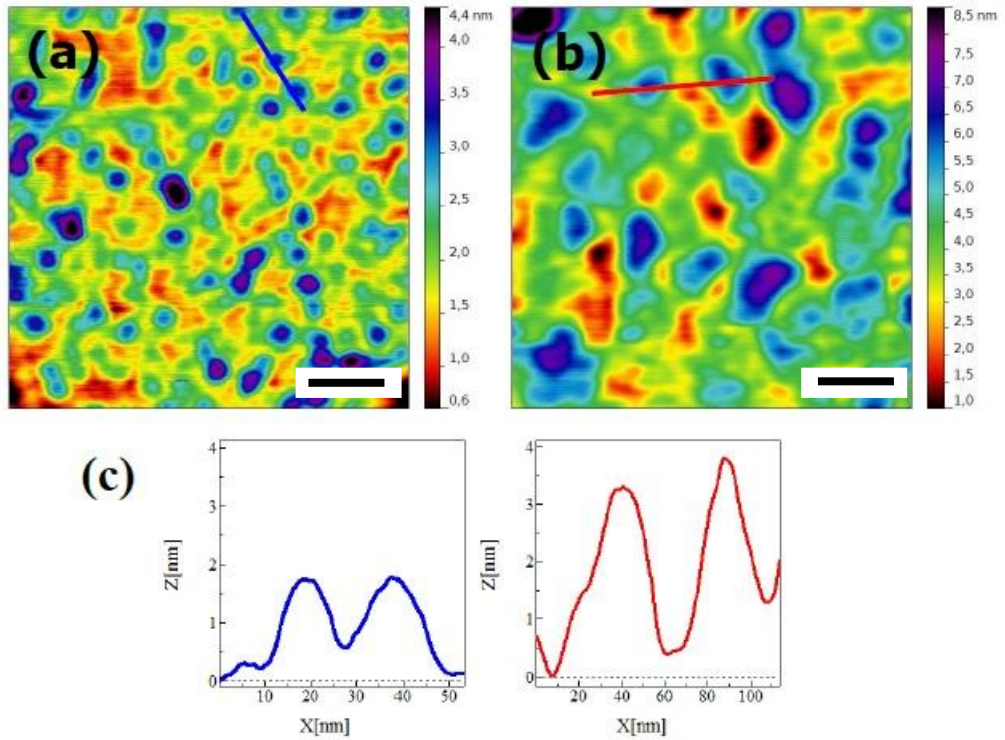
Los nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados se analizaron por HRTEM (figura 10). Las imágenes indican los cúmulos tienen una forma esférica con diámetros  $\leq 2\text{ nm}$  y se encuentran bien dispersos. La microscopía de alta resolución normalmente permite observar la estructura cristalina de nanopartículas metálicas. En nuestro caso esto no se observó, probablemente debido a que los cúmulos están bien protegidos por la cubierta de proteína. Una característica interesante fue la transformación gradual de los AgNCs en

nanopartículas cuando son expuestas al haz de electrones del microscopio TEM<sup>48</sup> por un periodo mayor a 15 min, las partículas alcanzan tamaños superiores a 10 nm, (vea figura 10 (c)).

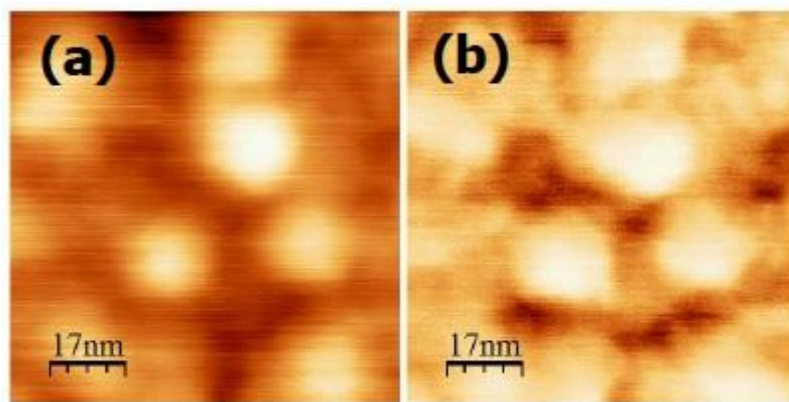
La microscopía de fuerza atómica es una técnica que permite caracterizar materiales a escala nanométrica. La figura 11 (a) muestra la topografía de la albumina sola, y los nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados se muestran en la figura 11 (b). En las imágenes de albumina sola, se observaron estructuras globulares con diferentes diámetros y alturas, sin embargo, estructuras con un tamaño de 10 nm de diámetro y con alturas de ~2 nm predominaron, en contraste las imágenes de los cúmulos sintetizados mostraron agregados con diámetros superiores a 10 nm y alturas superiores a los 3 nm. Las imágenes de fase muestran la diferencia entre distintos materiales, un material duro tendrá una fase diferente a la de un material suave, tomando en cuenta esta diferencia de fases esperábamos poder distinguir los nanocúmulos de la proteína, sin embargo, los análisis no mostraron diferencias (vea figura 12).



**Figura 10:** Imágenes TEM de nanocúmulos sintetizados AgNCs (a) y (b), además se muestra la transición de nanocúmulos a nanopartículas al ser irradiadas con el haz del TEM (c). Escala de barras, 10 nm (a) y 5 nm (b) y (c).

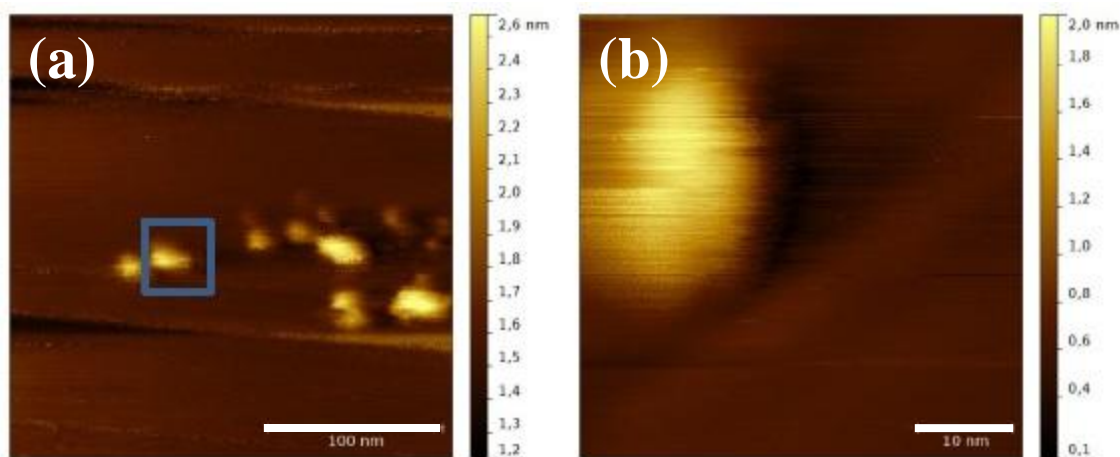


**Figura 11:** Imágenes de AFM de nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados. En (a) se muestra la albumina prístina, en tanto que en (b) se muestran los nanocúmulos sintetizados. En (c) se muestran los perfiles de las secciones indicadas en (a) y (b). Escala de barras, 50 nm (a) y (b).



**Figura 12:** Imágenes de AFM de nanocúmulos AgNCs/HSA sintetizados, en (a) se muestra la imagen de topografía y en (b) la imagen de fase. Escala de barras, 17 nm (a) y (b).

La microscopía de efecto túnel ha sido ampliamente usada para caracterizar biomoléculas a nivel molecular, en particular a permito caracterizar proteínas globulares en su estado nativo y desnaturizado<sup>49</sup>. Además, se ha demostrado que puede resolver el arreglo de cúmulos metálicos en metalotioneinas<sup>50</sup>. En la figura 13 se muestran imágenes STM de los nanocúmulos sintetizados AgNCs/HSA, las cuales revelaron estructuras globulares con tamaños heterogéneos, el tamaño y altura predominante fue de 15 nm y 1.5 nm respectivamente, dimensiones cercanas a las obtenidas por AFM. El arreglo y ubicación de los AgNCs en la proteína no se pudo resolver debido a que la proteína tiene un grado de desnaturización que promueve su agregación dificultando la observación de monómeros, por lo tanto el contenido de metal es menor comparado con la masa de los agregados a si impidiendo su resolución<sup>50</sup>.



**Figura 13:** Imagen de STM de nanocúmulos sintetizados. Escala de barras, 100 nm (a) y 10 nm (b).

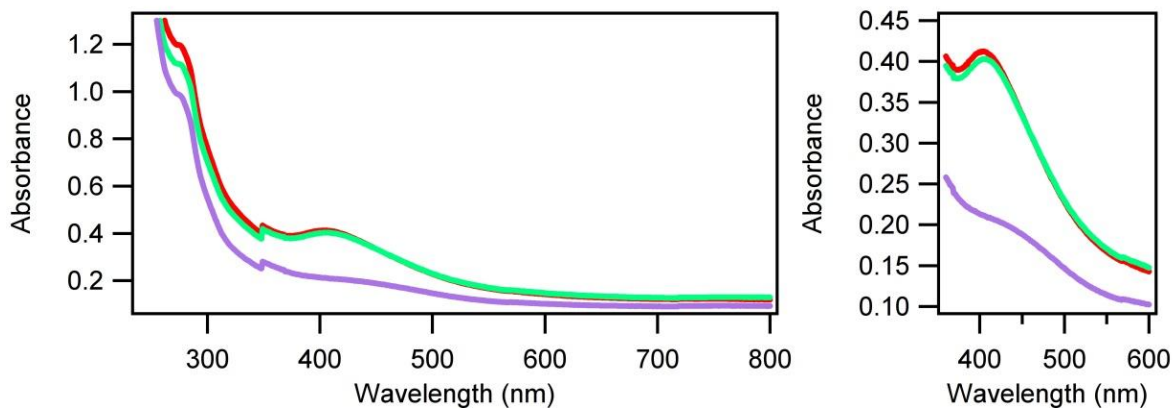


### 5.3.2 Conjugación de SWCNTs con nanocúmulos AgNCs/HSA

Debido al gran número de aplicaciones que se plantean para los nanocúmulos de plata en teragnosis (combinación de elementos de diagnóstico y terapia en un solo agente) es de gran importancia explorar su interacción con elementos de la sangre<sup>51</sup>. Con esta finalidad se analizó la interacción de los nanocúmulos generados usando la albumina de suero humano con glóbulos rojos; las células más comunes en sangre y principal transportador de oxígeno a los tejidos debido a que contienen la proteína hemoglobina. Sin embargo, debido a que se sabe que los nanocúmulos metálicos con una cubierta proteica no atraviesan las membranas celulares<sup>52</sup> se usaron nanotubos de carbono como nano vectores para forzar la translocación de los nanocúmulos a través de la membrana celular de los glóbulos, ya que se sabe los nanotubos atraviesan indiscriminadamente las barreras celulares<sup>53</sup>. Para nuestro conocimiento hasta la fecha no hay trabajos que traten la interacción entre conjugados SWNTs-AgNCs/HSA y glóbulos rojos.

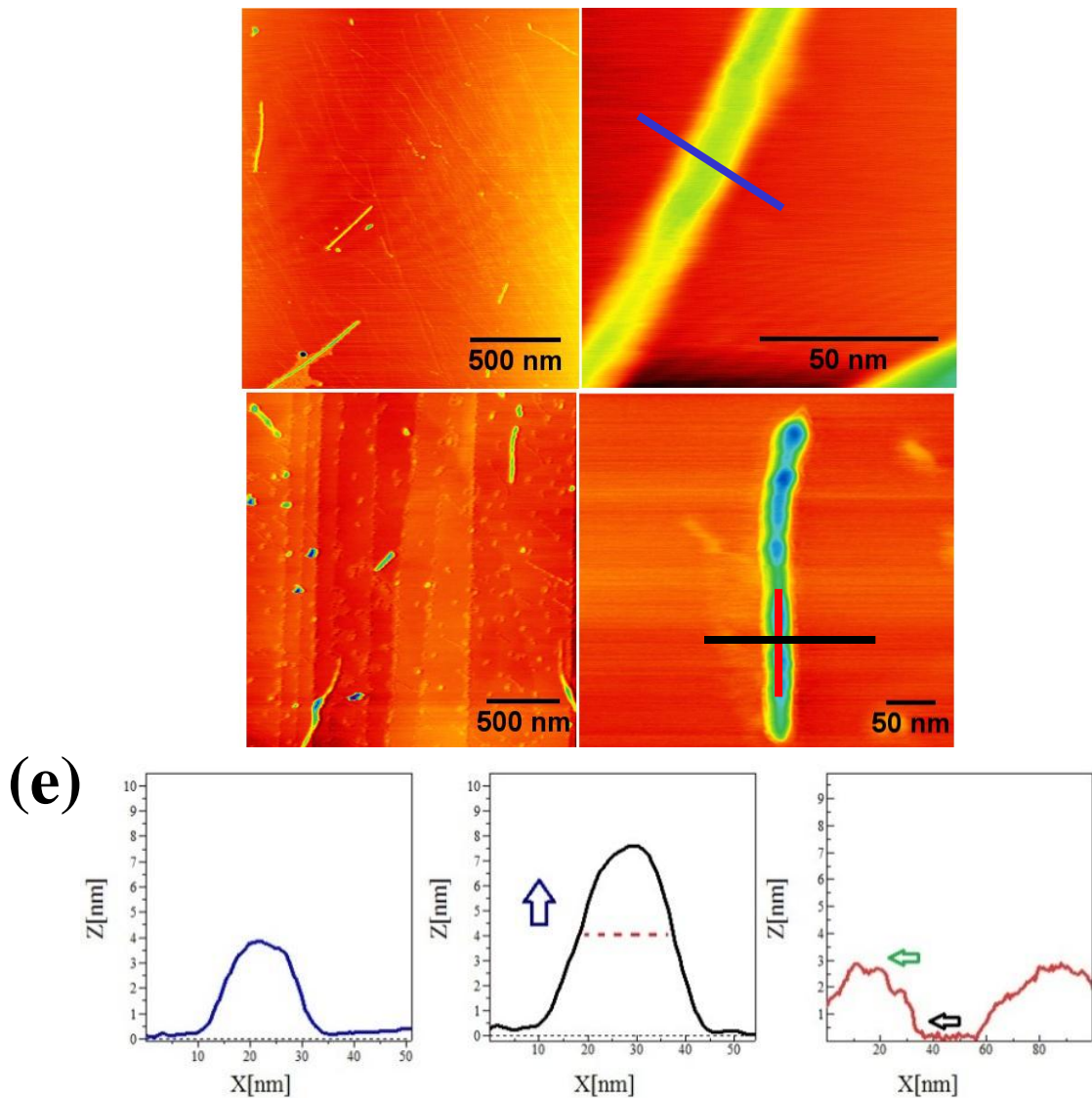
La figura 14 muestra los espectros de absorción de los conjugados SWNTs-AgNCs/HSA. Empleamos tres estrategias para formar los conjugados: **a)** una solución de SWCNTs y HSA en una relación 1:100 (W/W) se incubó durante 30 min en un baño de ultrasonido, después se dejó reposar durante 30 min, e inmediatamente después se agregó hidróxido de sodio para ajustar el pH a 12. Por último, se agregó borohidruro de sodio para iniciar la síntesis de los nanocúmulos. **b)** primero se sintetizaron los nanocúmulos AgNCs/HSA y después se incubaron con una solución de SWCNTs durante 30 min en un baño de ultrasonido (relación 1:100 (W/W)). Finalmente la síntesis **c)** denominada control fue como en el paso **a**, sin embargo, no se agregó hidróxido de sodio, por tanto la síntesis se llevó en condiciones neutras.

El espectro de los conjugados obtenidos por el método **a** mostro dos características importantes, un pico de absorción a 428 nm y otro a 278 nm, uno perteneciente a nanopartículas metálicas y otro a la proteína respectivamente (vea línea verde). En contraste el espectro de los conjugados obtenidos por el método **b** mostro una espectro amplio con una absorción máxima a 450 nm y un desplazamiento del máximo de la albumina hacia 290 nm (vea línea morada). El espectro del control **c** mostro características similares al método **a**, un pico a 428 nm y otro a 278 nm (vea línea roja). Los resultados muestran que se requiere de la síntesis previa de los NCs para obtener el conjugado. Es bien conocido que la adsorción de proteínas sobre la superficie de nanotubos de carbono puede provocar cambios en la estructura terciaria de las proteínas, en nuestro caso probablemente la HSA al ser adsorbida sobre los CNTs disminuye su movilidad y/o restringe aminoácidos o secuencias de aminoácidos necesarios para la formación de los nanocúmulos.



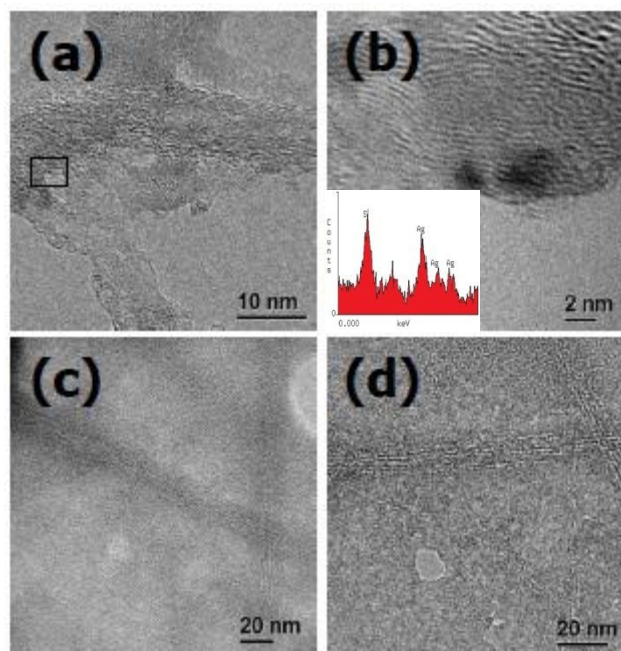
**Figura 14:** Espectros de absorción de los conjugados SWNTs-AgNCs/HSA.

