

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 025**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.09.2013 PCT/GB2013/052473**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.03.2014 WO14045055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2013 E 13779903 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018 EP 2898066**

54 Título: **Síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas y virus**

30 Prioridad:

21.09.2012 GB 201216930

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

18.04.2018

73 Titular/es:

**THE JAMES HUTTON INSTITUTE (100.0%)
Invergowrie
Dundee DD2 5DA, GB**

72 Inventor/es:

**LOVE, ANDREW JOHN;
TALIANSKI, MIKHAIL EMMANUILOVICH;
CHAPMAN, SEAN NICHOLAS y
SHAW, JANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 664 025 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Síntesis de nanopartículas empleando extractos de plantas y virus

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir nanopartículas, en nanopartículas metálicas o nanopartículas metalizadas compuestas de metal y un andamiaje de virus o similar a un virus.

Antecedentes de la invención

10 Las nanopartículas se clasifican como partículas finas con un tamaño de entre 1 y 100 nm. Se han realizado muchas investigaciones acerca de las funciones y los usos de las nanopartículas, puesto que se ha descubierto que las nanopartículas pueden utilizarse en una amplia gama de campos, tales como biomedicina, ciencia de los materiales, electrónica, productos para consumidores, productos farmacéuticos, cosmética, transporte y energía (véase Hoepfner y Novobry, 2012, Quarterly reviews of Biophys., 45:209-255; y Wong, 2012, Microchimia Acta, 117:245-270). Aunque se conocen nanopartículas formadas a partir de material de carbono o dendrímeros, también existe mucho interés en las nanopartículas metálicas o nanopartículas metalizadas. Estas son particularmente interesantes para muchas aplicaciones en optoelectrónica, electrónica, bioquímica (incluyendo la bioquímica vegetal) y medicina.

15 Sin embargo, la producción de nanopartículas metálicas y metalizadas plantea una serie de problemas. Las nanopartículas metálicas habitualmente se sintetizan empleando productos químicos peligrosos, tales como borohidruro de sodio, cloruro de tetrakis-hidroximetilfosfonio (THPC), poli-N-vinilpirrolidona (PVP), e hidroxilamina (Narayanan y Sakthivel, 2011, Adv. Colloid Interface Sci., 169:59-79). Otros métodos de producción de nanopartículas emplean el depósito con aerosol, la ablación con láser y la litografía, que son perjudiciales para el medioambiente. Además, la síntesis de nanopartículas metálicas es cara y larga (Narayanan y Sakthivel, 2011, *supra*). Por tanto, claramente son necesarios métodos sencillos, baratos y respetuosos con el medioambiente para la producción de nanopartículas metálicas (Raveendran *et al.*, 2003, J. Am. Chem. Soc., 125:13940; Sharma *et al.*, 2009, J. Colloid Interface Sci., 145:83; Narayanan *et al.*, 2011, J. Colloid Interface Sci., 156:1). En años recientes, se ha demostrado que ciertos sistemas biológicos que incluyen plantas, algas (Govindaraju *et al.*, 2008, J. Mater. Sci., 43:5115), diatomeas (Scarano *et al.*, 2002, Biometals, 15:145; Scarano *et al.*, 2003, Plant Sci., 165:803), bacterias (Lengke *et al.*, 2007, Langmuir, 23:2694-2699) y células humanas (Anshup *et al.*, 2005, Langmuir, 21:11562) pueden convertir iones de metales inorgánicos en nanopartículas metálicas. Esto generalmente emplea un proceso reductor facilitado por proteínas y metabolitos contenidos en estos organismos. La producción de nanopartículas basada en plantas presenta ventajas significativas frente a otros sistemas biológicos. Por ejemplo, las plantas necesitan poco mantenimiento, no requieren condiciones de crecimiento estériles y producen biomasa con rapidez. Esto contrasta con el alto coste y mantenimiento requeridos para cultivar células de mamífero y bacterianas. El bajo coste del cultivo, el periodo de tiempo corto hasta alcanzar una producción, la seguridad y la capacidad de reducir o aumentar la escala dependiendo de la demanda hace que las plantas sean una plataforma de síntesis de nanopartículas particularmente atractiva.

35 Los extractos de savia de plantas pueden emplearse con facilidad para reducir iones de metales para producir nanopartículas metálicas. Esta estrategia implica menos procesamiento corriente abajo para extraer las partículas sintetizadas frente a otros sistemas biológicos. La viabilidad de este proceso ha sido demostrada a fondo empleando savia de una plétora de diferentes especies vegetales y una diversidad de ácidos y sales de metales (que incluyen cobre, oro, plata y hierro). Por ejemplo, los extractos de *Pelargonium graveolens* reducen iones de oro a nanopartículas con forma decahédrica e icosaédrica de 20-40 nm y las estabilizan (Shankar *et al.*, 2003, J. Mater. Chem., 13:1822), mientras que extractos de *Cymbopogon flexuosus* producen esferas y nanotriángulos de oro, con un tamaño que varían de 0,05-18 μm (Shankar *et al.*, 2004, Nat. Mater., 3:482). Se ha empleado el extracto de *Azadirachta indica* para reducir el ácido cloroáurico (HAuCl_4) a hexágonos y triángulos planos de oro con un tamaño de 50-100 nm (Shankar *et al.*, 2004, J. Colloid Interface Sci., 275:496). Este estudio también indicó que la savia de *A. indica* puede reducir el nitrato de plata a nanopartículas esféricas polidispersadas con un tamaño de 5-25 nm (Shankar *et al.*, 2004, J. Colloid Interface Sci., 275:496). Además, se ha empleado el extracto de hojas de *Aloe barbadensis* para producir partículas de In_2O_3 cúbicas de 5-50 nm (Maensiri *et al.*, 2008, J. Optoelectron Adv. Mater., 10:161). Las nanopartículas formadas tienen un contenido predominantemente metálico.

50 Sin embargo, debe advertirse que, además de las nanopartículas dispersadas, estas técnicas a menudo producen agregaciones metálicas y/o metalizadas grandes de tamaño de micrómetros que disminuyen significativamente el rendimiento de las nanopartículas "verdaderas" (véanse las figuras 1a, 2 y 3). En el contexto de la presente invención, tal como lo entienden los expertos en la técnica, se considera que una nanopartícula "verdadera" es una nanopartícula metalizada y/o metálica que tiene al menos una dimensión que es menor que 100 nm. Además, estos procesos no siempre permiten la preparación de nanopartículas uniformes (en tamaño y arquitectura) con una morfología específica, lo cual resulta muy importante para muchas aplicaciones tecnológicas.

En otra estrategia, se ha demostrado que los virus o partículas similares a los virus pueden ser biomoldes para el depósito de metales, formando nanopartículas metalizadas de una manera específica (Kadri *et al.*, 2011, Virus Research, 157:35-46; Aljabali *et al.*, 2010, Nanoscale, 2:2596-2600). Por ejemplo, las superficies externas o internas

de las partículas del virus del mosaico del frijol de Castilla (CPMV), virus del mosaico del bromo (BMV), virus X de la patata (PVX) y virus del mosaico del tabaco (TMV) han sido revestidas con diferentes metales. Puesto que las partículas de TMV exponen varias superficies diferenciadas adecuadas para la metalización (Balci *et al.*, 2012, *Nanotechnology*, 23; Knez *et al.*, 2006, *Nano Lett.*, 6: 1172-1177) o la funcionalización con moléculas orgánicas (Endo *et al.*, 2006, *Chemistry*, 12:3735-3740; Shimizu *et al.*, 2005, *Chem. Rev.*, 105:1401-1443), estas han sido aprovechadas como biomoldes prometedores para materiales a nanoescala (Lee *et al.*, 2012, *Biotechnol. Bioeng.*, 109:16-30). Debido a su estabilidad física y química, son herramientas atractivas para nanoestructuras inorgánicas (Bitner *et al.*, 2005, *Naturwissenschaften*, 92:51-64, Dujardin *et al.*, 2003, *Nano Lett.*, 3:413-417). Dujardin *et al.* (2003, *supra*) y Knez *et al.* (2006, *supra*) han empleado viriones derivados de plantas para producir nanocables mediante la metalización selectiva de la superficie externa o del canal interno. Para la fabricación de nanoestructuras incluidas en películas finas se empleó el TMV como nanobiomolde en sistemas de depósito de capas atómicas que producen nanotubos de óxido metálico (Knez *et al.*, 2006, *supra*). Lo más importante, se han diseñado dispositivos electrónicos funcionales (Atanasova *et al.*, 2011, *Adv. Mater.*, 23:4918-4922; Chen *et al.*, 2011, *Electrochim. Acta*, 56:5210-5213), así como ferrofluidos (Wu *et al.*, 2010, *ACS Nano*, 4:4531-4538) basándose en biomoldes de TMV.

15 Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Los inventores han investigado el uso de los virus como aditivos en reacciones de síntesis de nanopartículas dentro de plantas o de extractos de plantas. En particular, los inventores han investigado el TMV (varillas de 300 nm de 18 nm de diámetro) y partículas similares al virus del papiloma bovino (VLP de BPV; partículas esféricas no infecciosas de 30 nm de diámetro compuestas solo de la proteína de la envuelta) como aditivos en reacciones de síntesis de nanopartículas compuestas por extractos de savia de *Nicotiana benthamiana* y sales/ácidos de metales. Los resultados de la microscopía electrónica de estos experimentos fueron inesperados. La adición de virus/partículas similares a virus a la mezcla de reacción no solo condujo a la metalización de las partículas de virus, sino que también potenció mucho el rendimiento y la monodispersión de las nanopartículas metálicas, y también influyó en la arquitectura de las nanopartículas dispersadas formadas.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente solicitud proporciona un proceso según la reivindicación 1. En la presente se analiza un proceso para la producción de partículas de virus revestidas con metales, y dicho proceso comprende mezclar partículas de virus con un material vegetal, de modo adecuado un extracto vegetal, en particular un extracto de savia de plantas con poder reductor, y una sal de metal.

En la presente también se analiza un proceso para la producción de nanopartículas metálicas, y dicho proceso comprende mezclar partículas de virus con un material vegetal, de modo adecuado un extracto vegetal, en particular un extracto de savia de plantas con poder reductor, y una sal de metal. Las nanopartículas metálicas estarán formadas sustancialmente por un metal, pero pueden incluir otros componentes, por ejemplo, componentes de la savia de la planta conjugados con el metal. Habitualmente, la nanopartícula metálica comprenderá al menos 80% en peso del metal (por ejemplo, al menos 90% o al menos 95% en peso del metal) con relación al peso total de la nanopartícula.

Aunque no se pretenda limitación alguna por la teoría, se considera que, en el proceso, la sal del metal es un precursor en la reacción, y la sal se va reduciendo para formar átomos del metal de valencia mejor. Estos átomos pueden actuar como semillas para posteriores acontecimientos de nucleación que conducen a la formación de nanopartículas.

Tal como se indicó anteriormente, el método de la presente invención tiene el sorprendente beneficio de que las nanopartículas metálicas y/o las partículas de virus revestidas con metales muestran una menor agregación, aumentando con ello el rendimiento útil de las nanopartículas revestidas de metales. Otro beneficio es la formación adicional o alternativa de las nanopartículas producidas. En ciertas realizaciones, el uso de partículas de virus en el proceso puede aumentar el rendimiento de las nanopartículas en al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces frente a un proceso que no emplee partículas de virus. En ciertas realizaciones, el uso de partículas de virus en el proceso puede aumentar la monodispersión de las nanopartículas en al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces frente a un proceso que no emplee partículas de virus.

En el contexto de la presente invención, una nanopartícula, tal como se analiza en la presente se considera que está metalizada y/o es metálica y tiene al menos una dimensión que es menor que 100 nm. Por ejemplo, una nanopartícula metálica y/o metalizada de TMV puede tener un diámetro de aproximadamente 18 nm, pero una longitud de aproximadamente 200 nm. En ciertas realizaciones, la nanopartícula puede ser menor que 100 nm en todas las dimensiones.

La expresión "partículas de virus", tal como se emplea en la presente, se refiere a cualquier partícula de virus ("virus particle", VP) sin envuelta infecciosa o no infecciosa, que incluye partículas similares a virus ("virus-like particles", VLP) que no contienen ácidos nucleicos. Los ejemplos de partículas de virus adecuados incluyen virus sin envuelta que tienen una cubierta de cápsida, por ejemplo, una cápsida helicoidal, una cápsida filamentosa o una cápsida icosaédrica. Los ejemplos concretos de virus helicoidal (con forma de varilla) incluyen el virus del mosaico del

tabaco (TMV), virus del cascabeleo del tabaco (TRV), virus del mosaico rayado de la cebada (BSMV) y virus del achaparrado del cacahuete (IPCV). Los ejemplos concretos de virus filamentosos son el virus de la tristeza de cítricos (CTV), el virus ébola y el virus X de la patata (PVX). Los ejemplos concretos de virus icosaédricos incluyen el virus del papiloma bovino (BPV), el virus del enrollamiento de la hoja de patata (PLRV), virus del mosaico del frijol de Castilla (CPMV), virus de la polio, virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y virus de la lengua azul, y similares.