El análisis de AFM se realizó para confirmar la adsorción de los cúmulos AgNCs/HSA sobre la superficie de los nanotubos de carbono. Comparando las imágenes de AFM de SWCNTs prístinos (Figura 15 (a) y (b)) con las de los conjugados SWNTs-AgNCs/HSA (Figura 15 (c) y (d)), es claro los nanocúmulos (vistos como parches) se adhieren a lo largo de la superficie de los tubos después de ser incubados. La primera característica que resalta es un incremento en el diámetro de los conjugados con respecto de los tubos prístinos, 20 nm y 15 nm respectivamente (vea perfil 1 y 2). Además, los nanotubos prístinos muestran una superficie homogénea, en contraste los conjugados tiene crestas y valles a lo largo de su superficie, los cuales corresponden a los nanocúmulos absorbidos y al CNTs respectivamente (vea perfil 3). Las crestas tuvieron alturas de alrededor de 3 nm, que corresponde con la altura obtenida por AFM para los cúmulos solos. Las características observadas en los conjugados concuerdan con estudios previos de adsorción de proteínas sobre nanotubos de carbono<sup>36</sup>.



**Figura 15:** Imágenes topográficas de AFM de nanotubos de carbono de capa simple (SWCNTs) prístinos (a) y (b) en (c) y (d) se muestran imágenes de los conjugados SWNTs-AgNCs/HSA. En E se muestran los perfiles la sección transversal de nanotubo prístino (vea flecha negra en (b)), perfil de la sección transversal del conjugado (flecha negra en (d)) y el perfil de la sección longitudinal del conjugado (flecha roja en (d)), vea graficas 1,2 y 3 respectivamente.

El análisis de HRTEM se realizó para confirmar la formación del conjugado SWNTs-AgNCs/HSA. La figura 16 (a) y (b) muestran imágenes de los conjugados, en estas se observa que sobre las paredes de los tubos hay una película irregular y sobre esta hay pequeñas partículas (vea figura 16 (b)). Las partículas tuvieron diámetros de alrededor de 2 nm, tamaño en concordancia con los cúmulos AgNCs/HSA solos. En adición el análisis elemental (EDS) mostro una pequeña señal de plata confirmando que las partículas son nanocúmulos de plata (inserto). Como control, dispersamos nanotubos de carbono con albumina de suero humano sola, las imágenes HRTEM mostraron que los nanotubos se encuentran embebidos en la albumina<sup>54</sup>.

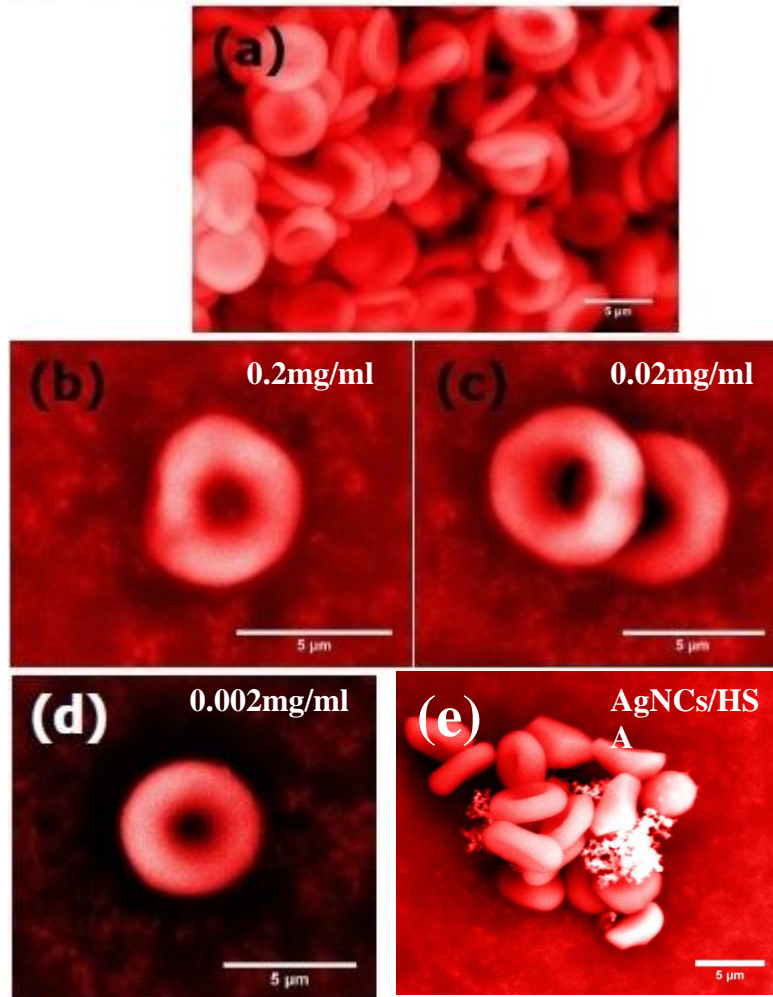


**Figura 16:** Imágenes HRTEM de conjugados SWNTs-AgNCs/HSA (a). En (b) se muestra un acercamiento a la región enmarcada en (a), además, el inserto muestra el análisis elemental. (c) y (d) muestran imágenes de SWCNTs funcionalizados solo con HSA. Escala de barras, 10 nm (a), 2 nm (b) y 20 nm (c) y (d).

### **5.3.3 Interacción de conjugados con glóbulos rojos.**

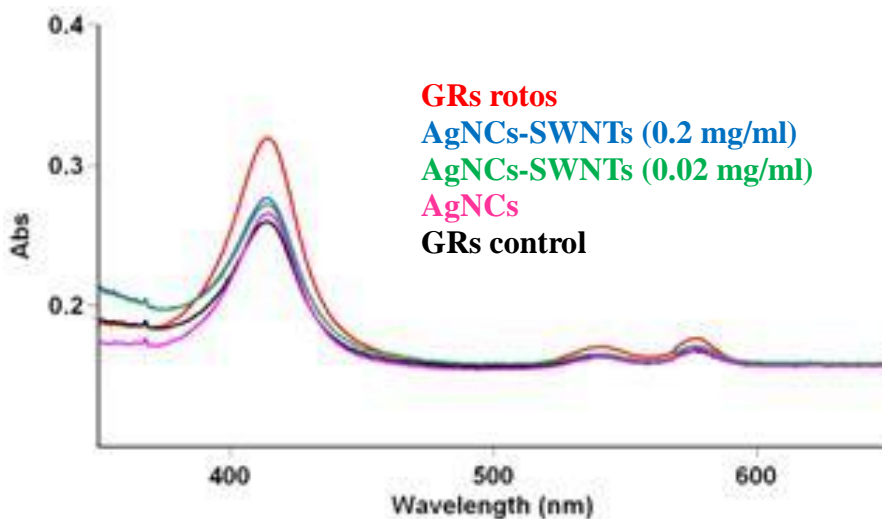
En este punto se analizó la biocompatibilidad de los conjugados con glóbulos rojos (RBCs). Se usó la microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar la integridad estructural de los glóbulos después de ser incubados con los conjugados. En las imágenes del grupo control los glóbulos mostraron la clásica apariencia de disco bicóncavo (figura 17 (a)). En contraste, los glóbulos incubados con los complejos (SWNTs-AgNCs/HSA) mostraron distorsiones en su estructura, la más destacada fue la presencia de un hoyo central en los glóbulos. La fragmentación de los glóbulos mantuvo una relación con el incremento de la concentración de los conjugados. A una mayor concentración de conjugados mayor fue el grado de fragmentación (figura 17 (b-d)).

Resulta interesante la ausencia de nanotubos sobre los glóbulos, la ausencia de CNTs se interpreta como un indicativo de los complejos atravesaron la barrera celular. La difusión se corroboró ya que cuando se incubaron los glóbulos con los AgNCs-HSA solos, se observó una gran cantidad de material sobre los glóbulos, indicando que los cúmulos no penetraron la membrana de los glóbulos debido a que cambios estructurales en la estructura nativa de la proteína impiden su internalización<sup>52</sup> (figura 17 (e)). Además los glóbulos no mostraron la presencia de hoyos, evidenciando que la fragmentación de los glóbulos ocurrió solo en los glóbulos expuestos a los conjugados. Los resultados de SEM mostraron que los conjugados producen cambios significativos en los glóbulos rojos, sugiriendo tienen cierto grado de citotoxicidad.



**Figura 17:** Imágenes SEM de glóbulos rojos expuestos a conjugados SWNTs-AgNCs/HSA. En (a) se muestra los glóbulos del grupo control, en (b) se muestran los glóbulos expuestos a los conjugados SWNTs-AgNCs/HSA a una concentración de 0.2 mg/ml, en tanto que en (c) y (d) se expusieron a concentraciones de 0.02 mg/ml y 0.02 mg/ml respectivamente. Finalmente en (d) se muestran los glóbulos expuestos a AgNCs/HSA. Escala de barras, 5  $\mu\text{m}$  (a-e).

Para corroborar el efecto de los conjugados en los glóbulos se analizó su hemólisis; ruptura de la membrana y liberación de hemoglobina, en cuanto mayor es el grado de ruptura la liberación de hemoglobina es mayor<sup>55</sup>. En la figura 18 se muestra el espectro de absorción de la hemoglobina liberada en glóbulos rojos expuestos a los conjugados SWNTs-AgNCs/HSA y AgNCs/HSA. El control negativo (glóbulos rojos incubados con agua destilada y agitados violentamente) mostro la mayor cantidad de hemoglobina liberada (línea roja). En concordancia con los datos obtenidos por SEM, se observó una mayor hemólisis en los glóbulos incubados con los conjugados (línea azul y verde), y una menor hemólisis en los glóbulos incubados únicamente con los nanocúmulos AgNCs/HSA.



**Figura 18:** Espectro UV-vis de hemoglobina liberada de glóbulos rojos. El espectro tiene una significativa absorbancia a 412 nm y dos picos pequeños a 544 y 578 nm que corresponden a oxihemoglobina.



La mayoría de los reportes plantean que la biocompatibilidad de los nanomateriales funcionalizados con biomoléculas se incrementa, la forma en que ocurre no es bien conocida<sup>56</sup>. Shang y colaboradores<sup>52</sup> reportaron que los nanocúmulos de plata son tóxicos para cultivos celulares (Hela), la toxicidad de los nanocúmulos se minimiza drásticamente cuando los NCs son cubiertos por HSA, ellos proponen que debido a los cambios estructurales de la proteína cuando es absorbida sobre la superficie de los nanomateriales la proteína no puede ser reconocida por la maquinaria de reconocimiento celular para su internalización, por lo tanto las nanopartículas no son internalizadas. Al usar nanotubos de carbono como vectores, la internalización de los nanocúmulos ocurrió indiscriminadamente por los glóbulos (los nanotubos de carbono atraviesan las barreras por endocitosis) provocando su fragmentación. La forma en que los nanocúmulos de plata interfieren en las células no es bien conocida.

#### **5.4 Conclusión**

En este apartado se demostró un método fácil para la síntesis de nanocúmulos de plata usando la albumina sérica humana como agente estabilizante. La proteína actúa como ligando para estabilizar el núcleo metálico y limita el crecimiento de los nanocúmulos. Además se tomó ventaja de la afinidad de la albumina por la superficie hidrófoba de los nanotubos de carbono y se formaron conjugados con nanocúmulos de plata y nanotubos de carbono. Se mostró que los conjugados comprometen la integridad de los glóbulos rojos. A pesar de que los nanocúmulos han sido ampliamente investigados para diversas aplicaciones biomédicas como teragnosis, sin embargo, la hemólisis observada en este trabajo puede limitar sus aplicaciones.

## **6. Nanopartículas de plata confinadas en nanodiscos del virus del mosaico del tabaco**

### **6.1 Introducción**

La síntesis de materiales híbridos con tamaños y dimensiones controlables es de gran importancia en nanociencia y nanotecnología, ya que para la manufactura de dispositivos avanzados se requiere de bloques de construcción con características homogéneas. Un número de estructuras biológicas han sido usadas como plantillas para su síntesis, sin embargo, uno de los sistemas que ofrece mayor control sobre el tamaño final de las nanopartículas son los nanoreactores; bionanoestructuras que por su arquitectura tienen áreas bien definidas que confinan el crecimiento de las partículas. La cavidad interna de estuches proteicos ha sido usada para sintetizar nanopartículas, los grupos funcionales en la superficie de la cavidad interna actúan como centros de nucleación y las paredes actúan como contenedor/molde que delimita el tamaño y forma final de la nanopartícula. La cavidad interna de la cápside del virus de manchas blancas del frijol y de la proteína ferritina ha sido usada para sintetizar NPs metálicas y magnéticas con tamaños definidos<sup>57,58</sup>. Además, de estuches proteicos se ha usado el poro de estructuras con forma de discos (toroide) para sintetizar NPs. Los poros de la proteína chaperona y de plásmidos de ADN se han usado como moldes para sintetizar nanopartículas de níquel, cobalto y oro con dimensiones puntuales<sup>59,60</sup>. Una característica importante de los discos es que debido al efecto de confinamiento compuestos que son procesados comúnmente bajo condiciones extremas (presión elevada, altas temperaturas y/o pH caustico) pueden ser sintetizados bajo condiciones suaves en la cavidad de discos ensamblados de péptidos<sup>61</sup>. Una cualidad más de los nanodiscos es que no solo tienen aplicación en nanotecnología, actualmente hay un

campo emergente donde nanodiscos ensamblados de fosfolípidos y un armazón de proteínas de membrana se usan para estudiar proteínas de membrana<sup>62</sup>. Como dato, existen pocos ejemplos de discos híbridos, esto puede deberse a que son raros en la naturaleza y difíciles de sintetizar. En la naturaleza hay pocos ejemplos; barriles beta y los barriles TIM. También se ha buscado sintetizarlos a partir de polímeros anfipáticos, DNA, péptidos, proteínas y porfirinas<sup>63</sup>. Desafortunadamente la extracción y purificación o la síntesis de estructuras toroides es un proceso complicado y costoso. Es bien conocido que la cápside del virus del mosaico del tabaco puede formar estructuras toroides y estas han sido usadas como plantilla para ordenar nanopartículas metálicas pre-sintetizadas. Khalil y Szuchmacher<sup>64</sup> tomando ventaja de los grupos amino que se encuentran distribuidos en la superficie del disco anclaron nanopartículas de oro y obtuvieron arreglos de nanopartículas en forma de anillo sobre los discos. Sin embargo, hasta la fecha ningún trabajo ha reportado su uso como nano reactores para sintetizar nanopartículas. Esto puede deberse a que se requiere de condiciones específicas de pH, fuerza iónica y temperatura para el ensamble de los discos, además que solo existen en un intervalo reducido y pequeños cambios en su ambiente fisicoquímicos promueven su desensamble.

Motivados por el número de publicaciones que mencionan el polimorfismo de TMV modificado térmicamente, nosotros exploramos si la temperatura puede promover el desensamble de la cápside de TMV en discos sin desnaturar la proteína. Nuestros resultados mostraron que a temperaturas alrededor de 75 °C se promueve el desensamble de la cápside en estructuras como discos. Como dato este es el primer reporte que menciona la obtención de discos a través del desensamble térmico de TMV. Este es un proceso rápido y sencillo para obtener estructuras toroides.

En este trabajo presentamos una vía alternativa para la formación de nanodiscos a través del desensamble de la cápside de TMV inducido térmicamente. Las estructuras toroides se emplearon como nanoreactores para la síntesis de nanopartículas de plata (vea figura 19).

## **6.2 Materiales y métodos**

### **6.2.1 Materiales**

Las muestras de TMV nativo fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Stephen Mann (Departamento de Química, Universidad de Bristol). El Nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), boro hidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) se obtuvieron de sigma-Aldrich. Todos los reactivos se usaron como se recibieron. En todos los experimentos se usó agua desionizada (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ ) de un sistema de purificación Millipore.

### **6.2.2 Obtención de nanodiscos**

Los nanodiscos se obtuvieron de la siguiente metodología: 500  $\mu\text{l}$  de TMV nativo a una concentración de 1 mg/ml en 10 mM de PBS a un pH 7.0 se agregó en un tubo Eppendorf y se incubaron a 75 °C en un baño de aceite durante 60 min. La muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente durante una hora, después se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de agua desionizada al tubo Eppendorf y se centrifugo a 10,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se tomó cuidadosamente, se cuantifico y ajusto a 1 mg/ml.

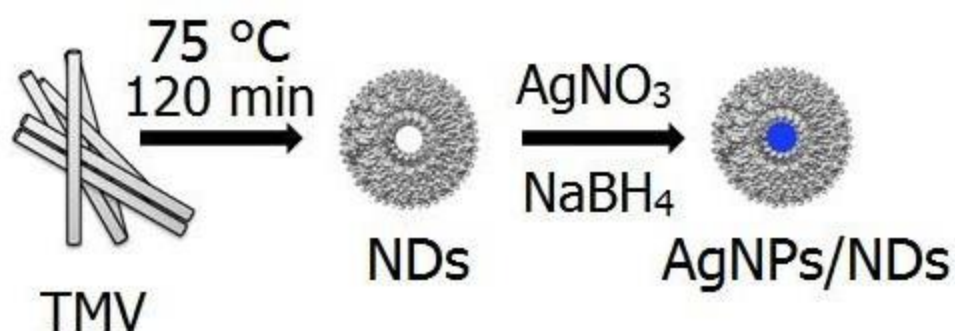
### **6.2.3 Síntesis del híbrido AgNPs/NDs**

Para la síntesis de los híbridos AgNPs/NDs se siguió el siguiente procedimiento: 25  $\mu\text{l}$  (1 mg/ml) de nanodiscos se mezclaron con 25  $\mu\text{l}$  (1 mM) de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), después se dejaron reposar durante 15 min a temperatura ambiente, sin agitación. Finalmente se

agregaron 50  $\mu\text{l}$  (5 mM) de boro hidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ).