Además de los virus vegetales y animales indicados anteriormente, los bacteriófagos también pueden utilizarse en este proceso. En ciertas realizaciones, los bacteriófagos pueden contener ADNbc lineal (*Rudoviridae* y *Podoviridae*), ADNbc circular (*Bicaudaviridae* y *Corticoviridae*), ADN monocatenario circular (*Microviridae*), ARNmc lineal (*Leviviridae*) o ARNbc (*Fuselloviridae*). En ciertas realizaciones, los bacteriófagos útiles en esta invención pueden tener una morfología isométrica (*Corticoviridae*), con forma de limón (*Fuselloviridae*), ovoide (*Guttavirus*), con forma de botella (*Ampullaviridae*), con forma de varilla (*Rudoviridae*), filamentosos (*Inoviridae*) y pleomórfica (*Plasmaviridae*). En ciertas realizaciones, los bacteriófagos útiles pueden tener (*Myoviridae*) o no (*Siphoviridae*) colas contráctiles.

El uso de virus con forma de varilla, filamentosos y esféricos puede conducir a unas nanopartículas con la forma correspondiente y puede mejorar significativamente la síntesis y el rendimiento de las nanopartículas. En ciertas realizaciones, el virus puede incluir un ácido nucleico (ARN; TMV, PVY). En ciertas realizaciones, el virus puede carecer del ácido nucleico vírico (virus del mosaico del frijol de Castilla vacío, eCPMV; y partículas similares al virus del papiloma bovino, VLP de BPV). En ciertas realizaciones, un virus sin ácido nucleico puede prepararse u obtenerse según Love *et al.*, 2012 (VLP de BPV), y Saunders *et al.*, 2009 (eCPMV).

En ciertas realizaciones, pueden utilizarse virus transgénicos y/o químicamente modificados (por ejemplo, TMV y eCPMV), con una superficie alterada que presenta péptidos para unir y reducir metales, para la producción de nanopartículas en la presente invención. En ciertas realizaciones, pueden proporcionarse virus genética o químicamente modificados que presentan en la superficie péptidos o motivos que tienen propiedades reductoras y/o de unión de iones metálicos, para proporcionar virus con la superficie funcionalizada (que presentan péptidos que pueden unirse a iones metálicos y ayudar a su reducción para formar las nanopartículas) en una planta o mezclados con material vegetal, tal como savia de una planta. En ciertas realizaciones, pueden producirse nanopartículas de oro, plata y hierro utilizando diferentes sales de metales empleando virus genéticamente modificados.

La inclusión de al menos una partícula de virus sin envuelta (tal como virus con forma de varilla (tales como TRV o BSMV), filamentosos (por ejemplo, CTV o PVX) o icosaédricos (tales como BPV, PLRV, CaMV o CPMV) o sus derivados de VLP en la mezcla de reacción de plantas con sales de metales/ácidos de metales, tales como HAuCl_4 , KAuCl_4 , AgNO_3 , $\text{In}(\text{OCCH}_2\text{CHOCCCH}_3)_3$, PdCl_2 , $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ y $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$ conduce a la producción de nanopartículas metálicas monodispersadas y también a una gama diversa de partículas víricas metalizadas. La inclusión de dichas estructuras víricas en la mezcla de reacción también puede modular las morfologías de las nanopartículas metálicas producidas.

El extracto de planta puede obtenerse a partir de cualquier material vegetal adecuado, tal como hojas, tallos o similares. Se entenderá a partir de las indicaciones de los métodos de extracción de savia de una planta que la savia puede considerarse un extracto de planta. Puede utilizarse un extracto de savia de planta, es decir, la savia de la planta puede extraerse de la planta, de modo que el proceso se realiza *ex planta* (fuera de la planta). Opcionalmente, el extracto de savia de planta se trata y/o se purifica antes del uso. Tal como se entenderá a partir de la técnica, la savia de planta comprende un agente reductor. La cantidad de savia de planta utilizada en los procesos descritos en la presente es suficiente para convertir sustancialmente todos los iones de metales disueltos mezclados en nanopartículas. Tal como se emplea en la presente, sustancialmente todos comprende más del 50%, al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90% o más.

Se entenderá, a partir de las indicaciones de los métodos de extracción de savia de una planta, que la savia puede considerarse un extracto de planta. El extracto de planta puede obtenerse a partir de partes y componentes de la planta a diferentes niveles de procesamiento. El extracto de planta puede no contener directa o exclusivamente savia aislada a partir de redes vasculares de la planta (xilema/floema). En ciertas realizaciones, el extracto de planta puede relacionarse con cualquiera de los componentes acuosos o no acuosos tomados de cualquier parte de una planta; por ejemplo, los residuos de pieles de patata secas o los frutos frescos, cuando se emplean junto con virus y sales de metales para la producción de nanopartículas, constituyen otra realización de la invención. En ciertas realizaciones, el extracto de planta puede ser un extracto de savia de planta, en el que la savia se considera limitada a los componentes transportados en el xilema y floema.

Las sales de metal adecuadas para su uso en cualquier proceso según la invención incluyen sales de metales excluyendo los metales alcalinos y los metales alcalino-térreos de los grupos IA y IIA. Los metales adecuados incluyen los metales de transición y Al, Ga, In, Ge y Sn. Los ejemplos concretos incluyen plata, oro, hierro, cobre, indio, platino, paladio, rodio, manganeso, cinc, molibdeno, iridio, cobalto y similares. Opcionalmente, las sales de metales pueden ser sales de plata, oro, hierro, cobre, indio, platino, paladio, rodio, cobalto o iridio. En ciertas realizaciones, la sal de metal puede tener un potencial de reducción positivo mayor que 0,2 V, por ejemplo, mayor que 0,4 V. Por ejemplo, HAuCl_4 , KAuCl_4 , AgNO_3 , $\text{In}(\text{OCCH}_2\text{CHOCCCH}_3)_3$, PdCl_2 , $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ y $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$ resultan adecuados, aunque la invención no se limita a estos tipos de sales concretas.

Durante el uso, las sales de metales se proporcionan en el proceso en forma de un ion de metal, de modo adecuado un ion de metal en disolución, que se obtiene disolviendo una sal de metal en una disolución. En ciertas realizaciones, el ion de metal disuelto puede proporcionarse disolviendo un quelato de metal en una disolución. En ciertas realizaciones, el ion de metal puede ser proporcionado por un ácido de metal. De modo adecuado, en ciertas realizaciones de la invención, en el contexto de la presente invención, un quelato de metal o un ácido de metal pueden considerarse una sal de metal.

La savia de la planta puede extraerse mediante técnicas conocidas en la técnica a partir de cualquier material vegetal adecuado, por ejemplo, hojas, tallos, frutos, etc. Se describen ejemplos de protocolos para extraer la savia de una planta en Yilmaz *et al.* (2011, Mater. Chem. and Phys., 130:1195-1202) y Song *et al.* (2009, Bioprocess Biosyst. Eng., 32:79-84). Por ejemplo, un material de hojas de *Stevia rebaudiana* se secó al aire y se trituró finamente empleando un filtro de malla de 200 µm. Después, se añadieron 0,1 g del filtrado de las hojas a 50 ml de agua desionizada y después se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente. El extracto se filtró y se centrifugó a 10.000 rpm para eliminar los residuos. El extracto aclarado después se empleó para reducir sales de metales para producir nanopartículas (Yilmaz *et al.*, 2011, *supra*). Como otro ejemplo, extractos de *Pinus desiflora*, *Diopyros kaki*, *Gingko biloba*, *Magnolia kobus* y *Platanus orientalis* pueden obtenerse cada uno combinando 5 g de material de hojas finamente cortadas con agua destilada estéril antes de hervir durante 5 minutos. Tras enfriar, los extractos de savia pueden utilizarse en reacciones de síntesis de nanopartículas (Song *et al.*, 2009, *supra*). De modo similar, las nanopartículas también puede producirse empleando extractos de savia procedente de *Nicotiana benthamiana*; en este caso, un material de hojas frescas se trituró en nitrógeno líquido para producir un polvo fino y después se añadió a agua desionizada destilada con una proporción de 2,5:1 (en p/v) antes de hervir durante 15 minutos. Los extractos se hicieron pasar a través de dos capas de muselina, y el líquido se centrifugó durante 5 minutos a 16.000 g. El sobrenadante se recolectó y se diluyó de modo apropiado antes de su uso en las reacciones de síntesis de nanopartículas.

Otro ejemplo es la preparación de extractos acuosos a partir de frutas de *Carica papaya*, en la que 25 g de fruta de papaya se trituraron en 100 ml de agua destilada y se filtraron secuencialmente a través de un papel de filtro Whatman n.º 1 (tamaño de poro 25 µm) y después a través de filtros de tamaño de 0,6 µm (Jain *et al.*, 2009, Dig. J. Nanomat. and Biostruct., 4:723-727). Los extractos posteriormente se emplearon en las reacciones de síntesis de nanopartículas.

La presente invención no se limita a ningún tipo concreto de planta como fuente de savia de planta o extracto de planta. El extracto de planta o la savia de planta pueden obtenerse a partir de una diversidad de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.

Las plantas adecuadas para proporcionar material vegetal, en particular el extracto de planta, de modo adecuado el extracto de savia de planta, al proceso de la presente invención, o que proporcionan el proceso cuando este se realiza *in planta*, incluyen *Nicotiana sp.*, *Musa sp.*, *Psidium sp.*, *Avena sp.*, *Azadirachta sp.*, *Chenopodium sp.*, *Syzygium sp.*, *Citrus sp.*, *Glycine sp.*, *Spinacia sp.*, *Carica sp.*, *Stevia sp.*, *Pinus sp.*, *Diopyros sp.*, *Gingko sp.*, *Magnolia sp.*, *Platanus sp.* y similares. *Nicotiana benthamiana* es una fuente adecuada de savia de planta. Otros ejemplos adecuados incluyen *Musa paradisiaca* (Bankar *et al.*, 2010, Colloids Surf. B., 80:45-50), *Psidium guava* (Raghunandan *et al.*, 2009, Nano Biotechnol., 5:34-41), *Avena sativa* (Armendáriz *et al.*, 2004, J. Nanopart. Res., 6:377-382), *Azadirachta indica* (Shankar *et al.*, 2004, *supra*), *Chenopodium album* (Dwivedi y Gopal, 2010, Colloids Surf. A., 369:27-33), *Syzygium aromaticum* (Singh *et al.*, 2010, J. Nanopart. Res., 12:1667-1675), *Citrus* (que incluye *Citrus aurantifolia*), *Glycine max* (Vivekanandhan *et al.*, 2009, J. Nanosci. Nanotechnol., 9:6828-6833), *Spinacia oleracea* (Kanchana *et al.*, 2011, Digest J. Nanomat. and Biostruct., 6:1741-1750), así como las fuentes indicadas anteriormente.

En ciertas realizaciones, pueden emplearse plantas de cultivo (o material de desecho de plantas de cultivo, concretamente paja de trigo o cebada, pieles de patata, residuos de pulpa de frutas, etc.) en este proceso: por ejemplo, puede utilizarse *Hordeum vulgare* (cebada), *Triticum spp.* (especies de trigo), *Zea mays* (maíz), *Oryza sativa* (arroz), *Solanum tuberosum* (patata), *Daucus carota* (zanahoria), *Brassica spp.* (nabo, nabo sueco, coliflor, etc.), *Beta vulgaris* (remolacha azucarera), *Saccharum* (caña de azúcar), *Solanum lycopersicum* (tomate) y *Vitis* (uvas) o uno de sus extractos en el proceso.

Un extracto de savia de planta para su uso en el proceso de la presente invención puede caracterizarse por su capacidad para reducir iones de metales para producir nanopartículas.

Los ensayos resumidos a continuación pueden emplearse para obtener una guía relativa y cualitativa sobre el tipo de plantas o las partes de plantas que contienen la mayor capacidad o poder reductor y, por tanto, que pueden utilizarse de modo ventajoso para reducir sales de metales para producir nanopartículas.