#### 6.2.4 Caracterización

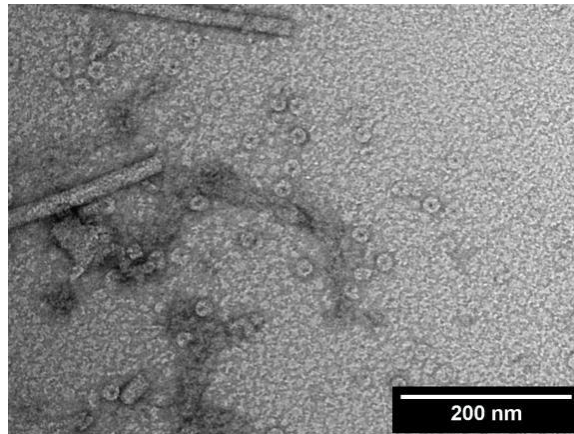
Los espectros de UV-vis se obtuvieron en un rango de 200 a 800 nm en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11. Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión las muestras se prepararon depositando 5  $\mu\text{l}$  de la muestra en rejillas de cobre cubiertas con carbono (Ted Pella), después de 60 s el exceso de solución se eliminó usando papel filtro y se dejó secar durante la noche, las muestras se analizaron usando un microscopio TEM (JEOL 1200EX). Para el análisis de microscopía de fuerza atómica se depositaron 100  $\mu\text{l}$  de las muestras sobre mica, después de 15 min el exceso de muestra se eliminó con papel filtro, finalmente las muestras se lavaron con 1000  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y se dejaron secar en vacío durante 2 h. El análisis de AFM se hizo en modo de contacto intermitente en condiciones ambientales en un Picoforce (Veeco).



**Figura 19:** Imagen esquemática de la producción de nanodiscos y su decoración con nanopartículas de plata para formar el híbrido AgNPs/NDs.

### 6.3 Resultados y discusión

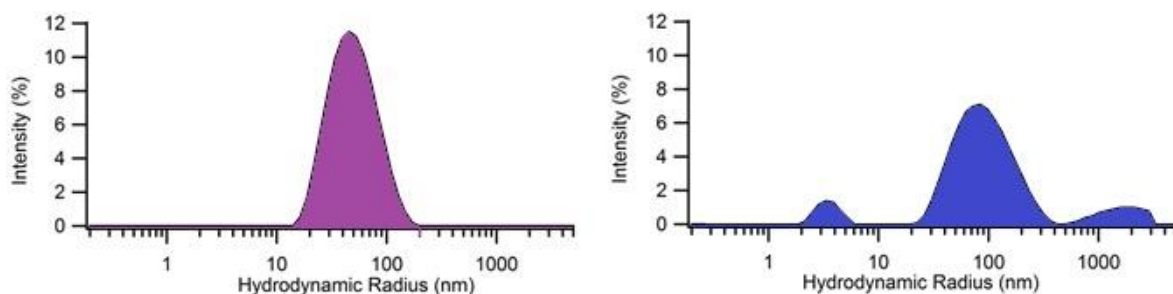
Como mencionamos anteriormente la temperatura es un factor que influye en la estructura del virus del mosaico del tabaco. A través de la exposición de la cápside nativa de TMV a varias temperaturas por diferentes periodos se encontró que a 75 °C durante 120 min la cápside nativa de TMV se desensambla en estructuras como discos (vea figura 20). La morfología de los discos es homogénea, según las imágenes tienen 18 nm de diámetro externo y una cavidad interna de 4 nm, estas dimensiones mantienen una relación con los discos ensamblados por otros métodos<sup>64</sup>. El análisis de dispersión dinámica de luz de los discos producidos muestra que además de estos hay una gran cantidad de cápsides de TMV sin desensamblar y grandes agregados (vea figura 21).



**Figura 20:** Imágenes de microscopia de transmisión de nanodiscos

El modelo más popular de ensamble de TMV propone la formación de los discos es indispensable como primer paso para iniciar el crecimiento del virus. El modelo propone que una cadena de RNA se inserta en el hueco del disco y se adhiere a la superficie interior concéntrica del disco. La unión del RNA provoca la dislocación del disco en una

protohélice. Este re arreglo provoca el ajuste de las subunidades y el arresto del RNA. Después de este paso más regiones del RNA se unen en la superficie interior de la protohélice y más discos se pueden adherir. Otro modelo propone los monómeros de la cápside se adhieren secuencialmente al RNA para formar la vara. En ambos modelos se basan en el RNA como columna para mantener la cohesión de las subunidades en la vara nativa<sup>60,61</sup>. Por tanto al aplicar la energía necesaria para desestabilizar la unión del RNA a la superficie del interior la cápside, el desensamble de los discos ocurre. Como dato la desestabilización de la interacción de segmentos de RNA con las proteínas de la cápside de TMV ha sido demostrada a través de métodos mecánicos<sup>65</sup>.

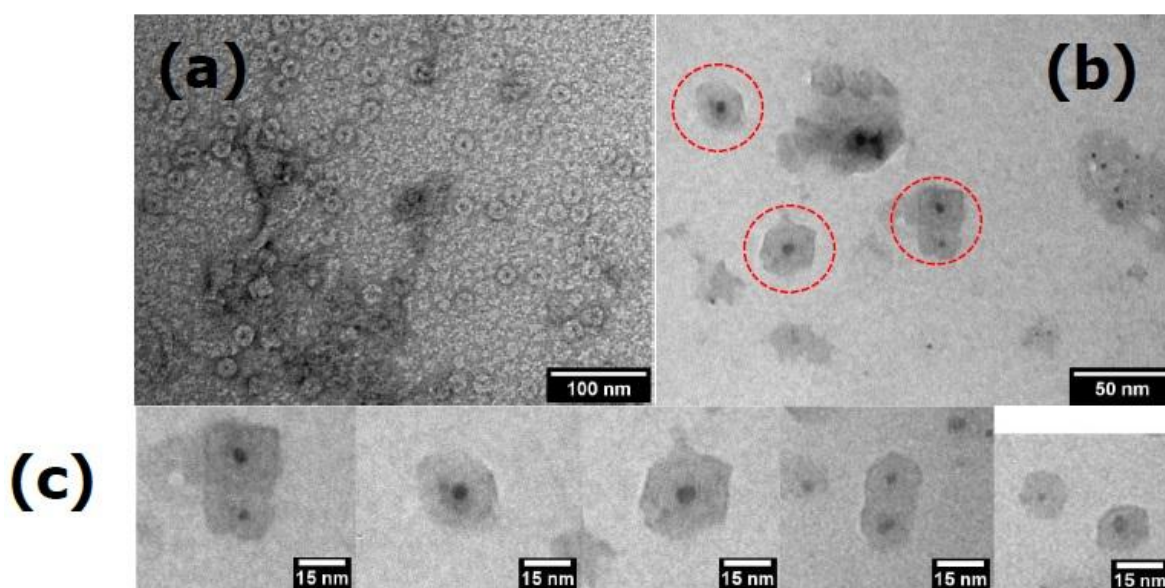


**Figura 21:** Dispersión dinámica de luz de TMV nativo antes y después del tratamiento térmico, (a) y (b) respectivamente.

### 6.3.1 Síntesis de nanohíbridos

Una vez obtenidos los discos, el siguiente paso fue la síntesis de AgNPs en el poro de los discos (vea punto 7.2.3 en metodología). La figura 22 muestra imágenes TEM de los discos prístinos y de los híbridos AgNPs/NDs. Los anillos prístinos fueron teñidos con acetato de uranilo, ya que los materiales biológicos son transparentes en imágenes de TEM. La acumulación de acetato en el poro de los anillos provoca se observe con una mayor

densidad electrónica (vea figura 22 (a)). Imágenes de los híbridos AgNPs/NDs muestran los discos presentan irregularidades en sus bordes esto pudo deberse a daños ocasionados por el haz de electrones del microscopio. En general el poro de los híbridos tiene una mayor densidad electrónica, en este caso no se usó acetato de uranilo, por tanto la densidad electrónica se debe a las AgNPs (figura 22 (b) y (c)).

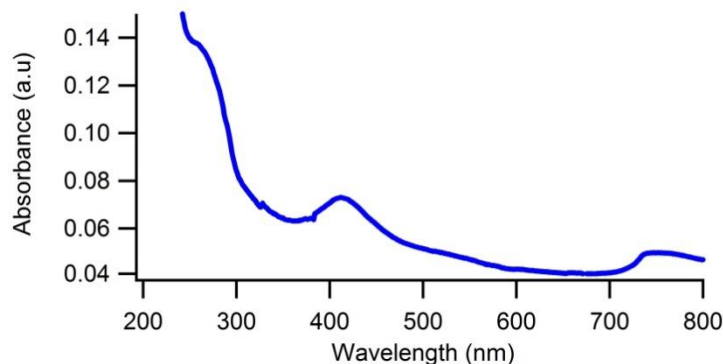


**Figura 22:** Imágenes de TEM de nanodiscos prístinos (a) y de los híbridos AgNPs/NDs producidos (b). En (c) se muestra una colección de híbridos AgNPs/NDs, los cuales evidencian la presencia de NPs en su poro central.

La síntesis de AgNPs en el poro de las nanopartículas se analizó por UV-vis. La figura 23 muestra el espectro de los híbridos AgNPs/NDs, presenta un pico de absorción centrado a 280 nm, la ubicación del pico muestra el material proteico no ha sufrido cambios conformacionales. Además se observa un pico a 420 nm que es debido a la resonancia plasmonica de superficies de las AgNPs en la cavidad interna de los discos. Un aspecto

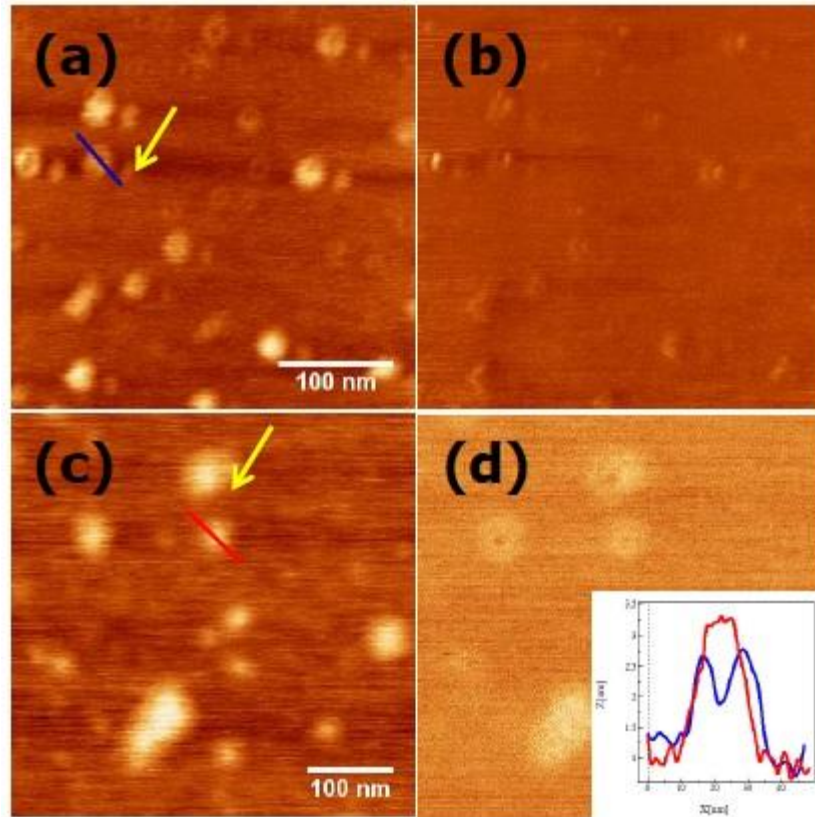


interesante es la joroba ancha que surge desde 500 hasta 580 nm, este comportamiento es característico de nanoclusters metálicos de plata como observamos en el punto 5, la presencia de los NCs fue corroborada por imágenes TEM, ya que además de las partículas también se observó una gran cantidad de pequeñas partículas con tamaños inferiores a 2 nm.



**Figura 23:** Espectro de UV-visible de nanoestructuras híbridas AgNPs/NDs.

Finalmente analizamos los híbridos por microscopía de fuerza atómica (ver figura 24). Los discos prístinos mostraron estructuras como donas de 25 nm de diámetro y alturas de alrededor de 2.5 nm (ver figura 24 (a)). Una característica interesante es que los perfiles mostraron poros de alrededor de 6.5 nm de diámetro (trazo azul en inserto en la figura 30 (d)). En contraste las imágenes de los híbridos sintetizados mostraron que los anillos pierden la forma de dona ya que los poros desaparecen (vea figura 24 (c)). El análisis de la sección transversal muestra que hay un incremento en la altura en la región donde se ubican los poros (trazo rojo en inserto en 24 (d)), indicando que la cavidad fue rellenada con nanopartículas de plata. Finalmente las imágenes de fase de ambas muestras nos confirman los discos son rellenos con un material diferente (figura 24 (d)).

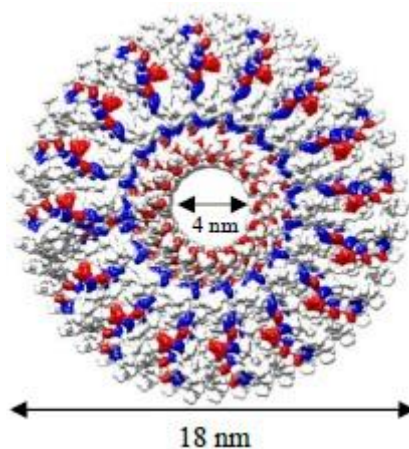


**Figura 24:** Imágenes de microscopía de fuerza atómica de nanodiscos prístinos y de los híbridos AgNps/NDs producidos. (a) y (c) son imágenes de topografía discos y híbridos respectivamente, mientras que (b) y (d) son imágenes de fase de (a) y (c) respectivamente. El inserto en (d) es el perfil de los objetos señalados en (a) y (c) según sus colores. Escala de barras 100 nm (a) y (c).

Como mencionamos, los modelos de ensamble de TMV se basan en el RNA como pilar y eje sobre el cual crece la cápside de TMV. En nuestro análisis se encontró la exposición a 75 °C durante 60 min la cápside se desensambla en unidades como discos. Dos datos importantes; i) es bien conocido que a temperaturas alrededor de 75 °C el RNA se desnatura, y ii) las proteínas de la cápside de TMV se aglomera a partir de los 80 °C<sup>66</sup>, como consecuencia de la desnaturalización de los monómeros de proteína. Con los datos

anteriores sugerimos la temperatura de 75 °C y el periodo de incubación son suficientes para desestabilizar la interacción entre el RNA y el interior de la cápside permitiendo el desensamble de los discos, además la energía es insuficiente para promover la aglomeración del virus, permitiendo la conservación de los discos.

La síntesis de AgNPs en el poro de los discos obtenidos, se explica por la carga negativa en el centro del disco generada por un anillo de grupos carboxílicos alrededor del poro (vea figura 25). Lu y colaboradores<sup>67</sup> y Wang y colaboradores<sup>68</sup> mencionan que esos grupos carboxílicos tienen un pKa alto y son responsables del desensamble de los discos en monómeros a pH de 7.2. La síntesis de las AgNPs se realizó en un pH superior (8.0) sugiriendo los discos debieron desensamblarse lo cual no ocurrió. La unión de los iones de plata a las cargas negativas pueden neutralizar la repulsión entre estas permitiendo los discos conserven su estructura.



**Figura 25:** Modelo molecular de nanodiscos de la proteína de cubierta de TMV. Los colores señalan aminoácidos con carga negativa y con carga positiva, rojo y azul respectivamente.

## **6.4 Conclusión**

El método de obtención de discos por medio del calentamiento de la cápside nativa del virus del mosaico de tabaco es práctico y rápido comparado con métodos conocidos. Sin embargo, se requiere cuantificar su eficiencia para conocer su viabilidad. La síntesis de nanopartículas de plata en el poro de discos de TMV permitió la obtención de nuevos nanomateriales híbridos con aplicaciones potenciales en nanotecnología.

## **7. Partículas esféricas derivadas de TMV como plantilla suave para la síntesis de nanopartículas de plata.**

### **7.1 Introducción**

La producción de materiales híbridos usando plantillas biológicas está generando beneficios en el desarrollo de la nanotecnología. Se sabe que las cápsides virales son excelentes plantillas ya que poseen características que las hace ideales para sintetizar y organizar nanopartículas. Algunas características hacen de las cápsides virales útiles en nanociencia y nanotecnología: (i) Las cápsides son estructuras supramoleculares de proteína con un gran número de grupos funcionales que pueden conjugarse con nanomateriales. (ii) Las cápsides cuentan con estructura y simetría definidas, lo cual les permite mantener una periodicidad precisa sobre grandes dimensiones. (iii) La información genética de las proteínas de las cápsides es accesible, por lo tanto, las propiedades de los virus pueden ser modificadas y diseñadas a través de ingeniería genética. (iv) Con los avances actuales en biotecnología la producción en masa de los virus es posible con relativa facilidad. Las características de las cápsides virales son difíciles de igualar por los materiales sintéticos<sup>4</sup>.

Diversos trabajos han demostrado que la cápside del virus del mosaico del tabaco (TMV) es una estructura supramolecular ideal como plantilla para la síntesis de nanomateriales híbridos. Un amplio rango de materiales han sido depositados en TMV usando diferentes métodos: nanocristales semiconductores tales como PbS, CdS y óxidos de hierro fueron nucleados sobre TMV a través de su exposición a sales precursoras<sup>4</sup>. Películas de SiO<sub>2</sub> pueden ser formadas en TMV usando métodos de condensación de sol-gel<sup>69</sup>. Cubiertas de

metales nobles tales como oro, plata, platino, paladio, níquel, cobalto y cobre han sido depositadas a través del método de deposición *electroless*<sup>69</sup>. Además, se ha codepositado oxido de aluminio y oxido de titanio<sup>70</sup>. Finalmente, estrategias convencionales de deposición de silicio han sido empleadas como paso adicional para recubrir híbridos de TMV decorados con nanopartículas metálicas<sup>71</sup>.