Esta capacidad o poder reductor puede predecirse mediante el uso de ensayos adecuados, tales como el ensayo del poder antioxidante-reductor férrico (FRAP; Benzie y Strain, 1999, Methods Enzymol., 299:15-27) o el parámetro antioxidante de atrapamiento de radicales totales (TRAP; Ghissello *et al.*, 1995, Free Radic. Biol. Med., 18:29-36). Estos métodos han sido empleados previamente para documentar el poder reductor de una diversidad de plantas, partes de plantas y productos de plantas (Pellegrini *et al.*, 2003, J. Nutr., 133:2812-2819). Esto puede permitir la

- identificación de los candidatos a extractos o extractos de savia capaces de reducir nanopartículas. Otro ejemplo para determinar la idoneidad de extractos de plantas o extractos de savia para la producción de nanopartículas es medir su producción en la mezcla de reacción empleando ensayos de absorbancia de UV-visible. En un ensayo adecuado, se combinan extractos de hojas (por ejemplo, *N. benthamiana*) hervidos y ácido cloroáurico (los extractos se diluyeron en 100 veces en la mezcla de reacción y el ácido cloroáurico se añadió hasta un volumen final de $2,9 \times 10^{-4}$ M) y se evalúa el avance de la reacción midiendo los espectros de absorbancia desde 300-700 nm en un espectrofotómetro. A lo largo del tiempo, la absorbancia de la reacción aumenta más allá de la observada para los componentes de la reacción individuales por separado. Un pico claramente discernible a aproximadamente 550 nm se correlaciona con la formación de nanopartículas de oro de aproximadamente 60 nm. Un pico que tiene hombros amplios que abarcan de 500 nm-580 nm indica la producción de una diversidad de tamaños y formas de nanopartículas de oro. Puede asumirse una estrategia similar con un extracto de *Syzygium aromaticum*, el cual puede combinarse en una proporción 1:1 con ácido cloroáurico 4×10^{-3} M y después realizarse diluciones en 20 veces de la mezcla de reacción antes de analizar los espectros de UV-visible en un espectrofotómetro. Un pico en la absorbancia observado a 515 nm, cuya magnitud aumenta hasta la finalización de la reacción (Singh *et al.*, 2010, *supra*), indica la formación de nanopartículas. Los picos de absorbancia para las nanopartículas de oro varían dependiendo del tamaño y forma de la partícula; por ejemplo, las partículas esféricas simples de 10-100 nm presentan unos picos en el intervalo de 500 nm-600 nm. Esto no solo constituye una herramienta útil para confirmar que el extracto de savia de planta puede producir directamente nanopartículas, sino que también permite prever cuáles serían los tamaños de las partículas que estarían presentes (Haiss *et al.*, 2007, *Anal. Chem.*, 79:4215-4221).
- En general, pueden emplearse al menos 5 μ l de la planta no diluida (opcionalmente diluida hasta 20 veces en agua) en la mezcla. Por ejemplo, pueden utilizarse de 5 μ l a 50 μ l de extracto o savia de planta, por ejemplo de 10 μ l a 30 μ l, por ejemplo de 15 μ l a 25 μ l. En algunas situaciones puede resultar más conveniente emplear el extracto o savia de la planta en forma diluida. Cuando el extracto o la savia de la planta se ha diluido, el volumen del extracto o savia de la planta diluida añadida puede aumentar en consecuencia. Por ejemplo, en lugar de 20 μ l de extracto o savia de planta, pueden emplearse 200 μ l de una dilución 10X.
- En ciertas realizaciones, el proceso de la invención puede realizarse a una temperatura en el intervalo de 0° C a 60° C, de modo adecuado de 4° C, 10° C, 15° C, 20° C, 25° C, 30° C, 35° C, 40° C, 45° C, 50° C a 100° C.
- En ciertas realizaciones, la temperatura a la cual puede realizarse el proceso está en el intervalo de 5° C a 25° C, de modo ventajoso de 10° C a 20° C.
- En ciertas realizaciones, un cambio en la temperatura puede afectar a la morfología de las nanopartículas de metal. Por ejemplo, Lukman *et al.* (2011) descubrieron que si se aumenta la temperatura de la reacción hasta más de 30° C, esto conduce a la formación de nanotriángulos de planta a partir de sales de plata. En otro ejemplo en el que se utilizaron extractos de *Cassia fistula*, se obtuvieron nanocables de plata a temperatura ambiente, mientras que a 60° C se observaron nanopartículas esféricas y varillas cortas (Lin *et al.*, 2010). Empleando extractos de *Nyctanthes arboristis* junto con sales de oro se obtuvieron triángulos, pentágonos, varillas y esferas de oro a 25° C, mientras que a 80° C se obtuvieron partículas predominantemente esféricas (Das *et al.*, 2011).
- En ciertas realizaciones, el proceso de la invención puede realizarse a presión atmosférica.
- En ciertas realizaciones, el proceso puede realizarse a un pH en el intervalo de pH 4 a pH 8.
- En ciertas realizaciones, las nanopartículas proporcionadas por cualquier proceso de la invención pueden comprender dos o más metales. En ciertas realizaciones, una primera sal de metal puede mezclarse con el extracto de planta y la partícula de virus en un primer momento, y una segunda o posterior sal de metal puede mezclarse en un segundo momento después de un periodo de tiempo. Como alternativa, la primera y la segunda sal de metal pueden mezclarse con el extracto de planta y la partícula de virus simultáneamente.
- Tal como se entenderá, basándose en el poder reductor del material o extracto de planta, se sintetizan nanopartículas de metal reduciendo las correspondientes disoluciones de sales de metales. En ciertas realizaciones, la nanopartícula de metal puede ser una nanopartícula de hierro, una nanopartícula de manganeso, una nanopartícula de oro, una nanopartícula de platino, una nanopartícula de cobre, una nanopartícula de indio, una nanopartícula de plata, una nanopartícula de indio, una nanopartícula de iridio, una nanopartícula de rodio, una nanopartícula de paladio, una nanopartícula de cobalto o sus combinaciones.
- En ciertas realizaciones, las nanopartículas de metal pueden tener una valencia cero. Sin embargo, las nanopartículas sintetizadas por plantas pueden tener cargas superficiales diferentes y quizás modulables que dependen en los componentes biomoleculares del extracto que están asociados con la nanopartícula.
- Unas concentraciones adecuadas de sales de metales o iones de metales en disolución para su uso en cualquier proceso de la invención incluyen unas concentraciones de 1 M a 1×10^{-5} M, en particular unas concentraciones entre $2,5 \times 10^{-3}$ M a $2,9 \times 10^{-4}$ M.
- Las sales de metales más recalcitrantes a la reducción para producir nanopartículas generalmente se emplearán a concentraciones más altas ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M) y junto con extractos de plantas más concentrados (tales como

extractos puros de *Hordeum vulgare*) o extractos con una capacidad reductora más potente (tales como diluciones en diez veces de extractos de *Rubus fruticosus*), o una combinación de ambos, para producir nanopartículas. Cuando las nanopartículas de metal pueden formarse a cierta proporción de sal de metal a extracto de planta, es importante advertir que la afinación de esta proporción puede influir en el número y el tamaño de la nanopartículas.

5 En ciertas realizaciones la variación en la proporción puede influir en la forma de la nanopartícula de metal, aumentando la presencia de biomoléculas que modifican la forma de la nanopartícula o de agentes más estabilizantes, que pueden potenciar la estabilidad de las nanopartículas con morfologías inestables.

10 Las partículas de virus y las partículas similares a virus (VLP) empleadas en el proceso pueden usarse a unas concentraciones que varían de 400 µg a 30 ng por 200 µl de volumen de reacción de síntesis de nanopartículas. Por ejemplo, una mezcla de reacción puede consistir en 170 µl de extracto de savia, 20 µl de sal de metal 10X concentrada y 10 µl de virus o VLP.

15 Este intervalo de concentración del virus ha sido generalmente el más eficaz en la reacción *ex planta*. Debido a la variación en las químicas superficiales de los virus, que es muy probable que influyan en los diferentes grados de unión y reducción de metales, la concentración más eficaz del virus debe determinarse de modo empírico para una sal de metal y un extracto de planta concretos. Generalmente, esto se logra mezclando una gama de concentraciones o disoluciones de virus con la sal de metal y el extracto de planta.

Como alternativa, el proceso de la presente invención puede realizarse *in planta* (dentro de una planta). Así, en un aspecto, el proceso de la presente invención para la producción de nanopartículas metálicas o metalizadas comprende:

20 i) proporcionar una planta infectada con un virus sin envuelta y/o que es capaz de expresar una partícula de un virus sin envuelta; y

ii) exponer dicha planta a una concentración de una sal de metal hidrosoluble suficiente para la formación de nanopartículas.

25 En un aspecto alternativo, el proceso de la presente invención para la producción de nanopartículas metálicas o metalizadas comprende:

i) proporcionar un planta y exponer dicha planta a una concentración de una sal de metal hidrosoluble suficiente para la formación de nanopartículas; y

ii) exponer dicha planta a un virus sin envuelta y/o a una construcción genética capaz de expresar una partícula de un virus sin envuelta.

30 En una realización *in planta*, opcionalmente la sal de metal puede seleccionarse de un metal distinto del potasio, hierro, calcio, manganeso, cinc, molibdeno, cobre o cobalto. Opcionalmente, la concentración de sal de metal hidrosoluble suficiente para la formación de nanopartículas puede proporcionarse por encima de la concentración empleada para un microelemento en una disolución hidropónica y/o está por encima de los niveles de dichos elementos en la tierra o el compost para plantación, por ejemplo, está a 100 ppm o más para el cobre, o a 100 ppm o más para el hierro.

35 En ciertas realizaciones, los virus sin envuelta hacen que la planta produzca partículas de virus debido a la infección del tejido de la planta.

40 Habitualmente, el virus sin envuelta es un virus infeccioso (es decir, autorreplicante). La infección puede ser una infección localizada o puede ser sistémica. Como alternativa, los tejidos de la planta pueden modificarse genéticamente con un material de ácido nucleico que expresa proteínas de la cápsida, que se autoensamblan para formar partículas similares a los virus. El material genético que codifica las proteínas de la cápsida puede ser ADN o ARN y estos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. El material genético puede ser parte de un vector de expresión empleado para transfectar la planta o el propio genoma de la planta puede modificarse genéticamente de modo que la planta sea transgénica.

45 Las partículas similares a virus que pueden aprovecharse en el proceso de la invención pueden incluir, por ejemplo, las proteínas de la envuelta del virus del mosaico del frijol de Castilla, virus del papiloma bovino, virus del papiloma humano, antígeno central del virus de la hepatitis B (forma estructuras sin envuelta en plantas) y el virus de la lengua azul que, cuando se expresan en plantas, se autoensamblan para formar partículas similares a virus (Thuenemann *et al.*, 2013).

50 De modo conveniente, la planta para su uso en un proceso de la invención puede cultivarse de modo hidropónico. Opcionalmente, la planta puede ser tolerante a la sal, por ejemplo, puede ser una planta que crece sin problemas en condiciones costeras o en estuarios. Los ejemplos específicos incluyen *Thellungiella halophila*, *Atriplex nummularia* y *Rosa rugosa*. Como alternativa o además, la planta puede tener la capacidad de hiperacumular iones metálicos, por ejemplo, *Brassica juncea*, *Thlaspi caerulescens*, *Ipomea alpine* y *Sinapis alba* (Sheoran *et al.*, 2009, Miner. Engin., 22:1007-1019).

55

Tal como se analiza en la presente con relación al primer aspecto de la invención, puede utilizarse una diversidad de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas para la producción *in planta* de nanopartículas compuestas de diferentes metales. Además, tal como se analiza en la presente con relación al primer aspecto de la invención, puede utilizarse un conjunto diverso de virus para la producción *in planta*, y los virus utilizados pueden mejorar la síntesis y el rendimiento de las nanopartículas. En ciertas realizaciones, el virus puede contener un ácido nucleico o carecer de ácido nucleico.

Se ha empleado una plétora de diferentes sales de metales junto con extractos de plantas y se han cultivado de modo hidropónico plantas completas para producir nanopartículas de metal (Gan y Li, 2012, Rev. Environ. Sci. Biotechnol., 11:169-206; Narayanan y Sakthivel, 2011, Adv. Colloid Interface Sci., 169:59-79). Estas metodologías de la técnica anterior pueden potenciarse en términos del rendimiento de las nanopartículas y/o del tipo de nanopartícula exponiendo el tejido de la planta a un virus o a una partícula similar a un virus según la presente invención.