El virus del mosaico del tabaco consiste de 2130 subunidades proteicas idénticas de 17.5 kDa apiladas en un arreglo helicoidal de mano derecha que envuelven un segmento de RNA unicatenario de 6400 nucleótidos. La morfología resultante es una estructura tubular de 300 nm de longitud, 18 nm de diámetro externo y 4 nm de diámetro interno (vea esquema (b) en figura 26). La mayoría de los trabajos han usado la forma nativa de TMV para sintetizar materiales híbridos, sin embargo TMV presenta un polimorfismo dependiente de la temperatura que puede ser explotado. Varios reportes han mencionado que nanopartículas esféricas (SPs) son generadas a través del tratamiento térmico del TMV nativo. Mencionan que a temperaturas de 94-98 °C las proteínas de la cubierta (Cp) de TMV adquieren una conformación única favorable para su agregación/ensamble en SPs. Las partículas consisten en esferas homogéneas en forma y tamaño, y sin material genético<sup>72</sup>. El tamaño final de las SPs depende de la concentración inicial de TMV, a una concentración de 0.1, 1.0, y 10.0 mg/ml de TMV nativos las dimensiones de las esferas es 50-160 nm, 100-350, y 250-800 nm respectivamente<sup>73</sup>. Además se sabe que en la transición térmica el RNA se elimina y las esferas solo están compuestas de material proteico, restándoles toxicidad biológica. Varios reportes han demostrado la versatilidad de las SPs como plantillas para anclar biomoléculas y nanopartículas. Atabekov y colaboradores<sup>73</sup> depositaron PEP (bromuro de poli(N-etil-4-vinilpiridinio)) sobre las SPs y secuencialmente albumina de suero bovino. En un trabajo

posterior incrementaron la complejidad del sistema y anclaron anticuerpos sobre la superficie de las SPs<sup>72</sup>. Recientemente Bruckman y colaboradores<sup>74</sup> anclaron gadolinio (III) para fabricar un híbrido con aplicación como agente de contraste en imagen por resonancia magnética (MRI).

Motivados por las características notables de las SPs como un tamaño controlable, baja toxicidad y los avances recientes en su funcionalización, empleamos las esferas como plantillas para sintetizar nanopartículas de plata (vea figura 19).

## **7.2 Materiales y métodos**

### **7.2.1 Materiales**

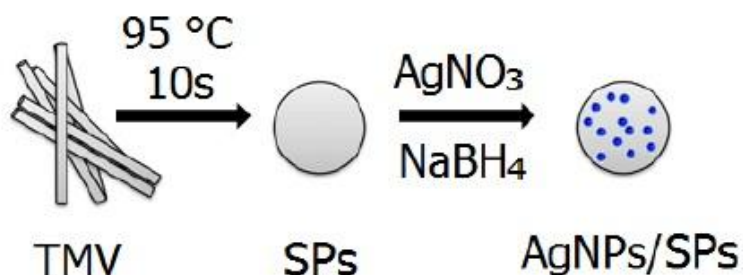
Las muestras de TMV nativo fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Stephen Mann (Departamento de Química, Universidad de Bristol). El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ), borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) e hidróxido de potasio (KOH) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos se usaron como se recibieron. En todos los experimentos se usó agua desionizada (18.2 M $\Omega$ .cm) de un sistema de purificación Millipore.

### **7.2.2 Formación de partículas esféricas.**

La formación de las SPs a través de la transición térmica se logró siguiendo el método descrito por Atabekov y colaboradores<sup>72</sup>. En resumen, 1.0 mg/ml de TMV nativo (pH 7.0) se calentó a 95 °C durante 10 s en un termociclador (Tercyc Thermocycler, DNA-Technology).

### 7.2.3 Síntesis del híbrido AgNPs/SPs.

Para la síntesis de los híbridos AgNPs/SPs se siguió el siguiente procedimiento, 20  $\mu\text{l}$  (1mg/ml) de nanoesferas se mezclaron con 25  $\mu\text{l}$  (1 mM) de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente, sin agitación. Después se agregaron 50  $\mu\text{l}$  (5 mM) de boro hidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), se dejó reposar durante 5 min. Después se agregaron alícuotas de  $\text{AgNO}_3$  y  $\text{NaBH}_4$  secuencialmente en cinco ciclos con intervalos de 1 min entre cada adición.



**Figura 26:** Ilustración esquemática de preparación de nanopartículas esféricas (SPs) y síntesis de nano híbrido AgNPs/SPs.

### 7.2.3 Caracterización de híbridos

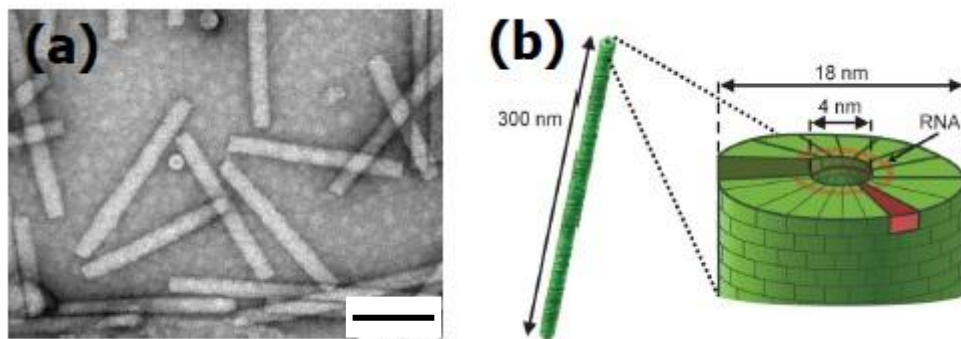
Los espectros de UV-vis se obtuvieron en un rango de 200 a 800 nm en espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 11. El tamaño y potencial Z de las nanoesferas se analizaron en un equipo Nano-ZS (Malvern Zetasizer) en celdas para potencial Z desechables. Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión las muestras se prepararon depositando 5  $\mu\text{l}$  de la muestra en rejillas de cobre cubiertas con carbono (Ted Pella), después de 1 min el exceso de solución se eliminó usando papel filtro y se dejó secar durante la noche, las muestras se analizaron usando un microscopio TEM (JEOL 1200EX). El análisis de tamaño de partículas se hizo con el software ImageJ (NIH). Para el análisis de microscopía de



fuerza atómica se depositaron 100  $\mu\text{l}$  de las muestras sobre mica, después de 15 min el exceso de muestra se eliminó con papel filtro, y finalmente las muestras se lavaron con 1000  $\mu\text{l}$  de agua desionizada y se dejaron secar en vacío durante 2 h. El análisis de AFM se hizo en modo de contacto intermitente en condiciones ambientales con puntas de silicio ( $F=40\text{ N/m}$ ), para el análisis se empleó un microscopio Picoforce (Veeco).

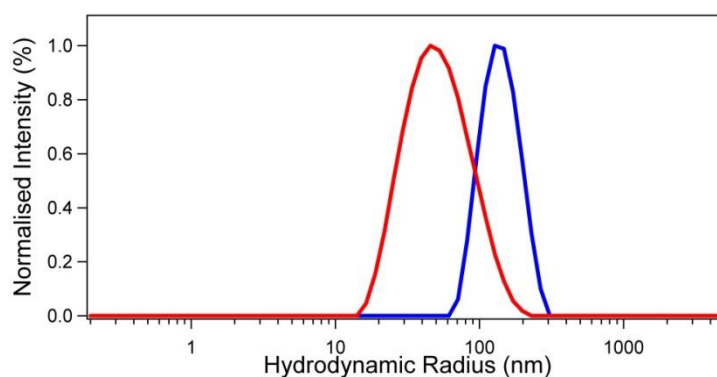
### 7.3 Resultados y discusión

La estructura del virus del mosaico del tabaco se analizó por TEM. Las imágenes revelaron la estructura tipo barra del virus (figura 27 (a)), las dimensiones de  $\sim 300\text{ nm}$  de longitud,  $\sim 18\text{ nm}$  de diámetro externo (figura 27 (b)) concuerdan con las reportadas para la estructura cristalina de TMV. Desafortunadamente, la cavidad interna del tubo no se pudo observar, esto pudo deberse al poco tiempo que la muestra estuvo expuesto al acetato de uranilo así que se impidió su difusión en la cavidad.



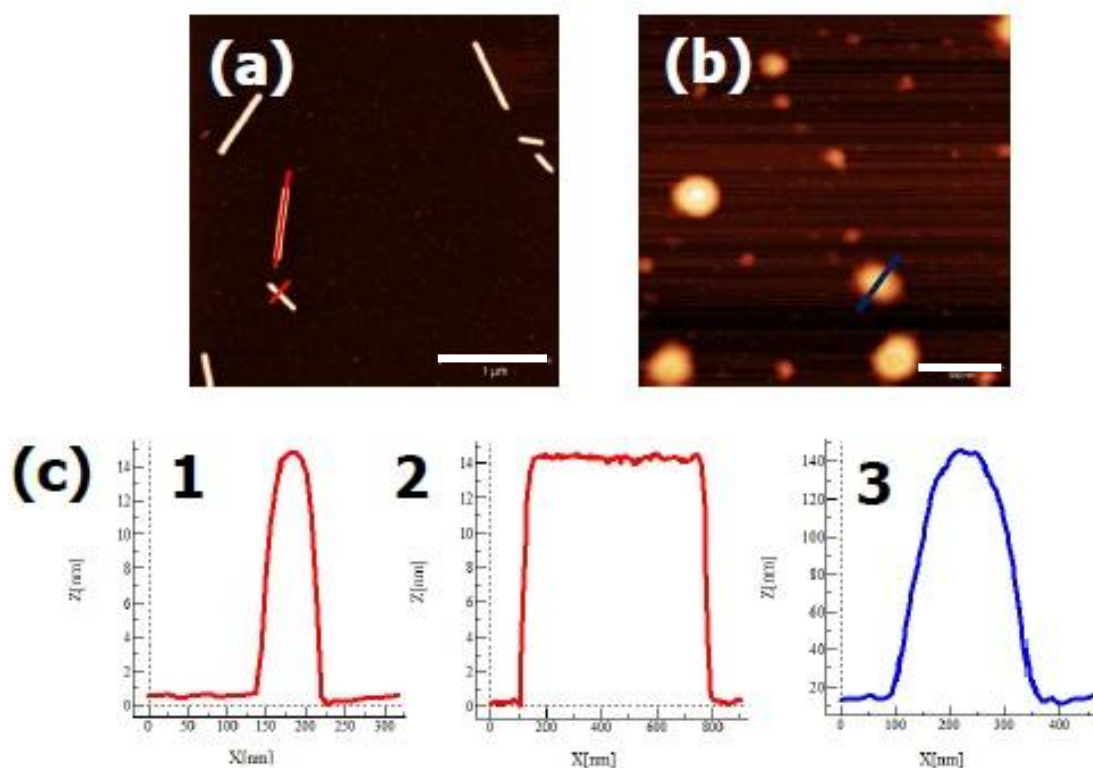
**Figura 27:** (a) Imagen TEM de cápsides virales de TMV marcadas con acetato de uranilo. (b) representación esquemática de TMV. El virus tiene una estructura helicoidal, una subunidad proteica es resaltada en rojo, el RNA se esquematiza como una cinta naranja. Escala de barra 100 nm.

Después de someter las muestras de TMV al tratamiento térmico 95 °C por 10 s se analizaron por dispersión dinámica de luz (DLS) (vea figura 28). Las cápsides de TMV nativo tienen un radio hidrodinámico (Rh) de 45 nm (línea roja) antes de ser calentadas, en contraste después del tratamiento resulta evidente un incremento en el tamaño de las partículas ya que hay un desplazamiento en el Rh hasta 130 nm (línea azul). Resulta interesante el comportamiento unimodal en ambas muestras, en TMV significa que la muestra carece de impurezas, mientras que en la muestra calentada indica la mayoría de las cápsides se transformaron para formar nanoesferas, además evidencia la ausencia de aglomerados. El análisis del potencial Z antes y después del tratamiento térmico confirma TMV sufre un reordenamiento estructural, ya que la carga inicial de TMV es de -37.5 mV, en contraste después del tratamiento la negatividad incrementa -45.4 mV. Generalmente, un potencial Z por debajo de -30 mV es considerado como un indicador de un sistema coloidal estable<sup>52</sup>. El índice de polidispersidad bajo (PDI= 0.072) y el potencial Z negativo indican las esferas son altamente estables y homogéneas.



**Figura 28:** Radio hidrodinámico (Rh) de TMV antes (rojo) y después de ser sometidos a tratamiento térmico (azul).

Para corroborar la transición de TMV en esferas las muestras se analizaron por AFM (vea figura 29). Las cápsides de TMV mostraron la clásica forma de barra (vea Figura 29 (a)). Las dimensiones de los perfiles son similares a las observadas por TEM, altura 14 nm y longitudes de ~ 300 nm (vea perfiles 1 y 2 en figura 29 (c)). En contraste las imágenes de las muestras después del tratamiento térmico mostraron una morfología esférica, corroborando la transición de la estructura tubular de TMV nativo en una estructura esférica. En su mayoría presentaron alturas de 140 nm y diámetros cercanos a 250 nm (vea perfil 3 en figura 29 (c)). Las dimensiones de las esferas concuerdan con las observadas en DLS.



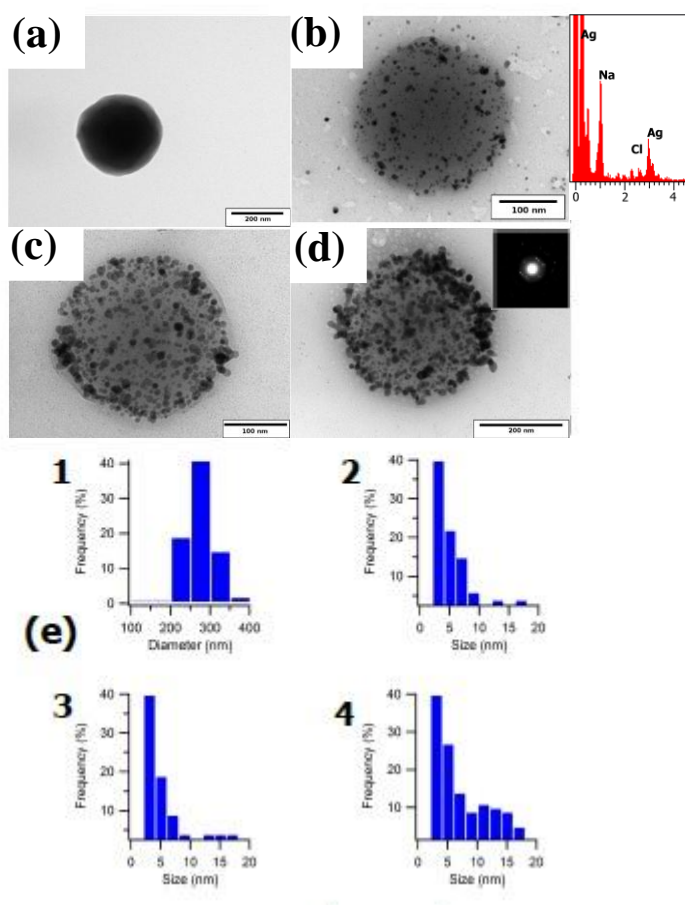
**Figura 29:** Imágenes topográficas de AFM de Virus del mosaico del tabaco y de nanoesferas, vea (a) y (b) respectivamente. En (c) se muestran los perfiles de sección transversal (1) y longitudinal (2) de TMV señalados en (a), y en el perfil (3) se muestra la

altura de las SPs señalada en (b). Escala de barras, 1000 nm (a) y 500 nm (b).

### **7.3.1 Síntesis de nanopartículas de plata sobre SPs**

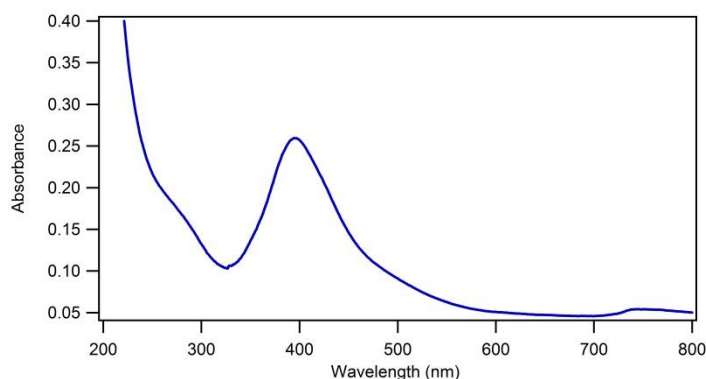
Diferentes concentraciones de plata, agente reductor, así como tiempo de incubación se analizaron para obtener las condiciones favorables con el fin de tener esferas cubiertas con NPs de tamaño homogéneo. La figura 30 muestra imágenes representativas de la adición secuencial de 0.5 mM de nitrato de plata y 5 mM de boro hidruro de sodio. La figura 30 (a) muestra las esferas después de la adición de nitrato de plata y antes de la adición de boro hidruro. Las esferas muestran una estructura casi esférica con bordes bien definidos. Después de completar el primer ciclo con la adición de boro hidruro, la suspensión sufrió un cambio de color de translucido a amarillo, el cambio en coloración se interpreta como la reducción de los iones de plata y por tanto su conversión en plata metálica. Las imágenes TEM de estas esferas mostraron que su superficie es decorada discretamente con partículas pequeñas (vea figura 30 (b)). Las muestras no se tiñeron, así que el contraste se debe únicamente a las partículas metálicas, el tamaño de las nanopartículas fue inferior a 5 nm. Al finalizar el quinto ciclo de adición de plata y de agente reductor las esferas mostraron un mayor número de partículas sobre su superficie, además las partículas se observan mejor definidas, el análisis de tamaño mostró que nanopartículas con dimensiones inferiores a 5 nm predominan (vea figura 30 (c)). Para analizar la estabilidad de los híbridos, dejamos reposar las muestras a temperatura ambiente y protegidas de la luz por 48 h. Los híbridos mostraron estabilidad en fase acuosa, ya que no se observó precipitación por gravedad. Las imágenes TEM mostraron la superficie de las esferas continuaba parcialmente cubiertas, el análisis de tamaño mostró que partículas alrededor de 5 nm seguían predominando, sin embargo también hubo un incremento en el número de partículas con tamaños superiores a

10 nm (figura 30 (d)). El análisis elemental (EDS) mostro una fuerte señal de plata (inserto en figura 30 (b)) lo que corrobora la naturaleza de las partículas, además el patrón de difracción de las NPs confirmo su estructura cristalina (inserto en figura 30 (d)).