Para la síntesis *in vitro* de nanopartículas metálicas a partir de extractos de plantas y sales de metales, las concentraciones de sales de metales se han variado desde 1×10^{-1} M a 1×10^{-4} M (Gan y Li, 2012, *supra*; Narayanan y Sakthivel, 2011, Adv. Colloid Interface Sci., 169:59-79). Para la síntesis de nanopartículas empleando plantas completas, la sal de metal de interés puede añadirse a la planta (de modo conveniente como parte de una disolución hidropónica) a un intervalo de concentración de 25 a 10.000 ppm, de modo adecuado a más de 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm. La concentración de la sal de metal de interés añadida a una disolución hidropónica para la generación de nanopartícula *in planta* generalmente es mayor que las cantidades traza de sales de metales potencialmente reducibles que ya están presentes en la disolución hidropónica. Las disoluciones hidropónicas que se emplean habitualmente contienen metales traza para asegurar la nutrición apropiada de la planta y un crecimiento robusto, por ejemplo, a menudo se encuentran de 1-5 ppm de hierro, 0,5 ppm de manganeso, 0,05 ppm de cinc, 0,02 ppm de cobre y 0,01 ppm de molibdeno en estas disoluciones (Haverkamp y Marshall, 2009, J. Nanopart. Res., 11:1453-1463; Hoagland y Arnon, 1938, Agric. Exper. Sta., Berkeley Circ., 347, 39, pp.). Otro ejemplo de sales de metales traza en una formulación nutriente hidropónica es 0,0250 ppm de CoCl_2 , 0,0250 ppm de CuSO_4 , 27,8 ppm de FeSO_4 , 8,6 ppm de ZnSO_4 (Murashige T. y Skoog F., 1962, Physiol. Plant, 15:473-497). Estas formulaciones que se emplean habitualmente en prácticas de cultivo hidropónicas no conducen a la formación de nanopartículas de metales *in planta*; en consecuencia, la presente invención puede emplear disoluciones hidropónicas convencionales como medio suplementado con concentraciones más altas de sales de metales de interés que generan las nanopartículas de metal deseadas *in planta*. Por ejemplo, la inclusión de nitrato de plata (u otras sales de plata, tales como $\text{Na}_3\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_2$ y $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$) en la disolución hidropónica en los intervalos de 2.500 a 10.000 ppm conduce a la acumulación de nanopartículas de plata de 2-35 nm en *Brassica juncea*; la mayor concentración de nanopartículas obtenida fue de aproximadamente 0,35% de peso seco de la planta (Haverkamp y Marshall, 2009, *supra*). Otro ejemplo es la adición de tetracloroaurato de potasio al medio hidropónico de plantas de *Sesbania drummondii* a una concentración de 200 ppm. En este caso se detectó oro reducido desde 9 g/kg de peso seco en las raíces hasta 100 mg/kg de peso seco en los brotes (Sharma *et al.*, 2007, Environ. Sci. Technol., 15:5137-5142). Se descubrió que 200 ppm producen el rendimiento óptimo de nanopartículas, mientras que 25 ppm produjo muy pocas nanopartículas. Además, también se ha demostrado que *Zea mays* cultivado en medio suplementado con tetracloroaurato de potasio de 20 ppm a 160 ppm es capaz de captar y reducir los iones de oro para producir nanopartículas (Rosa *et al.*, 2009, Acta Univers., 19:76-81). Por tanto, la determinación de una concentración adecuada de sal de metal para cualquier especie vegetal concreta puede realizarse según metodologías conocidas. Las sales de metales tienen diferentes potenciales de reducción, de modo que algunas son más susceptibles a la formación de nanopartículas que otras. Informes previos han demostrado que las plantas pueden producir nanopartículas a partir de sales de Au, Ag y Cu que tienen potenciales de reducción (V) positivos (Gan y Li, 2012, *supra*). Además, también es probable que ciertos metales (en complejo con cloruro, por ejemplo) tales como Ru (0,46 V), Rh (0,5 V), Pd (0,64 V), Ir (0,86 V) y Pt (0,74 V) puedan reducirse para formar nanopartículas debido a sus potenciales de reducción positivos (Haverkamp y Marshall 2009, *supra*). Por contraste, la formación mediada por plantas de nanopartículas es mucho menos eficaz con metales que tienen potenciales de reducción negativos, por ejemplo: Pb^{2+} a Pb^0 a -0,13 V (Sharma *et al.*, 2004, Environ. Toxicol. Chem., 23:2068-2073), Ni^{2+} a Ni^0 a -0,24 V (Kramer *et al.*, 2000, Plant Physiol., 122:1343-1353), Zn^{2+} a Zn^0 a -0,24 V (Salt *et al.*, 1999, Environ. Sci. Technol., 33:713-717), Co^{2+} a Co^0 a -0,28 V, Fe^{2+} a Fe^0 a -0,44 V, Cd^{2+} a Cd^0 a -0,40 V (Pickering *et al.*, 1999, BBA-Protein Struct. Mol. Enzymol., 1429:351-364). Además, aunque algunos metales pueden no ser totalmente reducidos en el sistema dentro de la planta, pueden reducirse hasta tal punto que se facilite su interacción con otros metales parcialmente reducidos, tal como se ha observado empleando extracto de tomate para producir cristales de tungstato de plomo a partir de PbO_2 y $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Shen *et al.*, 2011, Colloids Surf. B. Biointerfaces., 2011:284-290).

De modo adecuado, en el proceso de la invención pueden emplearse metales que tienen un potencial de reducción desde 1,5 V (oro(III)) a -0,44 V (hierro(II)). La capacidad o poder de reducción de una planta puede variar según el nivel de biomoléculas antioxidantes presente. Esto puede cambiar según las condiciones de cultivo y recolección y también según la especie vegetal (Gan y Li, 2012).

En una realización, la invención proporciona un método para formar nanopartículas metalizadas, y dicho método comprende:

mezclar al menos 100 µg de partículas de virus sin envuelta con 1 M a 1×10^{-5} M de una sal de metal adecuada en presencia de al menos 5 µl de savia de planta (por ejemplo, procedente de cualquiera de las plantas analizadas anteriormente).

5 Se considera que 100 µg del virus puede producir aproximadamente $1,51 \times 10^{12}$ partículas de virus (virus del mosaico del tabaco), o $1,53 \times 10^{13}$ de partículas de eCPMV, por ejemplo.

10 Tal como se entenderá, las concentraciones finales del material o extractos de plantas y las sales de metales en la mezcla de reacción determinan el avance de la formación de las nanopartículas. Estas concentraciones pueden obtenerse empleando una diversidad de estrategias; por ejemplo, mediante la adición de volúmenes mayores de extractos de plantas más diluidos o volúmenes menores de material o extractos de plantas más concentrados. Los extractos de plantas que contienen niveles altos de antioxidantes tienen un gran poder reductor de sales de metales (concretamente, *Rubus fruticosus* y *Hordeum vulgare*) y pueden emplearse a concentraciones más bajas para la producción de nanopartículas que el material o extracto de planta con un poder reductor de sales de metales más débil (*N. benthamiana*, por ejemplo).

15 Una sal de metal para su uso en cualquier proceso de la presente invención puede ser una sal de hierro, cobre, oro, plata, indio, platino, paladio, rodio, iridio o sus mezclas. Por ejemplo, la sal de metal puede ser HAuCl_4 , AgNO_3 , In_2O_3 o sus mezclas.

En ciertas realizaciones, las partículas de virus pueden ser TMV, TRV, BSMV, IPCV, CTV, PVX, BPV, PLRV, CPMV, CaMV, virus de la polio, de la lengua azul o del ébola o sus mezclas. También pueden emplearse formas no infecciosas de cada una de estas partículas.

20 Las partículas metálicas y metalizadas formadas en el proceso de la presente invención tal como se describió anteriormente pueden ser exclusivas en comparación con otras partículas de virus metálicas y metalizadas debido a la incorporación de biomoléculas derivadas de plantas y la cinética de reacción diferencia del proceso. Estas nanopartículas metalizadas pueden tener numerosos usos, que incluyen en productos electrónicos, de biomedicina, farmacéuticos, cosméticos, en bioquímica y bioquímica vegetal.

25 En ciertas realizaciones, las nanopartículas metálicas pueden tener un tamaño entre 5 nm y 100 nm. En ciertas realizaciones, las nanopartículas pueden tener un diámetro de aproximadamente 10 nm a 100 nm, de modo adecuado de aproximadamente 20 nm a 85 nm, o de 10 nm a 50 nm o mayor que 15 nm, mayor que 25 nm, mayor que 30 nm, mayor que 40 nm, mayor que 50 nm, mayor que 60 nm, mayor que 70 nm, o mayor que 80 nm. En ciertas realizaciones, la mayoría de las aplicaciones nanotecnológicas utilizarán nanopartículas de metal en el intervalo de tamaño de 5-100 nm. Las nanopartículas más pequeñas, tales como de 5-40 nm, tienen unas proporciones mayores de superficie a volumen que las nanopartículas más grandes y, así, pueden ser más útiles en la catálisis o la administración de fármacos. Además, las partículas con estos tamaños pueden tener características ópticas poco habituales (fuerte resonancia de plasmón de superficie) que pueden hacer que sean más útiles en aplicaciones de biodetectores (por ejemplo) que las nanopartículas más grandes. En general, las nanopartículas más pequeñas son más reactivas en virtud de su gran proporción de superficie a volumen y, en consecuencia, pueden ser menos estables; las partículas más grandes pueden ser más adecuadas cuando se requiere una mayor integridad estructural en dispositivos a nanoescala.

35 Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona una estructura formada por nanopartículas proporcionadas mediante cualquier proceso de la invención.

40 En ciertas realizaciones, una estructura de nanopartícula puede tener diversas formas, que incluyen esferas, varillas, prismas, prismas hexagonales y mixtos y otras formas. En ciertas realizaciones, se proporcionan nanopartículas esféricas de modo ventajoso.

45 En otro aspecto, la descripción proporciona dispositivos que comprenden una nanopartícula de metal preparada según cualquiera de los métodos descritos en la presente. De modo adecuado, el dispositivo puede ser, por ejemplo, un ensayo de diagnóstico médico, un dispositivo de transporte dirigido o un dispositivo electrónico.

A lo largo de la memoria descriptiva, a menos que el contexto demande lo contrario, los términos "comprende" o "incluye", o variaciones tales como "que comprende" o "comprendiendo", "que incluye" o "incluyendo" implican que incluyen un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

50 Breve descripción de las figuras

La presente invención a continuación se describirá más a fondo remitiéndose a los siguientes ejemplos no limitantes y figuras, en las que:

55 Figura 1. Análisis de EM de estructuras de oro (a, b) y plata (c) formadas después de la adición de una dilución en 10 veces de savia de *N. benthamiana* a ácido cloroáurico ($2,9 \times 10^{-4}$ M) o nitrato de plata ($2,5 \times 10^{-4}$ M) en ausencia de virus/partículas similares a virus. (a) Un número pequeño de nanotriángulos, esferas y hexágonos de oro de 10-

30 nm; (b) material de oro metalizado agregado; (c) conglomerados agregados de nanopartículas de planta con diversas formas y morfologías formados después de la adición de una dilución en 10 veces de savia de *N. benthamiana* a nitrato de planta ($2,5 \times 10^{-4}$ M).

5 Figura 2. Análisis de EM de nanopartículas de oro formadas después de la adición de una dilución en 10 veces de savia de *N. benthamiana* a ácido cloroáurico ($2,9 \times 10^{-4}$ M) en presencia de partículas de TMV. (a) Redes de TMV decorada con nanopartículas de oro de 15-40 nm dispersadas observadas después de la adición de $0,32 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de TMV a la mezcla de reacción. (b) Metalización de TMV observada después de la adición de altas concentraciones de TMV ($320 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) a la mezcla de reacción.

10 Figura 3. Análisis de EM de nanopartículas de oro formadas después de la adición de una dilución en 10 veces de savia de *N. benthamiana* hervida a ácido cloroáurico ($2,9 \times 10^{-4}$ M) en presencia o ausencia de VLP de BPV. La inclusión de VLP de BPV ($8 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$) en la mezcla de reacción condujo a la formación de partículas de 50-100 nm de morfología pentagonal, hexagonal, triangular, esférica, con forma de diamante y con forma de menhir.

15 Figura 4. Análisis de EM de nanopartículas de plata formadas después de la adición de una dilución en 10 veces de savia de *N. benthamiana* a nitrato de plata ($2,5 \times 10^{-4}$ M) en presencia de TMV ($3,2 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$). (a) La adición de TMV condujo a la formación de nanopartículas de 10-100 nm dispersadas. (b) Las partículas de TMV se metalizaron.

Figura 5. Análisis de EM de nanopartículas de oro formadas después de la adición de una dilución en 50 veces de extractos de *H. vulgare* a ácido cloroáurico ($2,9 \times 10^{-4}$ M) en ausencia de virus (a) o después de la adición de (b) TMV ($2 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción), (c) PVY ($42 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción) o (d) eCPMV ($175 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción).

20 Figura 6. Análisis de EM de nanopartículas de plata formadas después de la adición de una dilución en 50 veces de extractos de *H. vulgare* a AgNO_3 $2,9 \times 10^{-4}$ M en ausencia de virus (a) o después de la adición de (b) TMV ($2 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción), (c) PVY ($42 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción) o (d) eCPMV ($175 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción).

Figura 7. Análisis de EM de nanopartículas de cobalto formadas después de la adición de extractos de *H. vulgare* puros a $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M en ausencia de virus (a) o después de la adición de (b) TMV ($2 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción), (c) PVY ($42 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción) o (d) eCPMV ($175 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción).

25 Figura 8. Análisis de EM de nanopartículas producidas empleando diluciones en 10 veces de extractos de *Rubus fruticosus* con (a) HAuCl_4 $2,9 \times 10^{-4}$ M solo, y con (b) TMV a una concentración final de $0,32 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción, (c) nanopartículas de plata producidas empleando una dilución en 10 veces de extractos de *Rubus fruticosus* con AgNO_3 $2,9 \times 10^{-4}$ M solo y con (d) CPMV a una concentración final de $175 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción, (e) nanopartículas de cobalto producidas empleando extractos de *Rubus fruticosus* puros con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M solo, y con (f) PVY a una concentración de $42 \mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción.