**Figura 30:** Imágenes TEM de nanoesferas (a) e híbridos obtenidos en el primer ciclo (b) y quinto ciclo (c) de adición secuencial de nitrato de plata y boro hidruro. En (d) se muestran los híbridos 48 h después de finalizar el quinto ciclo. En (e) se muestra la distribución de tamaño de las nano esferas y NPs sintetizadas, nano esferas (1), ciclo uno (2), ciclo cinco (3) y 48 h después (4), análisis hecho con ImageJ. Escala de barras 200 nm (a) y (d) y 100 nm (b) y (c).

Finalmente los híbridos AgNPs/SPs se caracterizaron por espectroscopia de UV-visible. La figura 31 muestra el espectro de absorción del híbrido. El espectro muestra una joroba amplia con una absorción máxima a 280 nm, y otra con un máximo de absorción a 400 nm, indicando que los cationes  $\text{Ag}^+$  son reducidos y que los átomos de metal se unen para formar nanopartículas.



**Figura 31:** Espectro de UV-visible de nano estructura híbrida AgNPs/SPs.

Debido a su naturaleza protéica, factores físicos o bioquímicos, pueden afectar la integridad estructural de las cápsides virales. Altas temperaturas desestabilizan las interacciones débiles que dirigen el ensamble de las cápsides. En pocos casos se tiene reportado que altas temperaturas promuevan el reordenamiento de la cápside en estructuras con diferente geometría. TMV muestra estabilidad hasta temperaturas alrededor de 70 °C, sin embargo, a temperaturas superiores se desnaturaliza y forma fibras amiloideas. Interesante resultan lo reportado por Atabekov y colaboradores<sup>75</sup> quienes al someter cápsides de VMT a temperaturas entre 94 a 98 °C durante 10 s encontraron el virus sufre una desnaturalización parcial y se agrega en forma de esferas sólidas con diámetros homogéneos. Los resultados de este trabajo corroboran la transición térmica de cápsides helicoidales a estructuras

esféricas.

La metodología que empleamos produjo una cubierta incompleta sobre las superficies, varios factores pueden estar implicados. La proteína de cubierta tiene 15 aminoácidos con carga negativa. Cuando se encuentra ensamblada en la cápside helicoidal únicamente quedan tres aminoácidos expuestos hacia la luz del tubo y solo 2 expuestos al exterior del tubo. Como mencionamos, la vara de TMV en pH neutro tiene carga negativa (-37.5 mV) la cual incrementa cuando se forman las esferas (-45.4 mV), esto indica que la estructura terciaria de la proteína de la cubierta se modificó y el número de aminoácidos con carga negativa expuestos al solvente incremento y por tanto también el número de sitios de unión para cationes aumento. A pesar de este incremento, probablemente la distancia entre los aminoácidos negativos o centros de nucleación pudo restringir la formación de una cubierta uniforme, ya que se sabe la concentración de los sitios de unión a los precursores es crítica para obtener cubiertas homogéneas. Por otro lado Lim y colaboradores<sup>76</sup> mencionan que cuando se usan reductores la formación de cubiertas incompletas puede deberse a una mayor velocidad de reducción de los cationes solubles que los que están unidos a la plantillas de esta forma se disminuye la disponibilidad de los iones.

#### **7.4 Conclusión**

En este capítulo presentamos la síntesis de una nueva clase de estructuras híbridas usando plantillas esféricas generadas a partir del tratamiento térmico del virus del mosaico del tabaco. Nosotros prevemos que las estructuras híbridas AgNPs/SPs pueden tener aplicaciones en dispositivos antibacterianos o sensores foto térmicos.

## **8. Partículas virales como plantillas suaves para la síntesis de nanopartículas de plata**

### **8.1 Introducción**

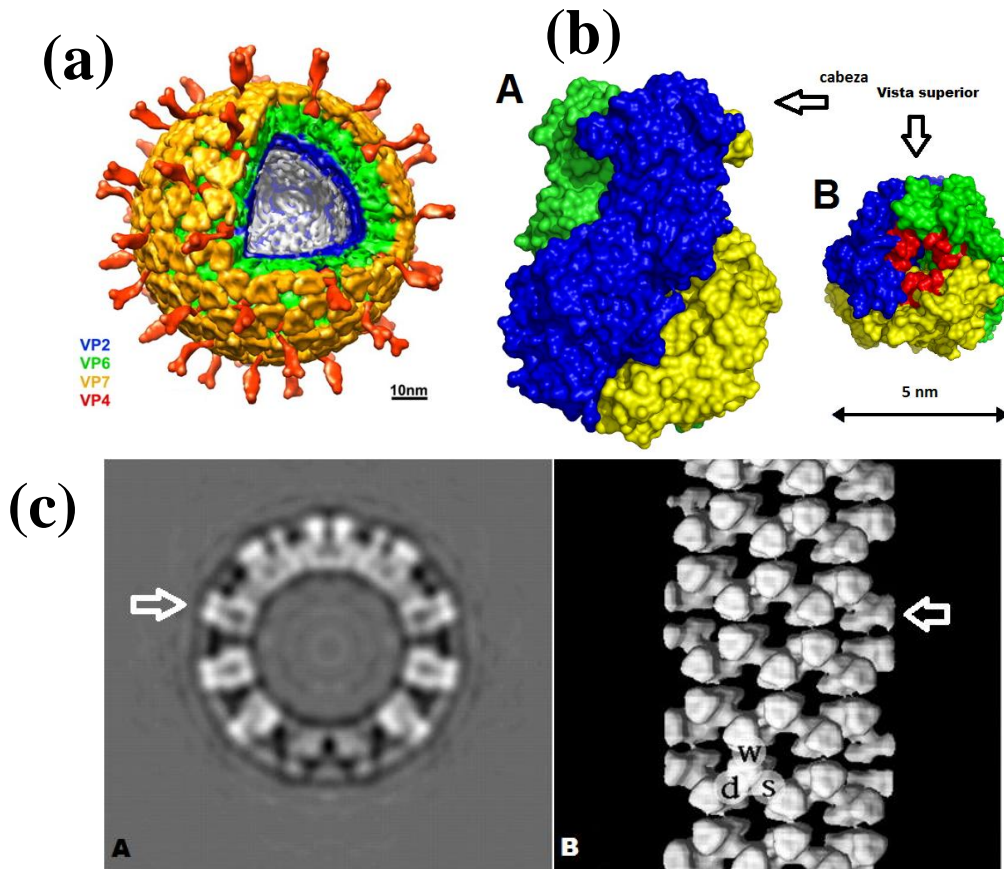
Las cápsides virales helicoidales son usadas como plantillas en la síntesis de nanoalambres metálicos debido a su estructura unidimensional. Shenton y colaboradores<sup>69</sup> fueron los pioneros en depositar nanopartículas en la superficie de cápsides virales. A partir de sus trabajos los virus han sido investigados activamente. Hasta la fecha se ha logrado sintetizar una amplia variedad de nanopartículas de metales de transición (Ag, Au, Fe, Pt, Cd y Pd) y metaloides como silicio en su superficie. Tseng y colaboradores<sup>77</sup> demostraron TMV es una plantilla ideal para la síntesis de nanopartículas de platino, ellos demostraron el híbrido tiene un comportamiento eléctrico completamente diferente al de los componentes solos ya que puede almacenar cargas. Royston y colaboradores<sup>78</sup> a través de ingeniería genética insertaron residuos de cisteína en la cápside de TMV para incrementar su afinidad por metales, con este método mejoraron la eficiencia en el codepósito de cobalto y níquel. En un trabajo más reciente lograron la codeposición de Ni, Sn y carbono<sup>79</sup>. No solo la superficie externa de TMV ha sido funcionalizada, Knez y colaboradores<sup>80</sup> sintetizaron nanopartículas de 3 nm de diámetro en el canal interno de los tubos de TMV. Debido a sus grupos funcionales, accesible producción y manipulación genética, el virus del mosaico del tabaco se ha convertido en la cápside modelo. Desafortunadamente tiene desventajas, la principal es su corta longitud (300 nm) ya que para aplicaciones en electrónicos avanzados se requiere de alambres largos ( $> 1\mu\text{m}$ ) y monodispersos<sup>81,82</sup>.



Los tubos de la proteína VP6 representan una opción para la síntesis de nanoalambres, cuentan con una longitud de varios micrómetros<sup>83</sup>, tienen una estructura definida, han demostrado tener una alta afinidad por iones metálicos como oro, plata, paladio y platino<sup>84</sup>, y además pueden ser producidos a gran escala<sup>85</sup>. Los tubos se ensamblan a partir de la proteína estructural VP6 de la cápside de rotavirus, patógeno responsable de gastroenteritis aguda. La clasificación de Baltimore ubica los rotavirus como miembros de la familia Reoviridae con RNA segmentado de doble cadena. Su cápside tiene una simetría de icosaedro y está formada por tres capas proteicas concéntricas, la capa interna está formada por 120 copias de la proteína VP2, la capa intermedia consiste de 260 trímeros de VP6, la cual está cubierta por la proteína VP7 y 60 picos de la proteína VP4<sup>86</sup>.

La proteína VP6 aislada tiene la capacidad de ensamblarse in vivo e in vitro en nanotubos de 75 o 45 nm de diámetro. Parámetros como pH y fuerza iónica determinan el diámetro de los tubos, a un pH entre 5.5-7 se obtienen nanotubos de 75 nm, mientras que a un pH superior a 7 se obtienen nanotubos de 45<sup>87</sup>.

La proteína VP6 es un trímero donde se distinguen dos dominios: una cabeza y una base. Cuando se encuentra ensamblada formando la cápside del rotavirus se encuentra confinada interactuando a través de su base con la capa de VP2 y a través de su cabeza con la capa de VP7, además interactúan entre ellas por contactos laterales (vea figura 32). A diferencia cuando se encuentra ensamblada en forma de tubos solo interactúa a través de contactos laterales permitiendo que la cabeza y la base queden accesibles para interactuar con nanomateriales<sup>87</sup>.



**Figura 32.** Estructura de rotavirus determinada por criomicroscopía electrónica, las capas proteicas se señalan con diferente color (a). Proteína VP6, en A se muestra la unidad biológica, mientras que en B la cabeza en forma de hexágono (b), en color rojo los aminoácidos con carga negativa sitios de unión a precursores metálicos. Criomicroscopía electrónica y reconstrucción tridimensional de tubos de VP6. Finalmente en (c) se muestra una imagen TEM de tubos en hielo (A) y en (B) la reconstrucción de los tubos señala los tipos de contactos entre trímeros<sup>86,87</sup>.

Como mencionamos, los tubos de VP6 han sido usados como plantillas para sintetizar nanopartículas metálicas, demostrando su afinidad por metales en particular por la plata. En general para la síntesis se usan agentes reductores que son ligeramente tóxicos y

contaminantes ambientales<sup>88</sup>. Recientemente, el uso de la luz como agente reductor ha surgido como una alternativa ambientalmente amigable. Su empleo surgió a través de la imitación de la biomineralización, proceso a través del cual un número de organismos pueden sintetizar materiales sólidos en condiciones ambientales (temperatura, presión y luz) con un fuerte control sobre su nucleación, tasas de crecimiento y la geometría final (ej. Perlas, hueso, silicio, partículas metálicas y magnéticas)<sup>89</sup>. Algunos trabajos han mostrado la viabilidad de este método, se ha logrado sintetizar nanopartículas de plata en la superficie de levaduras, el bacteriófago M13 y tubos de polímeros<sup>90,26</sup>. En este capítulo considerando la afinidad alta de los tubos de VP6 por la plata y motivados por los resultados exitosos del uso de luz como reductor, usamos los tubos de VP6 como plantillas para la síntesis de nanoalambres de plata usando la luz ambiental como agente reductor.

## **8.2 Materiales y métodos**

### **8.2.1 Materiales**

Los tubos de la proteína VP6 (TVP6) fueron amablemente proporcionadas por la Dra. Laura Palomares (Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca Morelos). Dentro de las varias sales precursoras de plata, se escogió acetato de plata ( $\text{AgOOCCH}_3$ ) ya que se sabe los iones de acetato se cargan más rápido sobre grandes polímeros con grupos carboxílicos a diferencia de los iones de cloruros, nitratos y sulfatos<sup>90</sup>. Además, la tasa de reducción acetato de plata es mayor a la de sulfato y nitrato de plata. En todos los experimentos se usó agua desionizada (18.2 M $\Omega$ .cm) de un sistema de purificación Millipore.

### **8.2.2 Síntesis de híbridos AgNPs/ TVP6**

En la síntesis de los híbridos 1 ml de una solución de tubos de VP6 (1 mg/ml) se mezcló

con 1 ml de una solución de acetato de plata (1 mM), después se dejó incubar por 24 h a temperatura ambiente y en un lugar accesible a luz ambiental. Además se realizaron diferentes controles experimentales: i) una muestra como la anterior se cubrió de la luz con papel aluminio y se incubo en la oscuridad a temperatura ambiente por 24 h. ii) una muestra conteniendo únicamente acetato de plata se incubo por 24 h expuesta a temperatura ambiente y luz ambiental. iii) finalmente, una muestra conteniendo TVP6 y acetato de plata se incubo por 24 h expuesta a una lámpara de luz blanca.

### **8.2.3 Caracterización**

Las mediciones de absorbancia se hicieron en un espectrofotómetro Cary 100 UV-vis (Varian Inc., Palo Alto, CA). Para el análisis de microscopía electrónica de transmisión las muestras se prepararon depositando 5  $\mu$ l de la muestra en rejillas de cobre cubiertas con carbono (Ted Pella), después de 60 s el exceso de solución se eliminó usando papel filtro y se dejó secar durante la noche, las muestras se analizaron usando un microscopio TEM (JEOL 4000EX). Para el análisis de microscopía de fuerza atómica se depositaron 100  $\mu$ l de las muestras sobre mica, después de 15 min el exceso de muestra se eliminó con papel filtro, finalmente las muestras se lavaron con 1000  $\mu$ l de agua desionizada y se dejaron secar en vacío durante 2 h. El análisis de AFM se hizo en modo de contacto intermitente en condiciones ambientales, se usaron puntas de silicio y se empleó un microscopio JSPM-5200 de JEOL, Japón para el análisis.

### **8.2.4 Cálculos teóricos**

Se realizó el análisis de la interacción entre un cúmulo de cuatro átomos de plata ( $\text{Ag}_4$ ) y los amino ácidos aspártico (D), glutámico (E) y cisteína (C) usando la teoría del funcional

de la densidad (DFT). Se usó el paquete numérico DMol<sup>3</sup> implementado en el paquete Material Studio Modeling 3.1 de Accelrys, Inc. Los cálculos con DMol<sup>3</sup> se caracterizan por ser rápidos, precisos y la posibilidad de realizar cálculos a gran escala. Las optimizaciones se llevaron a cabo con la aproximación del potencial del gradiente general (GGA) rPBE junto con el conjunto de bases doble numérico más funciones de polarización en todos los átomos (DNP).

Las energías de formación de complejo ( $\Delta E^{\text{complex}}$ ) de los sistemas, para poder determinar su estabilidad con respecto a las interacciones aminoácidos/átomos de plata, se calcularon usando la aproximación de variación supramolecular:

$$\Delta E^{\text{complex}} = E^{\text{complex}} - (E^{\text{aa}} + E^{\text{Ag}_4}).$$

Además de analizar la interacción con aminoácidos individuales también se probó la interacción del cumulo de plata con péptidos cortos conformados por dos aminoácido con afinidad (D, E o C) unidos por una glicina (A).

## **8.3 Resultados y discusión**

### **8.3.1 Resultados experimentales**

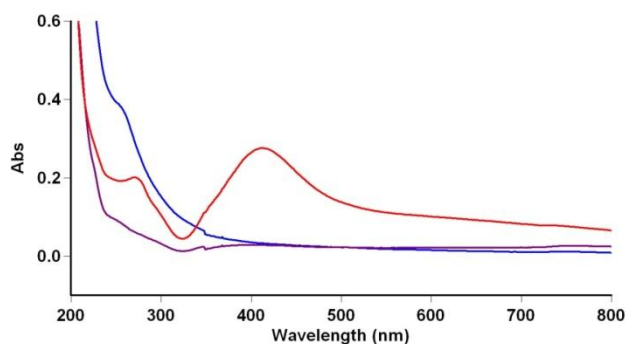
Como señalamos en la metodología los tubos de VP6 se incubaron con acetato de plata durante 24 h, después de este período las muestras se inspeccionaron visualmente. Las muestras de TVP6 incubada con acetato de plata expuesta a luz ambiental (TVP6/Ag/luz) mostraron un cambio de color, de translúcido a amarillo. En contraste, las muestras de tubos de VP6 incubadas con acetato incubadas en oscuridad (TVP6/Ag/oscuridad)

permanecieron translúcidas. De forma similar, el acetato de plata solo (Ag/luz) expuesto a luz ambiental permaneció sin cambio. Finalmente la muestra de TVP6/Ag incubada bajo una lámpara blanca (TVP6/Ag/lámpara) cambio de translucido a amarillo. El cambio del color en las soluciones de TVP6/Ag/luz y TVP6/Ag/lámpara se interpreta como la conversión de los iones de plata (AgI) en plata (Ag).