30

Figura 9. Análisis de EM de nanopartículas de oro formadas *in planta* después de la aplicación hidropónica de HAuCl_4 $2,9 \times 10^{-5}$ M en (a) plantas no infectadas, o plantas sintomáticas infectadas con (b) TYMV o (c) TuMV.

35 Figura 10. Espectrofotometría de luz UV-visible de nanopartículas de plata producidas empleando una dilución en 10 veces de extractos de cebada con AgNO_3 $2,9 \times 10^{-4}$ M en presencia o en ausencia de TMV 100 g/ml. La presencia de nanopartículas de plata viene indicada por un pico a aproximadamente 475 nm y los hombros anchos desde 350 nm a 600 nm, que pueden variar en función del tamaño de las nanopartículas. (a) Muestra espectros procedentes de reacciones que consisten en solo la sal, un extracto con TMV, un extracto con AgNO_3 , y un extracto con AgNO_3 y TMV. No se muestra el ensayo solo con TMV puesto que las bajas concentraciones empleadas en las reacciones impiden la detección empleado este método analítico. (b) Muestra el efecto sobre el rendimiento y la pureza de las nanopartículas de una purificación empleando dos etapas de centrifugación y lavado y una etapa de concentración (las nanopartículas se concentraron en 3 veces mediante la resuspensión del sedimento en una tercera parte del volumen original del sobrenadante); se eliminaron la mayoría de los contaminantes (véase la región de 300-350) y se potenció el rendimiento. (c) Análisis de EM de nanopartículas antes de la purificación y la concentración, y después (d).

40

45 Ejemplos

Ejemplo 1: El TMV potencia el rendimiento y la uniformidad de nanopartículas de oro en las reacciones de biosíntesis

Los experimentos iniciales con ácido cloroáurico y extractos de savia filtrados de *N. benthamiana* condujeron a una reducción rápida de los iones de oro para producir agregados de oro que se cree que están embebidos en material biológico amorfo; la dilución de la savia y el ácido cloroáurico evitó la agregación hasta cierto punto, pero comprometió el número de nanopartículas discretas formadas. Por ejemplo, se descubrió que utilizando HAuCl_4 a $2,9 \times 10^{-4}$ M con diluciones en 10 veces del extracto de savia se producían nanotriángulos y hexágonos de oro discretos con un diámetro que varía de 10-100 nm (figura 1a). Sin embargo, también se observó que, además de nanopartículas dispersadas, también se observaban habitualmente grandes agregaciones amorfas metalizadas de tamaño de micrómetros (figura 1b)g. Es probable que estos agregados disminuyan el número de nanopartículas (rendimiento) secuestrando los iones de metales disponibles. La adición de TMV a la mezcla de reacción de savia

50

55

diluida en 10 veces (0,32 µg/200 µl) condujo a la formación de matrices reticuladas de TMV con un gran número de nanopartículas de oro de 15-40 nm (figura 2a). El número de las nanopartículas formadas fue significativamente mayor (aproximadamente en 5 veces) que el observado en savia más solo ácido cloroáurico (figuras 1a y 1b), y las partículas eran más uniformes. Además, el TMV también redujo mucho la aparición de la agregación. Se descubrió que unas bajas concentraciones de TMV tienen un efecto positivo sobre el rendimiento y la dispersión de las nanopartículas. Unas mayores concentraciones (320 µg/200 µl) condujeron a la producción de partículas de TMV metalizadas (figura 2b), que también pueden ser importantes para algunas aplicaciones. Por tanto, el TMV potencia el rendimiento y la uniformidad de las nanopartículas de oro en las reacciones de biosíntesis. Además, TMV es una herramienta útil para modular las reacciones y, en sí mismo, puede ser un molde para el depósito de oro.

10 **Ejemplo 2: Las VLP de BPV potencian el rendimiento y modulan la forma de partícula de las nanopartículas**

Se repitió el experimento del ejemplo 1, excepto que se emplearon partículas similares a virus del virus del papiloma bovino (VLP de BPV) en lugar de TMV. Las VLP de BPV están compuestas solo de la proteína de la envuelta L1 de BPV que, cuando se expresa en plantas, se autoensambla en partículas similares a virus con un diámetro de aproximadamente 30 nm. Estas VLP no contienen ácido nucleico y, por tanto, no son infecciosas. El gen de la proteína de la envuelta L1 de BPV se clonó en un vector de expresión binario pCB301 y se transfirió a la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Después de un crecimiento durante la noche a 28 °C en LB que contenía los antibióticos apropiados, el *Agrobacterium* se sedimentó mediante centrifugación y se resuspendió en medio de infiltración (MES 10 mM, MgCl₂ 10 M, acetosiringona 20 µM) hasta un DO 600 de 0,5. El cultivo se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente antes de la infiltración con jeringa en hojas de *N. benthamiana*. Las plantas se recolectaron cinco días después, dejando que transcurriera el tiempo suficiente para que apareciera una expresión transitoria *in planta* suficiente del gen (para una visión de conjunto de este proceso, véase Voinnet *et al.*, 2003, Plant J., 33:949-956). El material foliar se trituró en nitrógeno líquido y la extracción de las VLP se realizó empleando un procedimiento de begomovirus modificado, según se describe en Matic *et al.* (2012, Plant Biotech. Journal, 10:410-421). Se confirmó la integridad de las VLP empleando un análisis de EM antes de ser utilizadas como moduladores potenciales de la síntesis de nanopartículas de oro. Se descubrió que la adición de 8 µg/200 µl de VLP de BPV a la mezcla de reacción produjo una gama sorprendentemente diversa de gran cantidad de nanopartículas dispersadas con un tamaño que varía de 50-150 nm que tenían una morfología pentagonal, hexagonal, triangular, esférica, con forma de diamante y con forma de menhir (véase la figura 3) frente a los agregados formados en la mezcla de reacción que carecía de BPV (figura 1b). Esto también contrasta con los rendimientos aproximadamente 5 veces menores observados en la mezcla de reacción que carece de VLP de BPV. Por consiguiente, las VLP de BPV modulan el número y la forma de las partículas cuando se incorporan en la mezcla de síntesis de nanopartículas de oro.

35 **Ejemplo 3: El TMV puede inhibir la agregación y estimular la formación de altos rendimientos de nanopartículas de plata dispersadas, y también actúa como molde para la metalización**

Se empleó una dilución 1/10 de savia con AgNO₃ 2,5x10⁻⁴ M en lugar de HAuCl₄ en el protocolo del ejemplo 1. Se observaron concreciones agregadas de nanopartículas de planta de muchas formas y tamaños (figura 1c) en el control que carecía de TMV. Por contraste, la adición de TMV (0,32 µg/200 µl) a la mezcla de reacción condujo a la formación de matrices de TMV en las que se observaron nanopartículas de 10-100 nm dispersada con pocas señales de agregación (figura 4a). Una mayor magnificación reveló que las varillas de TMV también estaban metalizadas (figura 4b). Por tanto, el TMV puede inhibir la agregación de las nanopartículas y estimular la formación de altos rendimientos de nanopartículas dispersadas, y también actúa como molde para la metalización.

40 **Ejemplo 4: Otras partículas similares a virus (VLP) (tales como VLP del virus del enrollamiento de la hoja de patata) como aditivos en la mezcla de reacción**

Otra realización de esta tecnología es el uso de otras partículas similares a virus (VLP) (tales como VLP del virus del enrollamiento de la hoja de patata) como aditivos en la mezcla de reacción. Las VLP generalmente están compuestas solo por proteína de la envuelta del virus y se producen empleando sistemas de expresión de células vegetales, de insecto, bacterianas y de mamífero. Se ha descubierto que los sistemas de expresión de células vegetales y de insecto pueden emplearse de modo seguro y eficaz para expresar monómeros de proteínas de la envuelta de virus a niveles elevados, que después se autoensamblan en viriones vacíos que no contienen ácido nucleico y, por tanto, son seguros y no infecciosos. Además, estas VLP pueden modificarse aún más mediante la inserción de secuencias en regiones de la proteína de la envuelta que están expuestas a la superficie. Por consiguiente, el uso de VLP en la mezcla de reacción de nanopartículas basada en plantas mejorará la seguridad y permitirá la posterior modificación de la dinámica/cinética de reacción mediante la inserción de secuencias en la superficie de VLP que controlan el depósito de metales o minerales.

55 Los virus empleados fueron partículas similares al virus BPV (VLP), VLP de CPMV, TMV, PVY según los ejemplos expuestos. No se emplearon VLP del virus del enrollamiento de la hoja de patata en ninguno de los experimentos.

Ejemplo 5: Mezclas de reacción que emplean extractos de savia de plantas monocotiledóneas (cebada (*Hordeum vulgare*))

Se repitieron las condiciones experimentales indicadas en los ejemplos 1-3 excepto que se empleó extracto de savia de cebada en lugar de savia de *N. benthamiana* y también se investigó TMV. Se descubrió que los extractos de cebada son capaces de reducir el ácido cloroáurico y el nitrato de plata para producir nanopartículas metálicas con un tamaño y forma similares a las obtenidas empleando extractos de *N. benthamiana*. Además, también se observó que la inclusión de TMV en la mezcla de reacción inhibe la agregación de nanopartículas metálicas y conduce a la formación de virus metalizados.

En particular, se repitió el experimento indicado en el ejemplo 1 excepto que se emplearon extractos de savia de *Hordeum vulgare* en lugar de *N. benthamiana*. Se descubrió que diluciones en 50 veces de extractos de *H. vulgare* mezclados con HAuCl_4 $2,9 \times 10^{-4}$ M condujeron a una rápida producción de nanopartículas de oro esféricas en el intervalo de tamaño de 10-20 nm que se presentaban predominantemente en agregados asociados con material biológico (figura 5a). La adición de TMV con forma de varilla a la mezcla de reacción a una concentración de 2 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción potenció significativamente la producción de nanopartículas esféricas de 10 nm e inhibió la agregación (figura 5b). También se obtuvieron mejoras similares cuando se añade virus Y de la patata (PVY) filamentoso (figura 5c) o eCPMV esférico (figura 5d) a las reacciones a unas concentraciones de 42 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ o 175 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$, respectivamente; se observaron grandes cantidades de nanopartículas esféricas de 10-20 nm y ninguna agregación cuando se compara con las reacciones que carecen de virus (figura 5).

Ejemplo 6: Mezclas de reacción que emplean extractos de savia de diversas plantas, tales como frutos de moras (*Rubus fruticosus*), de clavo (*Syzygium aromaticum*) y de lima (*Citrus aurantifolia*), hojas de soja (*Glycine max*) y hojas de espinaca (*Spinacia oleracea*)

Se repitieron los ejemplos 1-3 empleando savia de plantas procedente de frutos de moras, de clavo y de lima, y hojas de soja y hojas de espinaca.

Se repitió el experimento indicado en el ejemplo 5 excepto que se empleó AgNO_3 $2,9 \times 10^{-4}$ M en lugar de HAuCl_4 $2,9 \times 10^{-4}$ M. Se descubrió que unas diluciones en 50 de extractos de cebado condujeron a la formación de nanopartículas de plata esféricas de 10-20 nm (figura 6a). Por contraste, la adición de TMV a la mezcla de reacción a una concentración de 2 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ facilita la mayor producción de nanopartículas de plata esféricas de 5-30 nm (figura 6b). La inclusión de PVY a una concentración de 42 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ o de eCPMV a una concentración de 175 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ también condujo a la mejora de la reacción de síntesis, de modo que se observaron cantidades mayores de partículas de 10-25 nm que en la reacción sin virus (figuras 6c y 6d, respectivamente).

Ejemplo 7: La inclusión de virus esféricos, con forma de varilla o filamentosos facilita la producción de nanopartículas de cobalto en reacciones de biosíntesis de *Hordeum vulgare* (cebada)

Se repitió el experimento indicado en el ejemplo 5 excepto que se emplearon extractos de cebada puros junto con $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M. Se descubrió que los extractos de cebada puros no pueden utilizarse para producir nanopartículas de cobalto a partir de sales de cobalto (figura 7a). Sin embargo, la adición de TMV hasta una concentración final de 2 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ permitió la producción de grandes nanopartículas de cobalto de 20-50 nm (figura 7b). De modo similar, también se detectaron nanopartículas de este tamaño cuando se añadieron 175 μg de eCPMV a la reacción de 200 μl (figura 7d). Por contraste, con PVY (42 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ de reacción) se formó un gran número de partículas de 10-30 nm muy asociadas (figura 7c).

Ejemplo 8: La inclusión de virus con forma de varilla potencia la producción de nanopartículas de oro en extractos de *Rubus fruticosus*

Se descubrió que diluciones en 10 veces de extractos de *Rubus fruticosus* mezclados con ácido cloroáurico $2,9 \times 10^{-4}$ M producían nanopartículas de oro en el intervalo de tamaño de 5-50 nm (figura 8a). La adición de TMV hasta una concentración final de 0,32 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ potenció la producción de nanopartículas (figura 8b) más allá de la observada en reacciones sin virus.