Las muestras se analizaron por UV-vis (vea Figura 33). El espectro de absorbancia de la muestra TVP6/Ag/luz (línea roja) mostró dos picos de absorción, uno a 280 nm y el segundo a 410 nm. El pico de absorción centrado a 280 nm es referencia del material proteico, en tanto que el pico a 410 nm corresponde al efecto de resonancia plasmonica de las nanopartículas de plata, además observamos una elevación de la línea base, lo cual es un indicativo de que hay una agregación de AgNPs. La muestra de TVP6/Ag/oscuridad (línea azul) mostró solamente un pico a 250 nm que resulta del desplazamiento del pico de 280 nm hasta 250 nm, además hay un incremento en la absorbancia mostrando que hay más residuos aromáticos expuestos dentro del ambiente acuoso. Este resultado indica que el microambiente de los aminoácidos aromáticos fue alterado y la estructura terciaria de VP6 fue modificada. Además no se observó el pico de absorción a 410 nm evidenciando la ausencia de AgNPs. El espectro del acetato de plata solo expuesto a la luz (Ag/luz) (línea morada) no mostró ningún pico de absorción. Los resultados en su conjunto muestran que se requiere de la plantilla biológica y la luz ambiental para la formación de nanopartículas, ya que en ausencia de uno u otro la formación de las AgNPs no ocurre<sup>90</sup>.

Como se mencionó, la muestra que se mantuvo en oscuridad mostró un desplazamiento hacia 250 nm, indicativo de una desnaturalización del material proteico. Lepault y

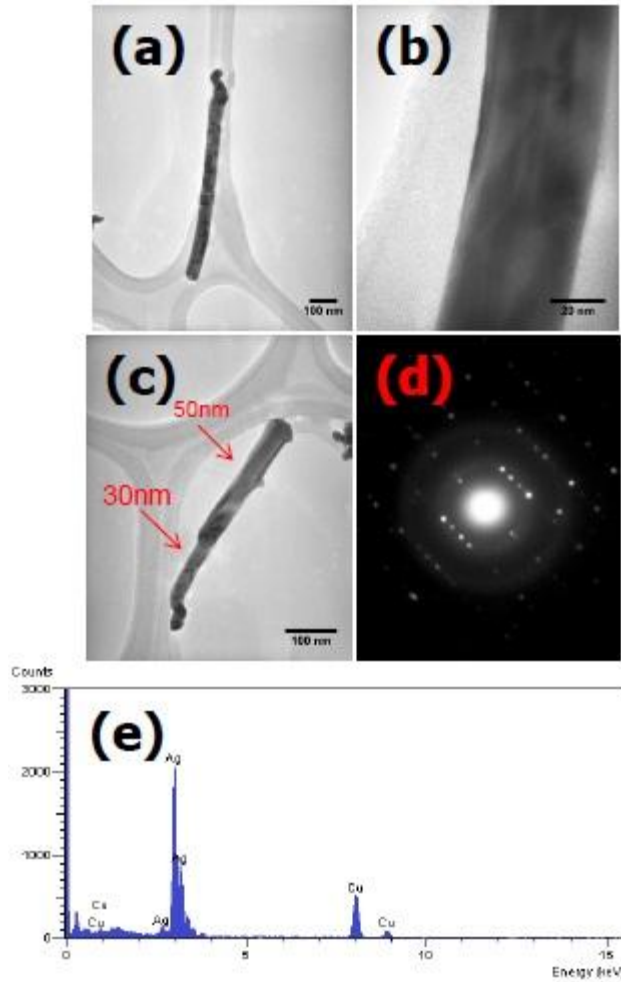
colaboradores<sup>87</sup> mencionan la proteína VP6 es sensible a cambios en pH y fuerza iónica. Una posible explicación a este fenómeno es que la adición de acetato de plata provocó un cambio de pH en el ambiente de los tubos, de neutro (pH 7.0) a básico (pH 9.0), por lo tanto las muestras estuvieron en un ambiente básico durante un periodo prolongado y es bien sabido que las proteínas que son expuestas a ambientes básicos tienden a sufrir cambios en su estructura nativa. La razón por la cual los tubos que estuvieron expuestos a acetato de plata y luz ambiental, y por tanto también a un ambiente básico, y no se desnaturalizaron, es que los iones de plata fueron capturados de la solución y se incorporaron en la formación de AgNPs, las cuales cubrieron los tubos y le dieron protección a los tubos; es bien sabido que los híbridos son más resistentes a cambio de pH y de temperatura que la plantilla sola<sup>91</sup>.



**Figura 33:** Espectros de UV-Vis de nanotubos de VP6 funcionalizados con nanopartículas de plata. La línea roja corresponde a los híbridos TVP6/Ag expuestos a luz ambiental, en tanto que la línea azul a los híbridos TVP6/Ag que se mantuvieron en oscuridad y finalmente la línea morada a la solución de acetato de plata expuesta a luz ambiental.

Las imágenes TEM del híbrido TVP6/Ag/luz mostraron los tubos de VP6 son cubiertos con una película de plata (vea figura 34 (a)). Las arquitecturas resultantes fueron nanomateriales 1D con dimensiones homogéneas, diámetros alrededor de 50 nm y longitudes superiores a los 700 nm. Tomando en cuenta que el contraste negativo se debe a las partículas de plata, los tubos son cubiertos por una película continua, sin embargo la densidad fue heterogénea, ya que diversos segmentos se observaron con menor contraste/densidad. Debido a factores como el tamaño de las NPs y su gran coalescencia no se apreció la frontera entre las NPs (figura 34 (b)). En general los alambres se observaron monodispersos. Los patrones de difracción permitieron comprobar la naturaleza cristalina de la cubierta, además el análisis EDS confirmó está compuesta por plata (figura 34 (d) y (e)). La imagen mostrada en la figura 34 (c) resulta interesante debido a que un número de nanoalambres mostraron regiones o segmentos con diámetros reducidos de 30 nm. Los tubos de VP6 son estructuras cilíndricas con un diámetro exterior de 45 nm y una cavidad interna con un diámetro de alrededor de 30 nm. La concordancia del diámetro reducido de los alambres con el diámetro interno de los tubos de VP6 sugiere los tubos son alternativamente rellenos con NPs de plata.

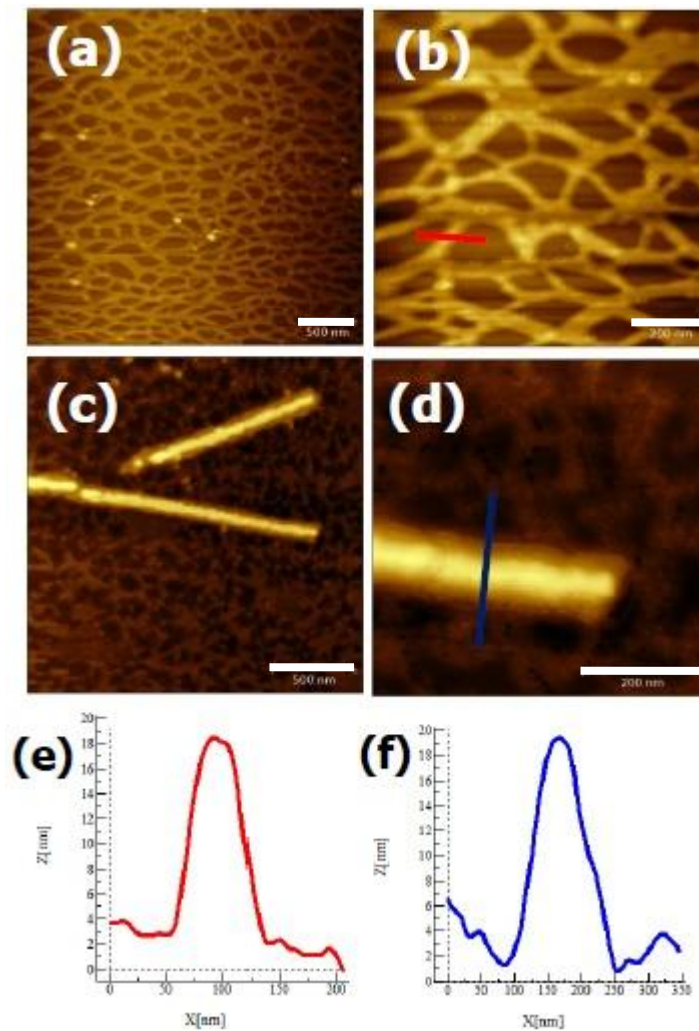




**Figura 34:** Imágenes de microscopía de transmisión de híbridos TVP6/Ag expuestos a luz ambiental. Las muestras no fueron teñidas, por tanto el contraste observado se debe únicamente a las partículas de plata. En (a) y (b) se muestran imágenes de un híbrido y un acercamiento respectivamente. En (c) se muestra un híbrido con diferentes grosores. En (d) y (e) se muestran el patrón de difracción y análisis elemental obtenidos sobre los híbridos. Escala de barras, 100 nm (a) y (c) y 20 nm (b).

Las muestras del híbrido TVP6/Ag/luz se analizaron por microscopía de fuerza atómica (vea figura 35). Imágenes de los tubos de VP6 prístinos indican que los tubos pueden adquirir empaquetamientos como enrejado (vea figura 35 (a) y (b)), característica que ha

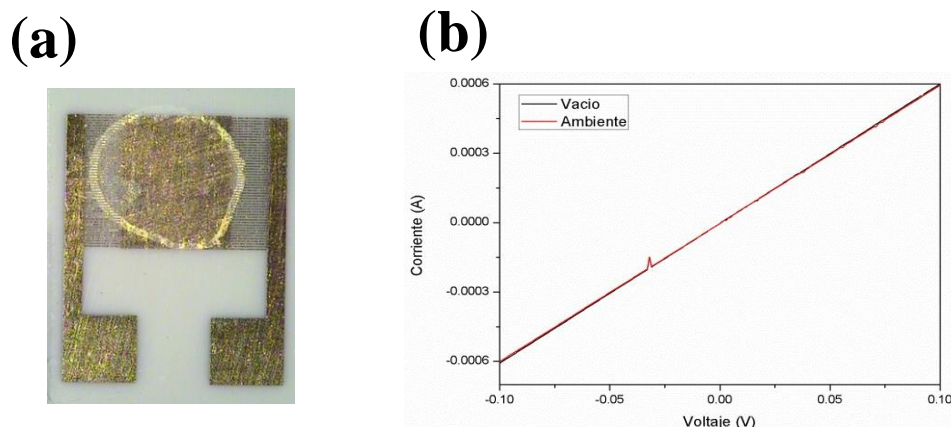
sido observada en grandes polímeros 1D. La altura y el diámetro de los tubos de acuerdo su sección transversal es de 20 nm y sus diámetros de 80 nm (figura 35 (e)). La altura es corta y el diámetro mayor en relación con las dimensiones conocidas por imágenes de TEM y criomicroscopía electrónica. Esta divergencia en dimensiones se debe a que las biomoléculas son estructuras flexibles y tienden a aplanarse sobre superficies sólidas, además los análisis se realizaron en muestras secas, la ausencia de agua afecta su tonicidad<sup>92</sup>. Las imágenes de los híbridos (TVP6/Ag/luz) mostraron cambios en relación a los tubos prístinos, se observó una reducción en la longitud de los híbridos ( $< 1 \mu\text{m}$ ), además su flexibilidad disminuyó. El análisis de la sección transversal mostro los híbridos tienen alturas similares a los tubos prístinos (20 nm), sin embargo tienen un incremento de 20 nm en su diámetro con respecto a los prístinos, este incremento corrobora la existencia de una cubierta sobre los tubos. A diferencia del análisis de TEM, las imágenes de AFM permitieron observar la película no es completamente lisa sino con irregularidades en su superficie.



**Figura 35:** Imágenes de AFM de híbridos AgNPs/VP6 obtenidos. En (a) y (b) se muestran imágenes de tubos de VP6 prístinos, mientras que en (c) y (d) los híbridos obtenidos. En (e) y (f) se muestran la sección de transversal de (a) y (c) respectivamente. Escalas de barras 500 nm (a) y (c) y 200 nm (b) y (d).

Una de las principales aplicaciones de los materiales híbridos es en dispositivos eléctricos, por lo cual se analizó la conductividad eléctrica de los nanoalambres generados. Los alambres fueron depositados en electrodos de oro fabricados por litografía sobre alúmina con una distancia de 3  $\mu\text{m}$  entre cada polo (vea figura 36 (a)). En la gráfica 35 se muestra la

corriente contra el voltaje ( $I$ - $V$ ), los análisis se realizaron en condiciones ambientales (línea roja) y en vacío  $1 \times 10^{-4}$  (línea negra). Como muestran las curvas, los nanolambres son conductores con un comportamiento óhmico característico de los metales. Sin embargo, tomando en consideración nuestras condiciones, el material tiene una resistencia de  $1.66 \times 10^{-4} (\Omega \cdot m)$ , órdenes de magnitud superior a la de la plata en bulto  $1.59 \times 10^{-8} (\Omega \cdot m)$ . Estos resultados nos indican que hay flujo de electrones, indicando que hay contacto entre los nanoalambres y de estos con los electrodos de oro, pero presentan una resistencia eléctrica superior a la de la plata<sup>93</sup>.

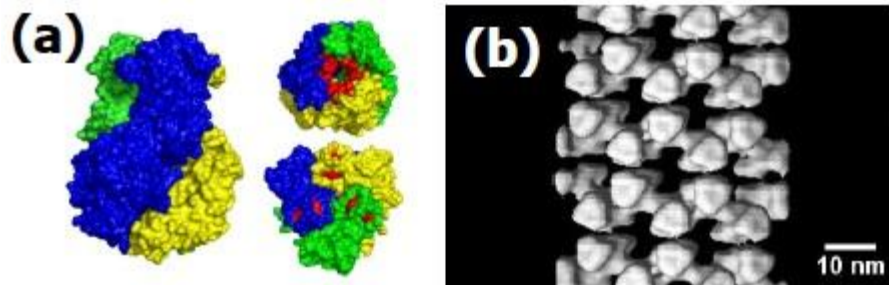


**Figura 36:** fotografía de electrodo de oro (a) y grafica de corriente ( $I$ ) contra voltaje ( $V$ ) de nanoalambres de plata (b).

Reportes previos han mostrado la viabilidad del uso en conjunto de plantillas biológicas y luz ambiental como reductor para la síntesis de nanopartículas metálicas<sup>90,26</sup>. Estos mencionan la reducción de los iones de plata, nucleación y crecimiento de las NPs es resultado de un fenómeno cooperativo entre la plantilla biológica y la luz ambiental. En nuestro trabajo esta hipótesis se corroboró, ya que en las muestras control en la ausencia de luz o en la ausencia de la plantilla la reducción no ocurre. La influencia de la plantilla

biológica y de la luz ambiental aún permanece sin ser entendidos completamente. Sin embargo, es aceptado que las biomoléculas actúan como surfactantes, estabilizan las partículas de su aglomeración, controlan la forma, tamaño, y organización de las partículas<sup>94</sup>. Su influencia proviene de su habilidad para interactuar con los precursores metálicos. La técnica del fago mostrador ha permitido la identificación de varios motivos que tienen una gran afinidad por nanopartículas de plata y median su reducción. Los motivos son ricos en aminoácidos como tirosina, asparraguina, histidina, ácido glutámico y aspártico<sup>90,95</sup>.

El análisis de la estructura cristalina de la proteína VP6 disponible en el pdb (1QHD) muestra la unidad biológica es un trímero donde se distinguen dos dominios; una cabeza y una base (vea figura 37 (a)), la cabeza es la región que forma la superficie externa de los tubos y la base queda expuesta hacia la luz del tubo (vea figura 37 (b)). El análisis de la secuencia primaria de la región de la cabeza muestra que tiene aminoácidos que forman un anillo electro negativo formado por ácido glutámico y aspártico, además en el anillo hay asparraguinas, histidinas y tirosinas. Esta región probablemente es el sitio de unión de los iones, posteriormente se transforman e inician su cristalización hasta alcanzar el tamaño de nanopartículas, como paso adicional inicia la coalescencia con nanopartículas vecinas para formar la cubierta sobre los tubos.



**Figura 37:** (a) Modelo molecular de trímero de la proteína VP6 en orientación ortogonal, cada monómero es representado con un color. Del lado derecho se muestran la vista superior e inferior del trímero, en ambas los aminoácidos con carga negativa se marcan con rojo. (b) ilustración esquemática de los TVP6 ensamblados.