Ejemplo 9: La inclusión de virus esféricos potencia y modifica la producción de nanopartículas de plata en extractos de *Rubus fruticosus*

Diluciones en diez veces de extractos de *Rubus fruticosus* catalizan la formación de nanopartículas de plata de 20 nm a partir de AgNO_3 $2,9 \times 10^{-4}$ M (figura 8c). La adición de eCPMV a una concentración final de 175 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ potencia significativamente el número de nanopartículas producidas y aumenta su distribución de tamaño (figura 8d).

Ejemplo 10: La inclusión de virus filamentosos facilita la producción de nanopartículas de cobalto en extractos de *Rubus fruticosus*

Diluciones en diez veces de extractos de *Rubus fruticosus* fueron muy poco eficaces para producir nanopartículas de cobalto a partir de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 M (figura 8e). Sin embargo, la adición de PVY a una concentración final de 42 $\mu\text{g}/200 \mu\text{l}$ permitió la formación de un gran número de nanopartículas de 30-50 nm (figura 8f).

Ejemplo 11: Plantas intactas infectadas con virus o que expresan VLP a partir de un ácido nucleico introducido, cultivadas de modo hidropónico en sales de metales para la producción de nanopartículas

Se considera que una diversidad de plantas que son tolerantes a la sal o que son capaces de hiperacumular iones de metales, por ejemplo, *Thellungiella halophila* y *Brassica juncea*, pueden cultivarse hidropónicamente en un medio líquido. Después de la infección con virus (tales como virus con forma de varilla, filamentosos e icosaédricos) o la inducción de la expresión de VLP *in planta*, las plantas se colocan en un sistema hidropónico que contiene una sal de metal/ácido de metal (tal como HAuCl_4 , KAuCl_4 , AgNO_3 , $\text{In}(\text{OCCH}_3\text{CHOCCH}_3)_3$, PdCl_2 , $\text{H}_2\text{PtCl}_6 \cdot (\text{H}_2\text{O})_6$ y $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\text{NO}_3$), a unas concentraciones que varían de 1-10.000 ppm. Las plantas captarían los metales y los reducirían para producir nanopartículas. Informes previos han demostrado que plantas infectadas con virus a menudo presentan unos niveles de antioxidantes muy aumentados (Xu *et al.*, 2008, *New Phytol.*, 180:911-921). Además, basándose en los datos de los inventores acerca de la síntesis de nanopartículas basada en extractos de plantas, la presencia de virus en la planta puede mejorar el número y la monodispersión de las nanopartículas y conducir a la formación de virus metalizados.

En un ejemplo de esta metodología, se realizó una infección con virus esféricos (virus del mosaico amarillo del nabo) o filamentosos (virus del mosaico del nabo) de *Brassica juncea* para determinar si se potencia la formación de nanopartículas de oro.

Se colocaron semillas de *Brassica juncea* en tubos Eppendorf de 1,5 ml que se rellenaron con 500 μl de $\frac{1}{2}$ MS solidificado (sales basales de Murashige y Skoog), pH 5,6, medio nutriente de agar al 0,8%. Se cortó el fondo de los tubos Eppendorf en la marca de graduación de 100 μl para permitir la penetración de la disolución nutriente $\frac{1}{2}$ MS, pH 5,6, que se encontraba en un depósito situado en la parte inferior. El aparato se diseñó de tal forma que las raíces se quedasen en la oscuridad y las partes aéreas de la planta estuviesen expuestas a la luz. Las semillas se estratificaron durante la noche a 4 °C antes de trasladarlas a un invernadero a 22 °C y condiciones de longitud del día de 16 horas. El depósito que contenía el medio $\frac{1}{2}$ MS, pH 5,6, se vació y se rellenó cada cuatro días. Cuando las plantas alcanzaron la etapa de desarrollo de dos hojas verdaderas (es decir, dos cotiledones más dos hojas verdaderas), se inocularon con virus del mosaico amarillo del nabo (TYMV; partículas esféricas) o virus del mosaico del nabo (TuMV; filamentosos), en las que la suspensiones de virus brutas se habían mezclado con Celite abrasivo y se inocularon con frotamiento en una de las dos hojas verdaderas emergentes. Dos semanas después, los síntomas de todas las plantas inoculadas con el virus fueron muy obvios: malformación de las hojas, coloración alterada y dibujo de mosaico. En esta etapa, el medio $\frac{1}{2}$ MS, pH 5,6, se retiró y las raíces se enjuagaron con agua y se les suministró agua o ácido cloroáurico $2,9 \times 10^{-5}$ M. Estos tratamientos se aplicaron a plantas control infectadas con virus y no inoculadas. Las disoluciones de ácido cloroáurico y agua fueron repuestas cada dos días. Dos semanas después, se recolectó el material de estas plantas, se lavó y después se secó antes de triturar formando un polvo fino para el análisis de EM.

Se descubrió que, en el tejido foliar de las plantas no infectadas tratadas con ácido cloroáurico, estaban presentes pequeñas cantidades de nanopartículas de oro de 10-20 nm (figura 9a), mientras que se observaron grandes cantidades en plantas infectadas con TYMV (figura 9b) y TuMV (figura 9c). Por tanto, la infección de plantas con virus potencia la formación y la acumulación de nanopartículas de oro en plantas completas.

Ejemplo 12: Pueden purificarse nanopartículas a partir reacciones de síntesis de extractos de plantas y concentrarse

Se constituyeron reacciones de nanopartículas de plata de 10 ml combinando una dilución 1/10 de extractos de cebada con AgNO_3 $2,9 \times 10^{-4}$ M en presencia o ausencia de TMV 100 $\mu\text{g/ml}$. Se dejó que las reacciones se desarrollasen durante 24 horas para que se completasen y se facilitase la sedimentación de los agregados grandes. Se tomaron los sobrenadantes y se analizaron empleando una espectrofotometría para determinar la formación de nanopartículas de plata (figura 10a). La presencia de nanopartículas de plata en la reacción puede determinarse debido a una señal espectral característica: un pico en las longitudes de onda 450-470 nm con amplios hombros que se extienden desde 350 nm a 600 nm. Este pico se detectó en la reacción del extracto más sal de plata, lo cual indica la presencia de nanopartículas (figura 10a). Tal como se esperaba, la adición de TMV a esta reacción potenció significativamente la magnitud de este pico (figura 10a), lo cual indica una mayor producción de nanopartículas, lo cual resulta coherente con los descubrimientos previos. Tal como se esperaba, solo AgNO_3 o extracto con solo TMV no produjeron la típica curva de nanopartículas de plata debido a la ausencia de nanopartículas (figura 10a). Los espectros de solo TMV y solo extracto no se muestran, puesto que la baja concentración de TMV en las mezclas de reacción impide la detección empleando estrategias espectrofotométricas, de modo que el espectro del extracto solo es equivalente al del extracto más solo virus.

Para la posterior purificación y concentración de las nanopartículas de plata a partir del extracto con TMV se recogieron 9 ml del sobrenadante y se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 g. Los sobrenadantes se rechazaron y los sedimentos se resuspendieron en agua desionizada destilada hasta el volumen original. Se realizaron dos etapas más de centrifugación/resuspensión, y la etapa de resuspensión final implicó la adición de 3 ml de agua, con lo cual, teóricamente, concentra con eficacia las nanopartículas en tres veces. Un posterior análisis espectrofotométrico de UV-visible confirmó que la purificación y la concentración de las nanopartículas había tenido éxito: el pico de las nanopartículas esperado era alto y se habían eliminado muchos contaminantes (véase la

- disminución en la región de 300-350 nm; figura 10b) cuando se compara con el sobrenadante de partida. Mediante la integración del área bajo las curvas (en la figura 10b) entre las longitudes de onda de 375 y 600 nm, se calculó que el método de purificación y concentración condujo a un enriquecimiento en 2,6 veces en el rendimiento de las nanopartículas. Comparando el enriquecimiento en número de veces teórico y real se puede calcular que aproximadamente 86% de las nanopartículas quedan retenidas durante el procedimiento de purificación. Las figuras 10c y d, respectivamente, muestran el análisis de EM de nanopartículas de plata antes y después de la purificación y la concentración. Tal como se esperaba, se observó un número mayor de nanopartículas después de la concentración (figuras 10c y d). Así, las nanopartículas de metales pueden purificarse y concentrarse a partir de reacciones de extractos de plantas empleando unas sencillas etapas de centrifugación a baja velocidad y lavado.
- 10 Aunque la invención se ha mostrado y descrito en concreto haciendo referencia a ejemplos concretos, los expertos en la técnica entenderán que pueden realizarse diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la presente invención.

Referencias bibliográficas

- Hoeppener C. y Novotny L. (2012), *Quarterly reviews of Biophys.*, 45:209-255.
- 15 Wang, J. (2012), *Microchimia Acta*. 117: 245-270.
- Narayanan K.B., Sakthivel N. (2011), *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 169:59-79.
- Raveendran P., Fu J., Wallen S.L. (2003), *J. Am. Chem. Soc.*, 125:13940. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y. (2009), *J. Colloid. Interface Sci.*, 145:83.
- Narayanan K.B., Sakthivel N. (2010), *J. Colloid. Interface Sci.*, 156:1.
- 20 Govindaraju K., Basha S.K., Kumar V.G., Singaravelu G. (2008), *J. Mater. Sci.*, 43:5115.
- Scarano G., Morelli E. (2002), *Biometals*, 15:145.
- Scarano G., Morelli E. (2003), *Plant Sci.*, 165:803.
- Anshup, Venkataraman J.S., Subramaniam C., Kumar R.R., Priya S., Kumar T.R.S., *et al.* (2005), *Langmuir*, 21:11562.
- 25 Lengke F.M., Fleet E.M., Southam G. (2007), *Langmuir*, 23:2694-2699.
- Shankar S.S., Ahmad A., Pasricha R., Sastry M. (2003), *J. Mater. Chem.*, 13:1822.
- Shankar S.S., Rai A., Ankamwar B., Singh A., Ahmad A., Sastry M. (2004), *Nat. Mater.*, 3:482.
- Shankar S.S., Rai A., Ahmad A., Sastry M. (2004b), *J. Colloid. Interface Sci.*, 275:496.
- 30 Maensiri S., Laokul P., Klinkaewnarong J., Phokha S., Promarak V., Seraphin S. (2008), *J. Optoelectron. Adv. Mater.*, 10:161.
- Vilchis-Nestor A.R., Sánchez-Mendieta V., Camacho-López M.A., Gomez-Espinosa R.M., Camacho-López M.A., Arenas-Alatorre J.A. (2008), *Mater. Lett.*, 62:3103.
- Song J.Y., Jang H.K., Kim B.S. (2009), *Proc. Biochem.*, 44:1133.
- Song J.Y., Kim B.S. (2009), *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 32:79.
- 35 Kadri A., Maiss E., Amsharov N., Bittner A.M., Balci S., Kern K., Jeske H., Wege C. (2011), *Virus Research*, 157:35-46.
- Aljabali A.A.A., Barclay J.E., Lomonosoff G.P., Evans D.J. (2010), *Nanoscale*, 2, 2596-2600. Balci, S., Hahn, K., Kopold, P., Kadri, A., Wege, C., Kern, K., y Bittner, A.M. (2012), *Nanotechnology*, 23.
- Knez M., Kadri A., Wege C., Gosele U., Jeske H., y Nielsch K. (2006), *Nano Lett.*, 6, 1172-1177.
- 40 Endo M., Wang H.X., Fujitsuka M., y Majima T. (2006), *Chemistry*, 12, 3735-3740.
- Shimizu T., Masuda M., y Minamikawa H. (2005), *Chem. Rev.*, 105, 1401-1443.
- Lee S.Y., Lim J.S., y Harris M.T. (2012), *Biotechnol. Bioeng.*, 109, 16-30.
- Bittner A.M. (2005), *Naturwissenschaften*, 92, 51-64.
- Dujardin E., Peet C., Stubbs G., Culver J.N., y Mann S. (2003), *Nano Lett.*, 3, 413-417.