### 8.3.1 Resultados teóricos

Como mencionamos la interface proteínas-nanopartículas de plata es de gran importancia en el área biológica como en ciencia materiales<sup>43</sup>. El análisis a nivel atómico de la interacción entre aminoácidos y nanopartículas de plata puede ayudar a elucidar el fenómeno a mayor escala. La teoría del funcional de la densidad (DFT) es una herramienta útil para analizar la interacción entre biomoléculas pequeñas y nanomateriales. En particular se ha empleado para estudiar la formación de complejos nanocúmulos de plata con bases nitrogenadas y cadenas cortas<sup>96,97,98</sup>. Desafortunadamente estudios de la formación de complejos de nanocúmulos con aminoácidos son escasos<sup>99,100</sup> y muestran una disparidad con los datos experimentales. La mayoría de los trabajos presentan a los aminoácidos arginina, lisina e histidina como los que tienen una interacción mayor con la plata Ag (I). Varios factores pueden estar favoreciendo estos resultados por ejemplo; los modelos no restringen la interacción con la cadena lateral y permiten la interacción con las terminales amino y carbonilo, permitiendo un mayor número de contactos. En contraste en

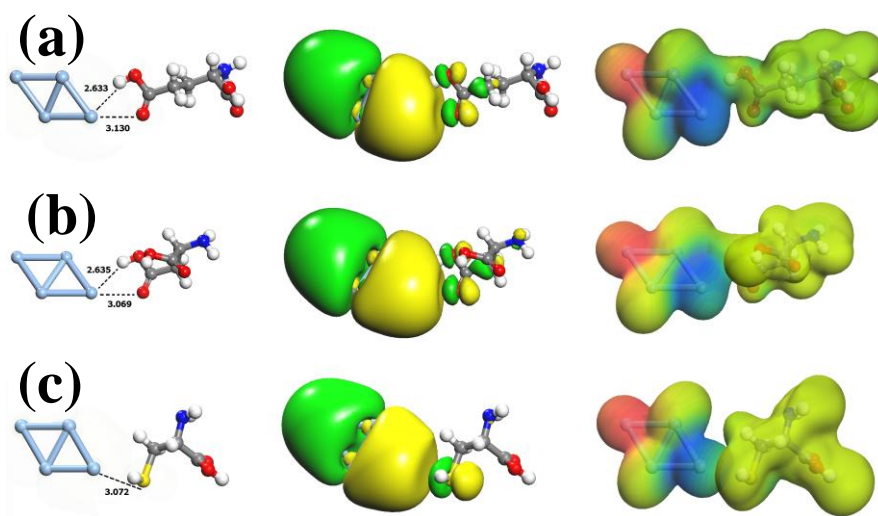
los modelos experimentales la interacción se restringe a la cadena lateral ya que las proteínas son polipéptidos y las terminales no están accesibles en la mayoría de los casos. Tomando esto en consideración se modeló la interacción de los aminoácidos ácidos aspártico (D), glutámico (E) y cisteína (C) con un nano cúmulo de plata Ag<sub>4</sub>. Como característica particular se probaron varias configuraciones restringidas a las cadenas laterales. Adicionalmente, se modeló la interacción de Ag<sub>4</sub> con péptidos cortos de tres aminoácidos generados combinando los aminoácidos cisteína, glutámico y aspártico, se usó la glicina como aminoácido de unión entre ellos. Las combinaciones resultantes fueron las siguientes: (EAC), (CAE), (DAC) y (CAD).

En la tabla 1 se muestran las propiedades físicas de los complejos,  $\Delta E^{\text{complex}}$  es la energía de formación del complejo en kJ.mol,  $\text{GAP}^{\text{aa}}$  es la banda prohibida HOMO/LUMO de los aminoácidos (aa) y  $\text{GAP}^{\text{Ag}_4\text{-aa}}$  es la banda prohibida HOMO/LUMO del complejo Ag<sub>4</sub>-aminoácidos. Las energías de formación indican que el complejo glutámico-Ag<sub>4</sub> tiene la mayor energía de formación.

System	Energies		
	$\Delta E^{\text{complex}}$	$\text{GAP}^{\text{aa}}$	$\text{GAP}^{\text{Ag}_4\text{-aa}}$
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -Glu	-21.8	4.28	0.77
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -Asp	-11.0	4.37	0.76
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -Cys	-9.6	4.39	0.67
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -EAC	-10.6	3.57	0.76
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -CAE	-3.5	3.57	0.80
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -DAC	-55.1	3.97	1.52
<i>Ag</i> <sub>4</sub> -CAD	-14.6	3.97	0.67

**Tabla 1:** energías de formación calculadas para la interacción entre los cúmulos de plata Ag<sub>4</sub> con aminoácidos solos y con péptidos cortos. La energía de brecha HOMO-LUMO para los aminoácidos y los complejos son dadas en electrón volts (eV).

Las estructuras finales corroboran que la interacción ocurre con las cadenas laterales de los aminoácidos (vea Figura 38 (izquierda)). No se observaron diferencias significativas comparando las distancia entre el cúmulo de plata y la cadena lateral de los aminoácidos. Uno de los factores que explica la estabilidad del complejo con el ácido glutámico es que presenta una mayor reactividad debido a su brecha HOMO/LUMO reducida (4.28 eV). En general las energías de brecha HOMO/LUMO de los complejos muestran una reducción debido a la interacción con los cúmulos de plata. Además, la forma de los orbitales HOMO puede ser usada para probar la existencia de interacciones entre los aminoácidos y los cúmulos de plata<sup>101</sup>.



**Figura 38:** Estructuras optimizadas (izquierda) de los complejos consistiendo de los cúmulos Ag<sub>4</sub> y los aminoácidos glutámico, aspártico y cisteína, figuras (a), (b) y (c) respectivamente. Los orbitales HOMO para cada uno de los conjugados (a 0.017 au) se muestran en el centro. El potencial electrostático de los complejos se graficó sobre la función del orbital HOMO y se muestran a la derecha.



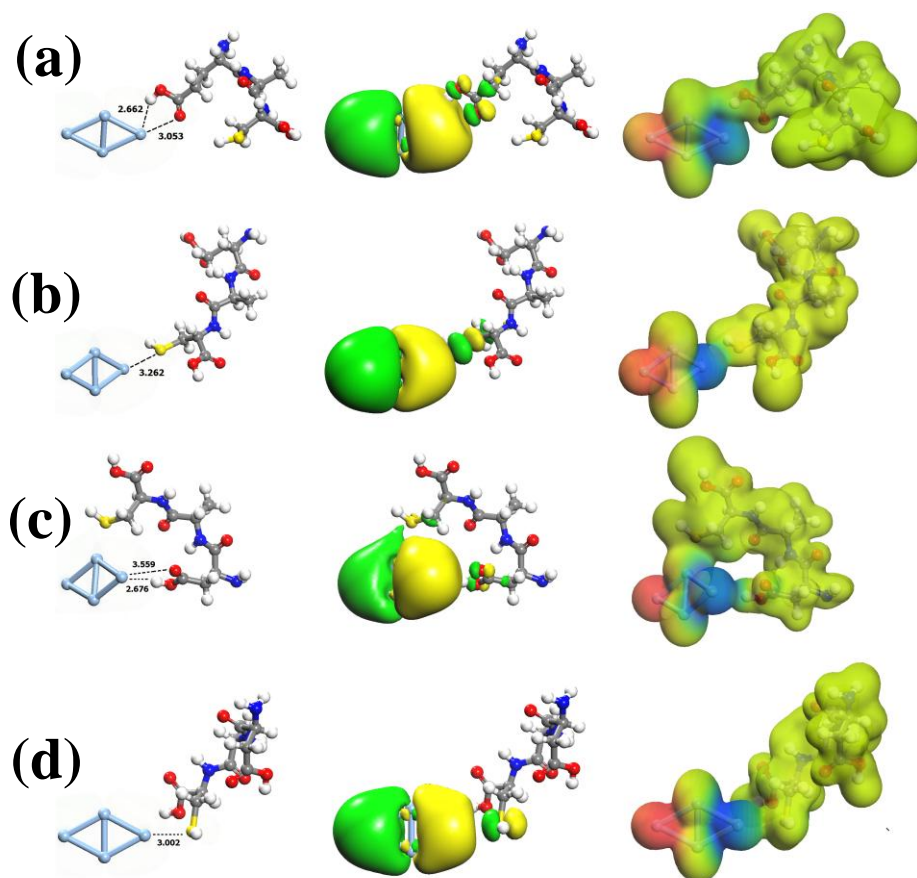
En la figura 38 (centro) se grafican los orbitales HOMO de los complejos, en estas resulta evidente que hay deformaciones en las cadenas laterales y en los cúmulos evidenciando son las regiones reactivas para el enlace. Interesante resultan los mapas del potencial electrostático, los cuales indican que en todos los casos los cúmulos de plata sufrieron una redistribución de carga, resultando en la polarización de los cúmulos (figura 38 (derecha)). Este comportamiento es bien conocido para conjugados de nanopartículas y proteínas, ya que las proteínas tienden a oxidar las nanopartículas de plata.

La figura 39 (izquierda) muestra las estructuras optimizadas de péptidos cortos formando complejos con el cúmulo de plata (Ag<sub>4</sub>). Las energías de formación contrastan con las de los aminoácidos solos ya que la energía de formación fue mayor con el aspártico (D). Una posible explicación es que al formar parte de los péptidos cortos, se ocasionan impedimentos estéricos en las cadenas laterales de los aminoácidos. Al igual que en los aminoácidos solos, los orbitales HOMO de los elementos de los conjugados mostraron distorsiones evidenciando las cadenas laterales de los aminoácidos contribuyen en la interacción (figura 39 (centro)). Los mapas de la energía potencial también indican que los cúmulos de plata sufrieron una redistribución de carga, resultando en la polarización de los cúmulos (figura 39 (derecha)).

#### **8.4 Conclusión**

En este trabajo presentamos una nueva aproximación para la producción de nanoalambres basada en ensamblajes de la proteína viral VP6. Nuestros resultados muestran los grupos funcionales presentes en el ensamblaje en combinación con luz ambiente facilitan la reducción de los iones de plata. Finalmente, se corroboró teóricamente la interacción entre

las cadenas laterales de aminoácidos como aspártico, glutámico y cisteína con los cúmulos de plata.



**Figura 39:** Estructuras optimizadas (izquierda) de los complejos consistiendo de los cúmulos Ag<sub>4</sub> y los péptidos cortos EAC, CAE, DAC y CAD, figuras (a), (b), (c) y (d), respectivamente. El orbital frontera HOMO para cada uno de los conjugados (a 0.017 au) se muestran en el centro. El potencial electrostático de los complejos se graficó sobre la función del orbital HOMO y se muestra a la derecha.

## 9. Conclusiones generales

En este trabajo se planteó el uso de estructuras supramoleculares, ensambles de arquitecturas globulares como la albumina sérica humana (HSA), estructuras esféricas y toroides generadas a partir del virus del mosaico del tabaco (TMV) y tubos ensamblados de la proteína viral VP6 de proteínas virales, como plantillas para la producción de nanomateriales híbridos.

La albumina sérica humana puede actuar como molécula puente entre nanocúmulos de plata y nanotubos de carbono para la fabricación de nanomateriales híbridos 1D. Estos materiales híbridos finales resultan tóxicos para glóbulos rojos.

Las esféricas y toroides obtenidos mediante el tratamiento térmico de la cápside del virus del mosaico del tabaco resultaron ser estructuras supramoleculares con arquitectura tridimensional definida y constante. Estas estructuras poseen cargas negativas en regiones accesibles al solvente que sirven como centros de deposición de los precursores metálicos, y al adicionar un agente reductor sirven como sitios de anclaje y estabilización de nanopartículas metálicas.

Los tubos de la proteína VP6 son estructuras supramoleculares con centros de deposición de los precursores metálicos, y al exponerlos a un agente reductor sirven como sitios de anclaje y estabilización de nanopartículas metálicas. La funcionalización de los tubos con nanopartículas permite la formación de nanoalambres con un comportamiento óhmico.

La utilización de estructuras altamente organizadas permitió la formación de materiales híbridos de alta calidad, las plantillas conservaron su macroestructura y la fase inorgánica creció a lo largo de las superficies con grupos funcionales con afinidad por iones de plata.

El número de grupos funcionales por área de superficie y la geometría de la plantilla definieron el grado de funcionalización y las características de las nanopartículas metálicas.

Los nanomateriales sintetizados poseen características que los hacen atractivos para aplicaciones en diversas áreas: Biomedicina, ciencias de materiales, bioelectrónicos, y catálisis, entre otros.

## 10. Bibliografía

1. Engineering, T. R. S. T. R. A. o. *Nanoscience and Nanotechnologies*; 2004; pp 7-18.
2. Ge, J.; Lei, J.; Zare, R. N., Protein-inorganic hybrid nanoflowers. *Nature Nanotechnology* **2012**, 7 (7), 428-432.
3. Douglas, T.; Young, M., Viruses: Making friends with old foes. *Science* **2006**, 312 (5775), 873-875.
4. Pokorski, J. K.; Steinmetz, N. F., The art of engineering viral nanoparticles. *Molecular Pharmaceutics* **2011**, 8 (1), 29-43.
5. Stephanopoulos, N.; Francis, M. B., Making New Materials from Viral Capsids. 2012; Vol. 9, pp 247-266.
6. Lee, S. Y.; Lim, J. S.; Harris, M. T., Synthesis and application of virus-based hybrid nanomaterials. *Biotechnology and Bioengineering* **2012**, 109 (1), 16-30.
7. Sun, Y.; Mayers, B.; Herricks, T.; Xia, Y., Polyol synthesis of uniform silver nanowires: A plausible growth mechanism and the supporting evidence. *Nano Letters* **2003**, 3 (7), 955-960.
8. Rycenga, M.; Cobley, C. M.; Zeng, J.; Li, W.; Moran, C. H.; Zhang, Q.; Qin, D.; Xia, Y., Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chemical Reviews* **2011**, 111 (6), 3669-3712.
9. García-Calzón, J. A.; Díaz-García, M. E., Synthesis and analytical potential of silica nanotubes. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2012**, 35, 27-38.
10. Hötzer, B.; Medintz, I. L.; Hildebrandt, N., Fluorescence in nanobiotechnology: Sophisticated fluorophores for novel applications. *Small* **2012**, 8 (15), 2297-2326.
11. Das, A.; Zhao, J.; Schatz, G. C.; Sligar, S. G.; Van Duyne, R. P., Screening of type I and II drug binding to human cytochrome P450-3A4 in nanodiscs by localized surface plasmon resonance spectroscopy. *Analytical Chemistry* **2009**, 81 (10), 3754-3759.
12. Qian, X.; Peng, X. H.; Ansari, D. O.; Yin-Goen, Q.; Chen, G. Z.; Shin, D. M.; Yang, L.; Young, A. N.; Wang, M. D.; Nie, S., In vivo tumor targeting and spectroscopic detection with surface-enhanced Raman nanoparticle tags. *Nature Biotechnology* **2008**, 26 (1), 83-90.
13. Chaloupka, K.; Malam, Y.; Seifalian, A. M., Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology* **2010**, 28 (11), 580-588.
14. Lu, Y.; Chen, W., Sub-nanometre sized metal clusters: From synthetic challenges to the unique property discoveries. *Chemical Society Reviews* **2012**, 41 (9), 3594-3623.
15. Liu, Z.; Tabakman, S.; Welsher, K.; Dai, H., Carbon nanotubes in biology and medicine: In vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* **2009**, 2 (2), 85-120.
16. Mann, S., Self-assembly and transformation of hybrid nano-objects and nanostructures under equilibrium and non-equilibrium conditions. *Nature Materials* **2009**, 8 (10), 781-792.
17. Blum, A. S.; Soto, C. M.; Wilson, C. D.; Cole, J. D.; Kim, M.; Gnade, B.; Chatterji, A.; Ochoa, W. F.; Lin, T.; Johnson, J. E.; Ratna, B. R., Cowpea mosaic virus as a scaffold for 3-D patterning of gold nanoparticles. *Nano Letters* **2004**, 4 (5), 867-870.
18. Bromley, K. M.; Patil, A. J.; Perriman, A. W.; Stubbs, G.; Mann, S., Preparation of high quality nanowires by tobacco mosaic virus templating of gold nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, 18 (40), 4796-4801.
19. Sharma, V. K.; Yngard, R. A.; Lin, Y., Silver nanoparticles: Green synthesis and

- their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science* **2009**, *145* (1-2), 83-96.
20. Xie, J.; Lee, J. Y.; Wang, D. I. C.; Ting, Y. P., Silver nanoplates: From biological to biomimetic synthesis. *ACS Nano* **2007**, *1* (5), 429-439.
21. Si, S.; Mandal, T. K., Tryptophan-based peptides to synthesize gold and silver nanoparticles: A mechanistic and kinetic study. *Chemistry - A European Journal* **2007**, *13* (11), 3160-3168.
22. Li, S.; Shen, Y.; Xie, A.; Yu, X.; Qiu, L.; Zhang, L.; Zhang, Q., Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* L. extract. *Green Chemistry* **2007**, *9* (8), 852-858.
23. Eckhardt, S.; Brunetto, P. S.; Gagnon, J.; Priebe, M.; Giese, B.; Fromm, K. M., Nanobio Silver: Its Interactions with Peptides and Bacteria, and Its Uses in Medicine. *Chemical Reviews* **2013**, *113* (7), 4708-4754.
24. Guo, C.; Irudayaraj, J., Fluorescent Ag Clusters via a Protein-Directed Approach as a Hg(II) Ion Sensor. *Analytical Chemistry* **2011**, *83* (8), 2883-2889.
25. Zhou, T.; Huang, Y.; Li, W.; Cai, Z.; Luo, F.; Yang, C. J.; Chen, X., Facile synthesis of red-emitting lysozyme-stabilized Ag nanoclusters. *Nanoscale* **2012**, *4* (17), 5312-5315.
26. Eisele, D. M.; Berlepsch, H. V.; Böttcher, C.; Stevenson, K. J.; Vanden Bout, D. A.; Kirstein, S.; Rabe, J. P., Photoinitiated growth of sub-7 nm silver nanowires within a chemically active organic nanotubular template. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (7), 2104-2105.
27. Yu, L.; Banerjee, I. A.; Matsui, H., Direct Growth of Shape-Controlled Nanocrystals on Nanotubes via Biological Recognition. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (48), 14837-14840.
28. Dujardin, E.; Peet, C.; Stubbs, G.; Culver, J. N.; Mann, S., Organization of metallic nanoparticles using tobacco mosaic virus templates. *Nano Letters* **2003**, *3* (3), 413-417.
29. Reches, M.; Gazit, E., Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes. *Science* **2003**, *300* (5619), 625-627.
30. Kumara, M. T.; Tripp, B. C.; Muralidharan, S., Self-assembly of metal nanoparticles and nanotubes on bioengineered flagella scaffolds. *Chemistry of Materials* **2007**, *19* (8), 2056-2064.
31. Talham, D. R., Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry Stephen Mann. Oxford University Press, New York, 2001. *Crystal Growth & Design* **2002**, *2* (6), 675-675.
32. Armbrust, E. V., The life of diatoms in the world's oceans. *Nature* **2009**, *459* (7244), 185-192.
33. Nudelman, F.; Sommerdijk, N. A. J. M., Biomineralization as an inspiration for materials chemistry. *Angewandte Chemie - International Edition* **2012**, *51* (27), 6582-6596.
34. Sugio, S.; Kashima, A.; Mochizuki, S.; Noda, M.; Kobayashi, K., Crystal structure of human serum albumin at 2.5 Å resolution. *Protein Engineering* **1999**, *12* (6), 439-446.
35. Belatik, A.; Hotchandani, S.; Carpentier, R.; Tajmir-Riahi, H.-A., Locating the Binding Sites of Pb(II) Ion with Human and Bovine Serum Albumins. *PLoS ONE* **2012**, *7* (5), e36723.
36. Ge, C.; Du, J.; Zhao, L.; Wang, L.; Liu, Y.; Li, D.; Yang, Y.; Zhou, R.; Zhao, Y.; Chai, Z.; Chen, C., Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108* (41), 16968-16973.
37. Carreño-Fuentes, L.; Ascencio, J. A.; Medina, A.; Aguila, S.; Palomares, L. A.;