- Atanasova P., Rothenstein D., Schneider J.J., Hoffmann R.C., Dilfer S., Eiben S., Wege C., Jeske H., y Bill J. (2011), *Adv. Mater.*, 23, 4918-4922.
- Chen X.L., Gerasopoulos K., Guo J.C., Brown A., Ghodssi R., Culver J.N., y Wang C.S. (2011), *Electrochim. Acta*, 56, 5210-5213. Wu Z., Mueller A., Degenhard S., Ruff S.E., Geiger F., Bittner A.M., Wege C., y Krill C.E. (2010), *ACS Nano*, 4, 4531-4538.
- 5 Love, A. J., Chapman, S. N., Matic, S., Noris, E., Lomonosoff, G. P., Taliany, M., *In planta* production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1, 2012, *Planta*, 236(4), 1305-1313.
- Tan, N.T., Lee, Y., Wang, D. I. C., Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles, 2010, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 5677-5686.
- 10 Saunders, K., Sainsbury, F., Lomonosoff, G. P., 2009, Efficient generation of Cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants, *Virology*, 353, 329-337.
- Aljabali, A. A. A, Shah, S. N., Evans-Gowing, R., Lomonosoff, G. P., Evans, D. J., 2011, Chemically-coupled-peptide-promoted virus nanoparticle templated mineralization, *Integr. Biol.*, 2011, 3, 119-125.
- Lukman A.I., Gong B., Marjo C.E., Roessner U., Harris A.T. (2011), *J. Colloid. Interface Sci.*, 353 :433-444.
- 15 Lin L., Wang W., Huang J., Li Q., Sun D., Yang X., Wang H., He N., Wang Y. (2010), *Chem. Eng. J.*, 162:852-858.
- Das R.K., Gogoi N., Bora U. (2011), *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 34:615-619.
- Thuenemann E.V., Lenzi P., Love A.J., Taliany M.E., Becares M., Zuniga S., Enjuanes L., Zahmanova G.G., Minkov I.N., Matic S., Noris E., Meyers A., Hattingh A., Rybicki E.P., Kiselev O.I., Ravin N.V., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lomonosoff G.P. (2013), *Curr. Pharma. Design*, 19:5564-5573.
- 20 Nadagouda M.N., Varma R.S. (2008), *Green Chem.*, 10:859-862.
- Nadagouda M.N., Castle A.B., Murdock R.C., Hussain S.M., Varma R.S. (2010), *Green Chem.*, 12:114-122.
- Njagi E.C., mHuang H., Stafford L., Genuino H., Galindo H.M., Collins J.B., Hoag G.E., Suib S.L. (2010), *Langmuir*, 27:264-271.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir partículas de virus revestidas con metales o nanopartículas metálicas, comprendiendo dicho proceso mezclar partículas de virus, un material vegetal con poder reducir capaz de reducir iones de metales o sales de metales para producir nanopartículas, y una sal de metal.
- 5 2. El proceso según la reivindicación 1, en el que las partículas de virus se seleccionan de partículas de virus sin envuelta que tienen una cubierta de cápsida, bacteriófagos y partículas similares a virus que carecen de contenido en ácido nucleico, preferiblemente en el que los virus sin envuelta tienen una cubierta de cápsida seleccionada de una cápsida helicoidal, una cápsida filamentosa y una cápsida icosaédrica, y los bacteriófagos tienen una morfología seleccionada de isométrica, con forma de limón, ovoide, con forma de botella, con forma de varilla, filamentosa y pleomórfica.
- 10 3. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que las partículas de virus son virus genética y/o químicamente modificados con una superficie alterada que presenta péptidos de unión a metales o reductores de metales.
- 15 4. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las sales de metales se seleccionan de metales de transición y aluminio, galio, germanio, estaño, plata, oro, hierro, cobre, indio, platino, paladio, rodio, iridio, cobalto.
- 20 5. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el material vegetal se extrae de *Nicotiana sp.*, *Musa sp.*, *Psidium sp.*, *Avena sp.*, *Azadirachta sp.*, *Chenopodium sp.*, *Syzygium sp.*, *Citrus sp.*, *Glycine sp.*, *Spinacia sp.*, *Carica sp.*, *Stevia sp.*, *Pinus sp.*, *Diopyros sp.*, *Gingko sp.*, *Magnolia sp.*, *Platanus sp.*, *Nicotiana benthamiana*, *Musa paradisiaca*, *Psidium guava*, *Avena sativa*, *Azadirachta indica*, *Chenopodium album*, *Syzygium aromaticum*, *Citrus*, *Glycine max*, *Spinacia oleracea*, *Hordeum vulgare*, *Triticum spp*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Solanum tuberosum*, *Daucus carota*, *Brassica spp*, *Beta vulgaris*, *Saccharum*, *Solanum lycopersicum* o *Vitis*.
- 25 6. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que una primera sal de metal se mezcla con el material vegetal y la partícula de virus en un primer momento, y una segunda o posterior sal de metal se mezcla en un segundo momento.
7. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el proceso se realiza *ex planta* (fuera de la planta).
8. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el proceso se realiza *in planta* (dentro de la planta).
- 30 9. El proceso según la reivindicación 8, en el que el proceso comprende:
- i) proporcionar una planta infectada con un virus sin envuelta y/o que es capaz de expresar una partícula de un virus sin envuelta y que es capaz de reducir iones de metales o sales de metales para producir nanopartículas; y
- 35 ii) exponer dicha planta a una concentración de una sal de metal hidrosoluble suficiente para la formación de nanopartículas.
10. El proceso según la reivindicación 8, en el que el proceso comprende:
- i) proporcionar un planta capaz de reducir iones de metales o sales de metales para producir nanopartículas, y exponer dicha planta a una concentración de una sal de metal hidrosoluble suficiente para la formación de nanopartículas; y
- 40 ii) exponer dicha planta a un virus sin envuelta y/o a una construcción genética capaz de expresar una partícula de un virus sin envuelta.
11. El proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el material vegetal tiene la capacidad de reducir metales con unos potenciales de reducción en el intervalo de 1,5 V a -0,44 V.

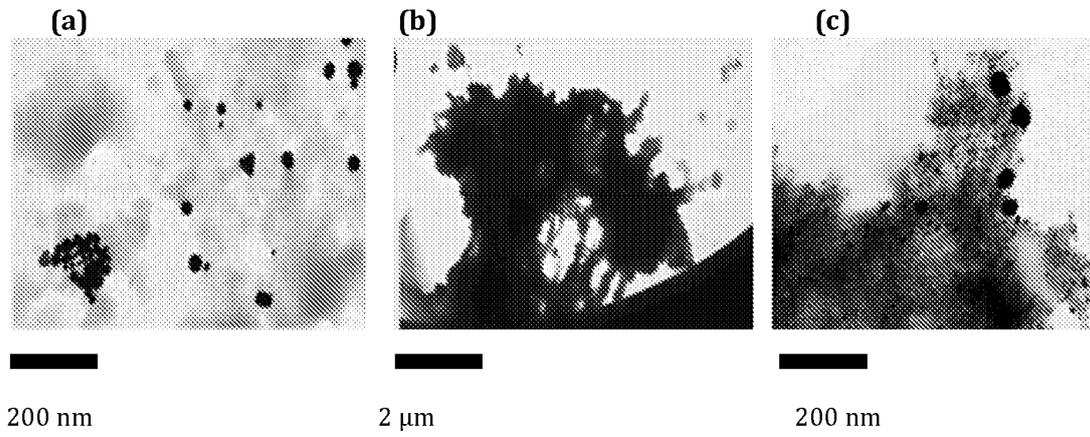


Figura 1

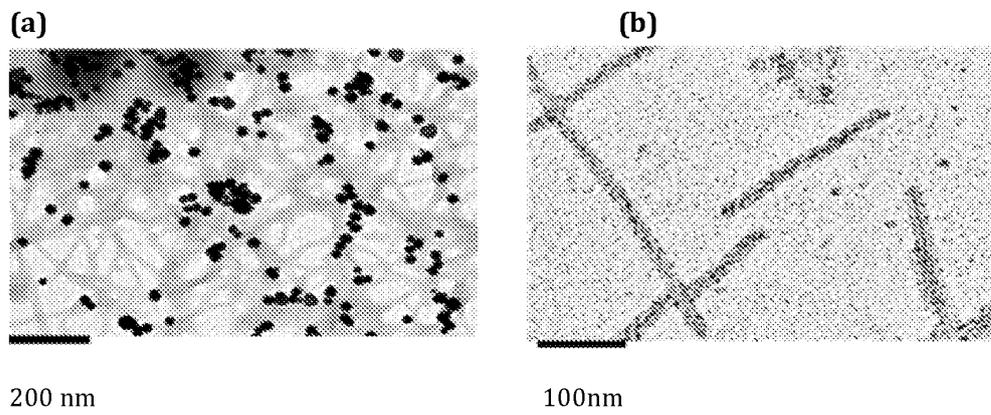
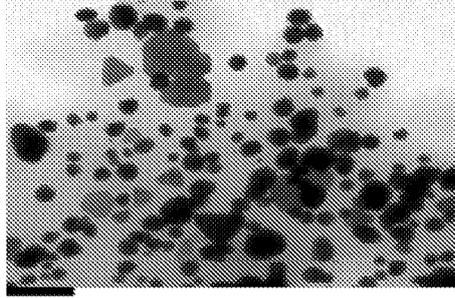


Figura 2



100 nm

Figura 3

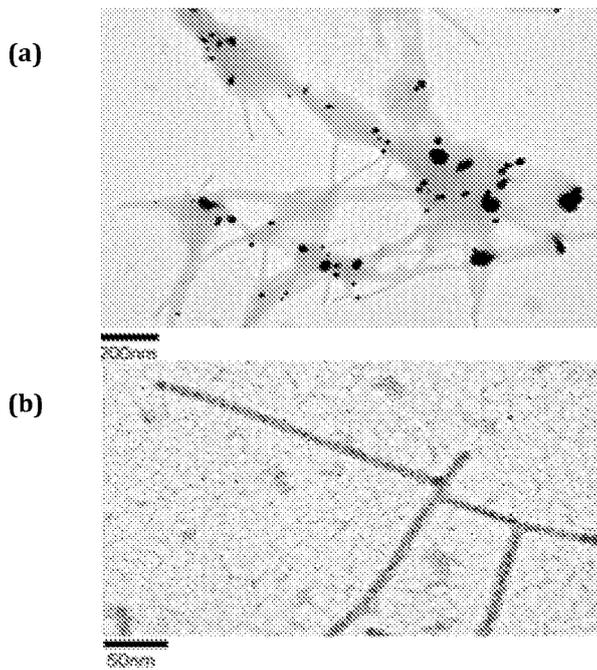


Figura 4

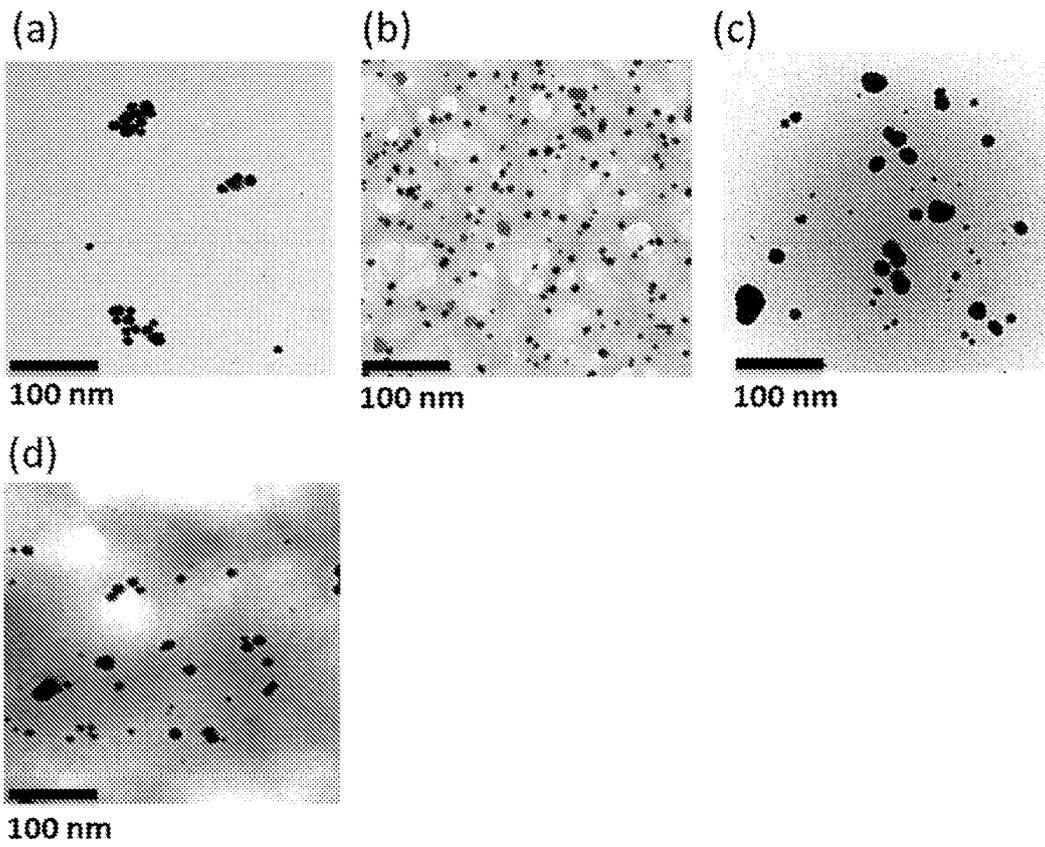


Figura 5

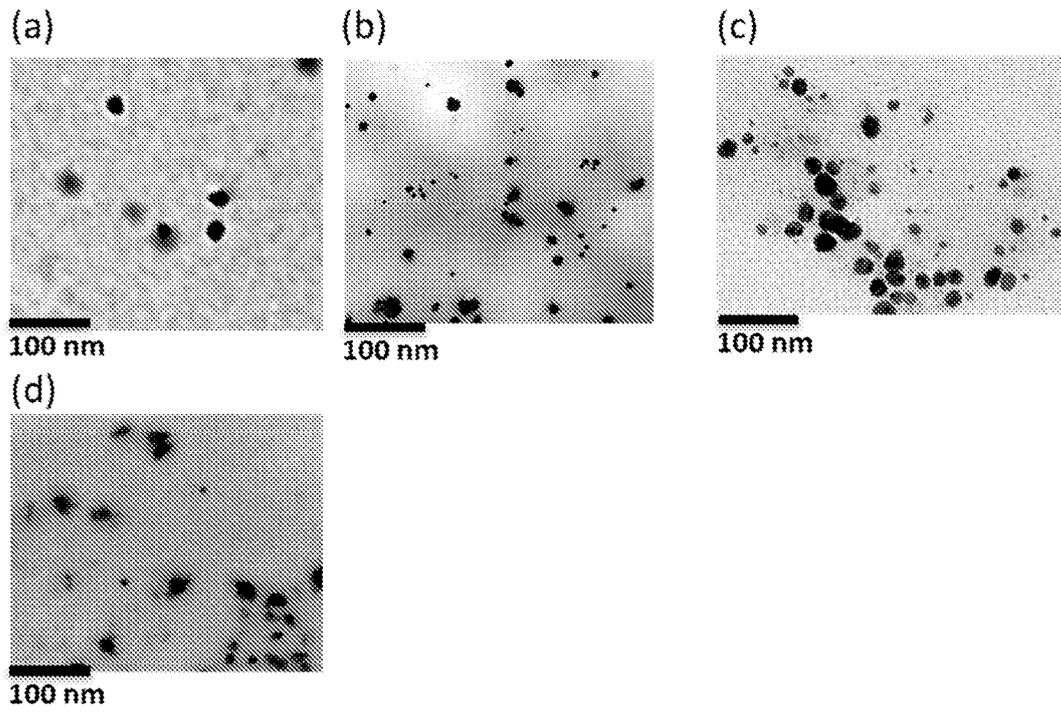


Figura 6

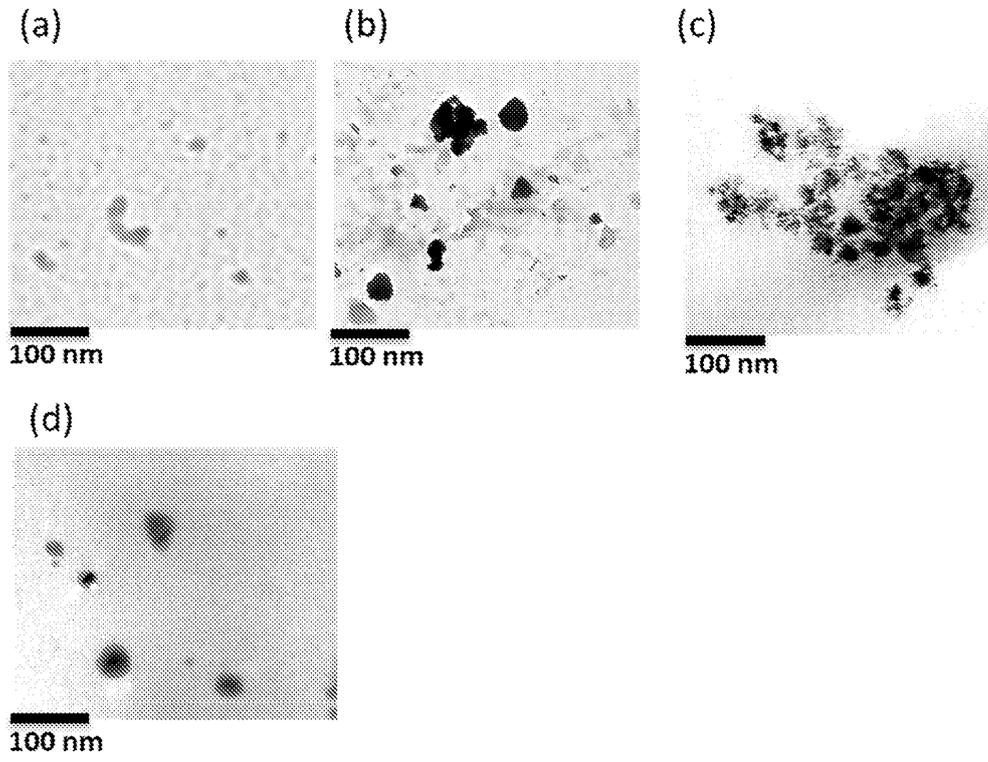


Figura 7

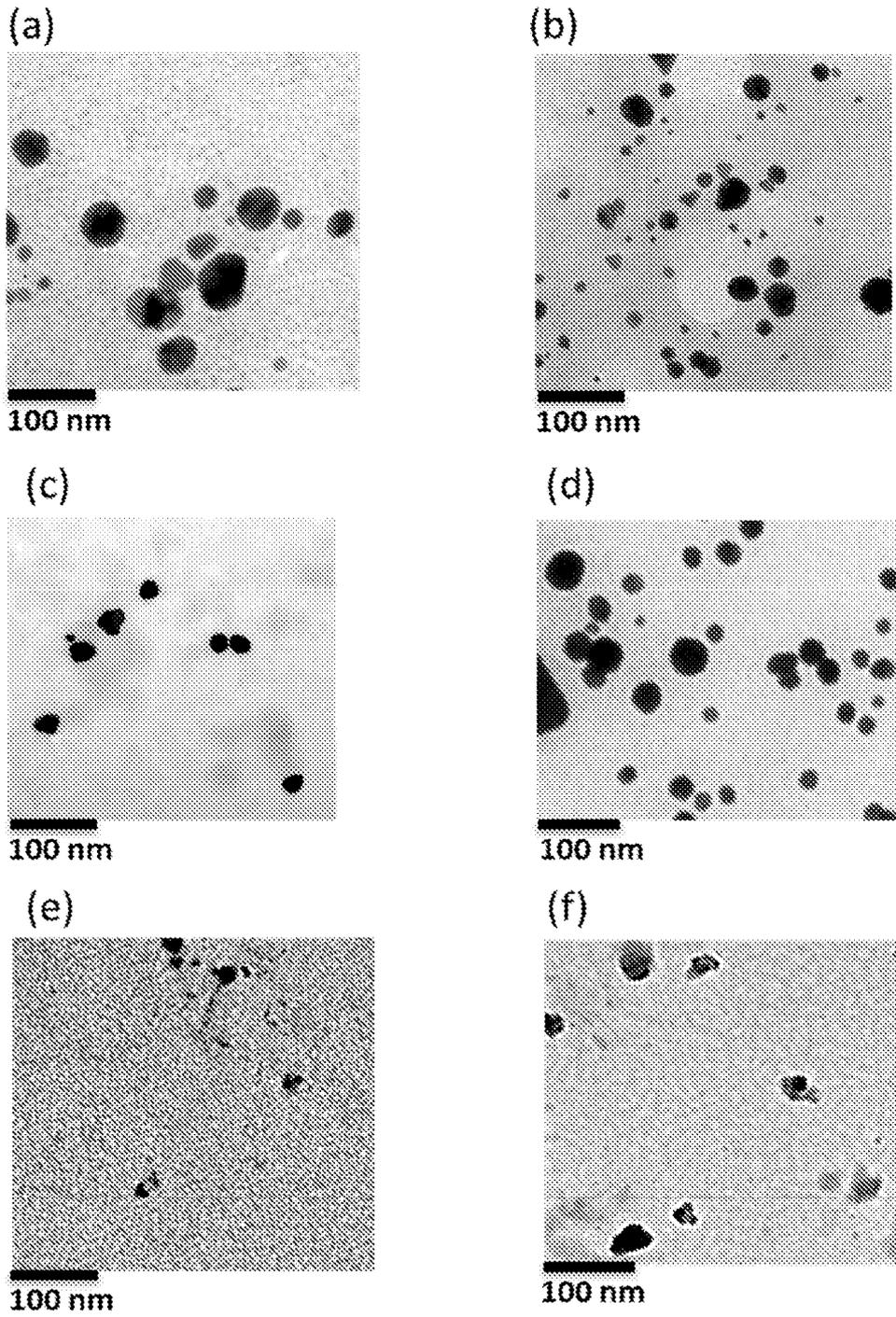


Figura 8

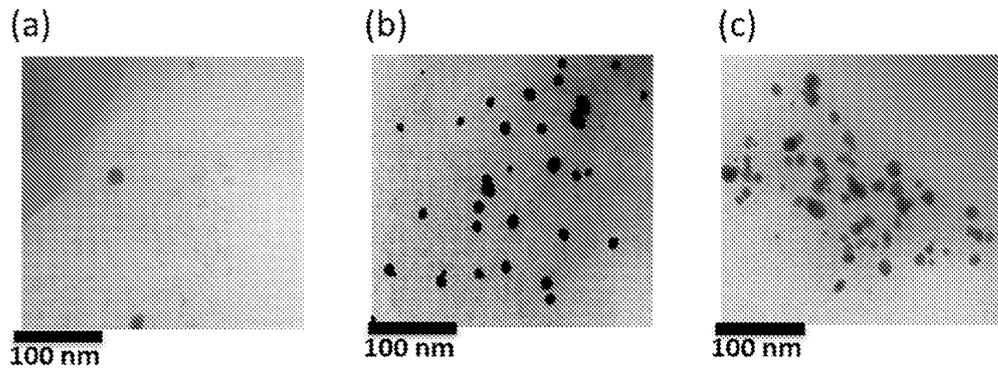


Figura 9

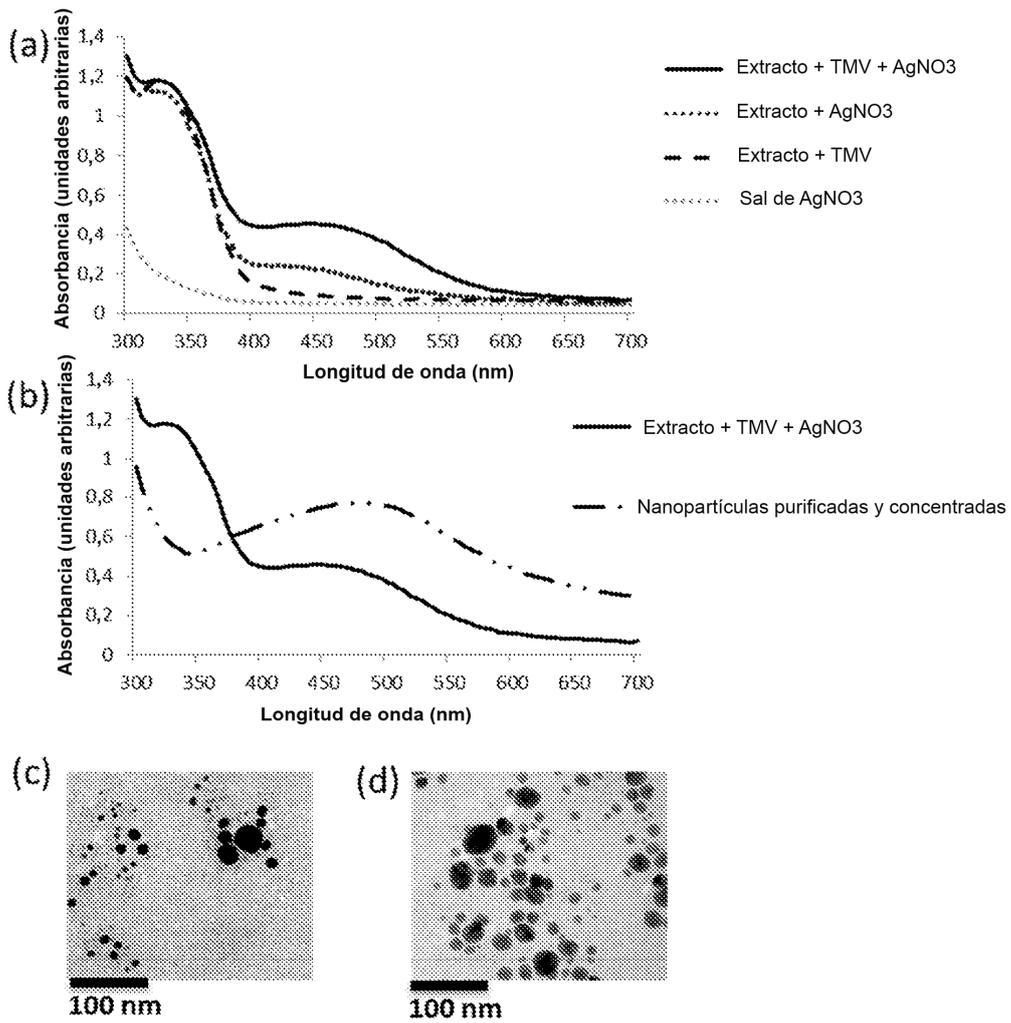


Figura 10