- Ramírez, O. T., Strategies for specifically directing metal functionalization of protein nanotubes: Constructing protein coated silver nanowires. *Nanotechnology* **2013**, *24* (23).
38. Rodger, A., UV Absorbance Spectroscopy of Biological Macromolecules. In *Encyclopedia of Biophysics*, Roberts, G. K., Ed. Springer Berlin Heidelberg: 2013; pp 2714-2718.
39. Schmid, G.; Pugin, R.; Meyer-Zaika, A. W.; Simon, U., Clusters on clusters: closedodecaborate as a ligand for Au<sub>55</sub> clusters. *European Journal of Inorganic Chemistry* **1999**, (11), 2051-2055.
40. Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **1986**, *56* (9), 930-933.
41. Binnig, G.; Rohrer, H.; Gerber, C.; Weibel, E., Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters* **1982**, *40* (2), 178-180.
42. Eaton, P., *Atomic Force Microscopy*  
Oxford University Press: 2010
43. Yang, S.-T.; Liu, Y.; Wang, Y.-W.; Cao, A., Biosafety and Bioapplication of Nanomaterials by Designing Protein–Nanoparticle Interactions. *Small* **2013**, *9* (9-10), 1635-1653.
44. Mathew, A.; Sajanlal, P. R.; Pradeep, T., A fifteen atom silver cluster confined in bovine serum albumin. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (30), 11205-11212.
45. Le Guével, X.; Spies, C.; Daum, N.; Jung, G.; Schneider, M., Highly fluorescent silver nanoclusters stabilized by glutathione: A promising fluorescent label for bioimaging. *Nano Res.* **2012**, *5* (6), 379-387.
46. Zhao, X.; Liu, R.; Chi, Z.; Teng, Y.; Qin, P., New insights into the behavior of bovine serum albumin adsorbed onto carbon nanotubes: Comprehensive spectroscopic studies. *Journal of Physical Chemistry B* **2010**, *114* (16), 5625-5631.
47. Dzwolak, W.; Smirnovas, V.; Jansen, R.; Winter, R., Insulin forms amyloid in a strain-dependent manner: An FT-IR spectroscopic study. *Protein Science* **2004**, *13* (7), 1927-1932.
48. Ramasamy, P.; Guha, S.; Shibu, E. S.; Sreeprasad, T. S.; Bag, S.; Banerjee, A.; Pradeep, T., Size tuning of Au nanoparticles formed by electron beam irradiation of Au<sub>25</sub> quantum clusters anchored within and outside of dipeptide nanotubes. *Journal of Materials Chemistry* **2009**, *19* (44), 8456-8462.
49. Deng, Z.; Thontasen, N.; Malinowski, N.; Rinke, G.; Harnau, L.; Rauschenbach, S.; Kern, K., A close look at proteins: Submolecular resolution of two- and three-dimensionally folded cytochrome c at surfaces. *Nano Letters* **2012**, *12* (5), 2452-2458.
50. Davis, J. J.; Allen O Hill, H.; Kurz, A.; Jacob, C.; Maretb, W.; Vallee, B. L., A scanning tunneling microscopy study of rabbit metallothionein. *PhysChemComm* **1998**, *1*.
51. Meng, J.; Cheng, X.; Liu, J.; Zhang, W.; Li, X.; Kong, H.; Xu, H., Effects of long and short carboxylated or aminated multiwalled carbon nanotubes on blood coagulation. *PLoS ONE* **2012**, *7* (7).
52. Shang, L.; Dörlich, R. M.; Trouillet, V.; Bruns, M.; Nienhaus, G. U., Ultrasmall fluorescent silver nanoclusters: Protein adsorption and its effects on cellular responses. *Nano Res.* **2012**, *5* (8), 531-542.
53. Kostarelos, K.; Bianco, A.; Prato, M., Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature Nanotechnology* **2009**, *4* (10), 627-633.
54. Nithiyasri, P.; Balaji, K.; Brindha, P.; Parthasarathy, M., Programmable self-

assembly of carbon nanotubes assisted by reversible denaturation of a protein. *Nanotechnology* **2012**, *23* (46).

55. Meng, J.; Cheng, X.; Liu, J.; Zhang, W.; Li, X.; Kong, H.; Xu, H., Effects of Long and Short Carboxylated or Aminated Multiwalled Carbon Nanotubes on Blood Coagulation. *PLoS ONE* **2012**, *7* (7), e38995.

56. Rodríguez-Galván, A.; Contreras-Torres, F. F.; Basiuk, E. V.; Alvarez-Zauco, E.; Heredia, A.; Basiuk, V. A., Aggregation of human serum albumin on graphite and single-walled carbon nanotubes as studied by scanning probe microscopies. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2011**, *11* (6), 5491-5498.

57. Douglas, T.; Young, M., Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* **1998**, *393* (6681), 152-155.

58. Meldrum, F. C.; Heywood, B. R.; Mann, S., Magnetoferritin: In vitro synthesis of a novel magnetic protein. *Science* **1992**, *257* (5069), 522-523.

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

60. Samson, J.; Varotto, A.; Nahirney, P. C.; Toschi, A.; Piscopo, I.; Drain, C. M., Fabrication of metal nanoparticles using toroidal plasmid DNA as a sacrificial mold. *ACS Nano* **2009**, *3* (2), 339-344.

61. Nuraje, N.; Su, K.; Haboosheh, A.; Samson, J.; Manning, E. P.; Yang, N. L.; Matsui, H., Room temperature synthesis of ferroelectric barium titanate nanoparticles using peptide nanorings as templates. *Advanced Materials* **2006**, *18* (6), 807-811.

62. Bayburt, T. H.; Sligar, S. G., Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Letters* **2010**, *584* (9), 1721-1727.

63. Lim, Y.-b.; Lee, M., Toroidal [small beta]-barrels from self-assembling [small beta]-sheet peptides. *Journal of Materials Chemistry* **2011**, *21* (32), 11680-11685.

64. Zahr, O. K.; Blum, A. S., Solution phase gold nanorings on a viral protein template. *Nano Letters* **2012**, *12* (2), 629-633.

65. Liu, N.; Peng, B.; Lin, Y.; Su, Z.; Niu, Z.; Wang, Q.; Zhang, W.; Li, H.; Shen, J., Pulling genetic RNA out of tobacco mosaic virus using single-molecule force spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132* (32), 11036-11038.

66. Panyukov, Y.; Yudin, I.; Drachev, V.; Dobrov, E.; Kurganov, B., The study of amorphous aggregation of tobacco mosaic virus coat protein by dynamic light scattering. *Biophysical Chemistry* **2007**, *127* (1-2), 9-18.

67. Goregaoker, S. P.; Lewandowski, D. J.; Culver, J. N., Identification and Functional Analysis of an Interaction between Domains of the 126/183-kDa Replicase-Associated Proteins of Tobacco Mosaic Virus. *Virology* **2001**, *282* (2), 320-328.

68. Wang, H.; Planchart, A.; Stubbs, G., Caspar carboxylates: The structural basis of tobamovirus disassembly. *Biophysical Journal* **1998**, *74* (1), 633-638.

69. Shenton, W.; Douglas, T.; Young, M.; Stubbs, G.; Mann, S., Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Advanced Materials* **1999**, *11* (3), 253-256.

70. Knez, M.; Kadri, A.; Wege, C.; Gösele, U.; Jeske, H.; Nielsch, K., Atomic layer deposition on biological macromolecules: Metal oxide coating of tobacco mosaic virus and ferritin. *Nano Letters* **2006**, *6* (6), 1172-1177.

71. Royston, E. S.; Brown, A. D.; Harris, M. T.; Culver, J. N., Preparation of silica



- stabilized Tobacco mosaic virus templates for the production of metal and layered nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, 332 (2), 402-407.
72. Karpova, O.; Nikitin, N.; Chirkov, S.; Trifonova, E.; Sheveleva, A.; Lazareva, E.; Atabekov, J., Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens. *Journal of General Virology* **2012**, 93 (2), X400-407.
73. Nikitin, N. A.; Malinin, A. S.; Rakhnyanskaya, A. A.; Trifonova, E. A.; Karpova, O. V.; Yaroslavov, A. A.; Atabekov, J. G., Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles. *Polymer Science - Series A* **2011**, 53 (11), 1026-1031.
74. Bruckman, M. A.; Hern, S.; Jiang, K.; Flask, C. A.; Yu, X.; Steinmetz, N. F., Tobacco mosaic virus rods and spheres as supramolecular high-relaxivity MRI contrast agents. *Journal of Materials Chemistry B* **2013**, 1 (10), 1482-1490.
75. Atabekov, J.; Nikitin, N.; Arkhipenko, M.; Chirkov, S.; Karpova, O., Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles. *Journal of General Virology* **2011**, 92 (2), 453-456.
76. Lim, J. S.; Kim, S. M.; Lee, S. Y.; Stach, E. A.; Culver, J. N.; Harris, M. T., Quantitative study of Au(III) and Pd(II) ion biosorption on genetically engineered Tobacco mosaic virus. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, 342 (2), 455-461.
77. Tseng, R. J.; Tsai, C.; Ma, L.; Ouyang, J.; Ozkan, C. S.; Yang, Y., Digital memory device based on tobacco mosaic virus conjugated with nanoparticles. *Nature Nanotechnology* **2006**, 1 (1), 72-77.
78. Royston, E.; Ghosh, A.; Kofinas, P.; Harris, M. T.; Culver, J. N., Self-assembly of virus-structured high surface area nanomaterials and their application as battery electrodes. *Langmuir* **2008**, 24 (3), 906-912.
79. Liu, Y.; Xu, Y.; Zhu, Y.; Culver, J. N.; Lundgren, C. A.; Xu, K.; Wang, C., Tin-coated viral nanoforests as sodium-ion battery anodes. *ACS Nano* **2013**, 7 (4), 3627-3634.
80. Knez, M.; Bittner, A. M.; Boes, F.; Wege, C.; Jeske, H.; Maiß, E.; Kern, K., Biotemplate synthesis of 3-nm nickel and cobalt nanowires. *Nano Letters* **2003**, 3 (8), 1079-1082.
81. Niu, Z.; Bruckman, M.; Kotakadi, V. S.; He, J.; Emrick, T.; Russell, T. P.; Yang, L.; Wang, Q., Study and characterization of tobacco mosaic virus head-to-tail assembly assisted by aniline polymerization. *Chemical Communications* **2006**, (28), 3019-3021.
82. Kang, S. J.; Kocabas, C.; Ozel, T.; Shim, M.; Pimparkar, N.; Alam, M. A.; Rotkin, S. V.; Rogers, J. A., High-performance electronics using dense, perfectly aligned arrays of single-walled carbon nanotubes. *Nature Nanotechnology* **2007**, 2 (4), 230-236.
83. Rodríguez-Galván, A.; Heredia, A.; Plascencia-Villa, G.; Ramírez, O. T.; Palomares, L. A.; Basiuk, V. A., Scanning tunneling microscopy of rotavirus VP6 protein self-assembled into nanotubes and nanospheres. *Journal of Scanning Probe Microscopy* **2008**, 3 (1-2), 25-31.
84. Plascencia-Villa, G.; Saniger, J. M.; Ascencio, J. A.; Palomares, L. A.; Ramírez, O. T., Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, 104 (5), 871-881.
85. Plascencia-Villa, G.; Mena, J. A.; Castro-Acosta, R. M.; Fabián, J. C.; Ramírez, O. T.; Palomares, L. A., Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B: Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2011**, 879 (15-16), 1105-1111.
86. Libersou, S.; Siebert, X.; Ouldali, M.; Estrozi, L. F.; Navaza, J.; Charpilienne, A.; Garnier, P.; Poncet, D.; Lepault, J., Geometric mismatches within the concentric layers of rotavirus particles: A potential regulatory switch of viral particle transcription activity. *Journal of Virology* **2008**, 82 (6), 2844-2852.
87. Lepault, J.; Petitpas, I.; Erk, I.; Navaza, J.; Bigot, D.; Dona, M.; Vachette, P.; Cohen, J.; Rey, F. A., Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO Journal* **2001**, 20 (7), 1498-1507.
88. Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L., Completely "Green" Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (46), 13940-13941.
89. Feldheim, D. L.; Eaton, B. E., Selection of biomolecules capable of mediating the formation of nanocrystals. *ACS Nano* **2007**, 1 (3), 154-159.
90. Nam, K. T.; Lee, Y. J.; Krauland, E. M.; Kottmann, S. T.; Belcher, A. M., Peptide-mediated reduction of silver ions on engineered biological scaffolds. *ACS Nano* **2008**, 2 (7), 1480-1486.
91. Holder, P. G.; Finley, D. T.; Stephanopoulos, N.; Walton, R.; Clark, D. S.; Francis, M. B., Dramatic thermal stability of virus-polymer conjugates in hydrophobic solvents. *Langmuir* **2010**, 26 (22), 17383-17388.
92. Maaloum, M.; Chrétien, D.; Karsenti, E.; Hörber, J. K. H., Approaching microtubule structure with the scanning tunneling microscope (STM). *Journal of Cell Science* **1994**, 107 (11), 3127-3131.
93. Scheibel, T.; Parthasarathy, R.; Sawicki, G.; Lin, X. M.; Jaeger, H.; Lindquist, S. L., Conducting nanowires built by controlled self-assembly of amyloid fibers and selective metal deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100 (8), 4527-4532.
94. De Silva, R. M.; Palshin, V.; De Nalin Silva, K. M.; Henry, L. L.; Kumar, C. S. S. R., A new role for surfactants in the formation of cobalt nanoparticlest. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, 18 (7), 738-747.
95. Belser, K.; Slenters, T. V.; Pfumbidzai, C.; Upert, G.; Mirolo, L.; Fromm, K. M.; Wennemers, H., Silver nanoparticle formation in different sizes induced by peptides identified within split-and-mix libraries. *Angewandte Chemie - International Edition* **2009**, 48 (20), 3661-3664.
96. Samanta, P. K.; Periyasamy, G.; Manna, A. K.; Pati, S. K., Computational studies on structural and optical properties of single-stranded DNA encapsulated silver/gold clusters. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, 22 (14), 6774-6781.
97. Samanta, P. K.; Manna, A. K.; Pati, S. K., Structural, Electronic, and Optical Properties of Metallo Base Pairs in Duplex DNA: A Theoretical Insight. *Chemistry – An Asian Journal* **2012**, 7 (11), 2718-2728.
98. Kauch, M.; Pecul, M., Spin-spin artificial DNA intercalated with silver cations: Theoretical prediction. *ChemPhysChem* **2012**, 13 (5), 1332-1338.
99. Shoeib, T.; Siu, K. W. M.; Hopkinson, A. C., Silver Ion Binding Energies of Amino Acids: Use of Theory to Assess the Validity of Experimental Silver Ion Basicities Obtained from the Kinetic Method. *The Journal of Physical Chemistry A* **2002**, 106 (25), 6121-6128.
100. Jover, J.; Bosque, R.; Sales, J., A comparison of the binding affinity of the common amino acids with different metal cations. *Dalton Transactions* **2008**, (45), 6441-6453.
101. Basiuk, V. A., Interaction of porphine and its metal complexes with C60 fullerene: A

DFT study. *Journal of Physical Chemistry A* **2005**, *109* (16), 3704-3710.

## **11. Productos generados**

### **11.1 Publicaciones**

- Rodríguez-Galván, A.; Contreras-Torres, F. F.; Basiuk, E. V.; Heredia, A.; Basiuk, V. A., Deposition of silver nanoparticles onto human serum albumin-functionalised multi-walled carbon nanotubes. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 2013, *91* (2), 264-270.
- Rodríguez-Galván, A.; Contreras-Torres, F. F.; Basiuk, E. V.; Alvarez-Zauco, E.; Heredia, A.; Basiuk, V. A., Aggregation of Human Serum Albumin on Graphite and Single- Walled Carbon Nanotubes as Studied by Scanning Probe Microscopies. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2011, *11* (6), 5491-5498.

### **11.2 Presentaciones en congresos**

- Rodríguez-Galván, F. F. Contreras-Torres, A. Heredia, E. V. Basiuk, M. Rivera-Hernández, and V. A. Basiuk. Carbon Nanotubes Noncovalently Functionalized with Human Serum Albumin as Supports for Silver Nanoparticles. 2013, The Collaborative Conference on Crystal Growth (3CG), Cancún, Quintana Roo, México.
- F. F. Contreras-Torres, A. Rodríguez-Galván, V. Meza-Laguna, E. V. Basiuk, and V. A. Basiuk. New insight into the behavior of human serum albumin adsorbed onto multi-walled carbon nanotubes: Synthesis of silver nanoparticles, 2010, NanoMex'10, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
- F. F. Contreras-Torres, A. Rodríguez-Galván, V. Meza-Laguna, E. V. Basiuk, and V. A. Basiuk. Human Serum Albumin-Mediated Formation of Silver Nanoparticles on Multi-Walled Carbon Nanotubes, 2011, Materials Research Society Spring Meeting and Exhibit, San Francisco, CA., EEUA.