

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 919**

51 Int. Cl.:

B82Y 30/00 (2011.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2016 PCT/GB2016/050944**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2016 WO16156878**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2016 E 16715340 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2023 EP 3277622**

54 Título: **Material nanocompuesto**

30 Prioridad:

02.04.2015 GB 201505767

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

07.03.2024

73 Titular/es:

**CELLUCOMP LIMITED (100.0%)
Unit 3, West Dock Harbour Place Burntisland
Fife KY3 9DW, GB**

72 Inventor/es:

**TALIANSKI, MIKHAIL;
LOVE, ANDREW;
WHALE, ERIC;
HEPWORTH, DAVID;
PETUKHOVA, NATALIA y
SHAW, JANE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 960 919 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

Material nanocompuesto

Campo de invención

5 La presente invención se refiere a nanopartículas y su uso para formar material nanocompuesto, en particular material bionanocompuesto, específicamente en donde las nanopartículas se forman usando virus vegetales unidos a un almacén de celulosa, material celulósico y/o materiales derivados de celulosa.

Antecedentes de la invención

10 Las nanopartículas incluidas en nanocompuestos poliméricos han sido un área de creciente interés a medida que la industria ha buscado mejorar los materiales proporcionando propiedades adicionales a los existentes. Esto se ha discutido por ejemplo en Richard, A. Vaia y H. Daniel Wagner, *Materials Today* 2004, 7, 32-37.

15 Los virus vegetales y los componentes auto-ensamblables de los virus vegetales se han analizado como potenciales bloques de nanoconstrucción que se pueden usar como moldes para nuevos materiales y nanopartículas metálicas, como se analiza en Alaa A. A. Aljabali, J. Elaine Barclay, George P. Lomonosoff y David J. Evans. *Nanoscale*, 2010, 2, 2596-2600. Aunque anteriormente se habían proporcionado virus funcionalizados como parte de estructuras de almacén formadas por virus completos, esto ha sido limitante desde el punto de vista de las estructuras que se pueden formar.

Resumen de la invención

20 Los inventores han determinado nanomateriales y materiales nanocompuestos que contienen virus o una estructura similar a un virus (componentes estructurales de un virus, por ejemplo, sin incluir ácido nucleico de un virus o nanopartículas formadas a partir de componentes estructurales de un virus), en donde el virus o la estructura similar a un virus puede incluir secuencias peptídicas o fusionarse con dichos péptidos o proteínas completas (p. ej., enzimas) que pueden posibilitar reacciones y/o promover la unión de material al virus o a la estructura similar a un virus, o nanopartículas formadas a partir del virus o estructura similar a un virus dispuesta sobre un material o estructura de almacén de nanocelulosa. Esto permite funcionalizar ampliamente el material de almacén y permite que se formen nanoestructuras o microestructuras de material nanocompuesto más controladas. Se puede proporcionar una funcionalidad mejorada al material de almacén formando un material nanocompuesto con, por ejemplo, propiedades mecánicas de resistencia, rigidez o dureza aumentadas.

30 Los presentes inventores han determinado que las partículas de virus o partículas similares a un virus u otras nanopartículas formadas por componentes estructurales de un virus, en particular virus vegetales o bacteriófagos o partículas similares a un virus, modificadas químicamente o por medios genéticos, para presentar péptidos funcionales particulares o proteínas completas, incluidas enzimas, en sus superficies, se pueden usar en combinación con almacenes de sustrato de nanocelulosa, por ejemplo almacenes derivados de celulosa, para proporcionar un almacén con las partículas de virus sobre o dentro de él, para formar un material nanocompuesto. En particular, los inventores han determinado que se puede utilizar la nanocelulosa procedente de material vegetal como un almacén sobre o dentro del cual se pueden disponer virus funcionalizados (y nanopartículas formadas a partir de estos). Estos materiales celulósicos nanocompuestos se pueden usar para diversos fines.

35 Por consiguiente, un primer aspecto de la invención proporciona un material nanocompuesto que comprende un almacén de nanocelulosa en donde el almacén tiene unido sobre el mismo al menos una de una partícula de virus o de una partícula similar a un virus, en donde la partícula de virus o la partícula similar a un virus presenta péptidos funcionales o proteínas completas o enzimas en la superficie de la partícula.

40 En realizaciones, los péptidos funcionales pueden ser secuencias peptídicas proporcionadas en la superficie del virus que permiten que se posibilite una reacción de interés, o que permiten que el virus se una a un sustrato, ligando o molécula particular, por ejemplo anticuerpos, iones metálicos, iones de calcio o PO_4^{3-} . En realizaciones, las secuencias peptídicas pueden incluir proteínas completas, en particular enzimas.

45 De manera adecuada, una partícula de virus puede ser un virus o un componente estructural de un virus que puede formar una partícula o estructura similar a un virus o una nanopartícula formada a partir de este, por ejemplo, una partícula de virus que no es infecciosa ya que no incluye un componente de ácido nucleico, pero que puede presentar un péptido en la superficie. Por ejemplo, la proteína de la cubierta del virus del papiloma bovino (BPV) se puede auto-ensamblar en estructuras esféricas a nanoescala que se pueden usar para presentar varios grupos funcionales (Love, A.J., Chapman, S.N., Matic, S., Noris, E., Lomonosoff, G.P. y Taliensky, M.E. 2012. In planta production of a candidate vaccine against bovine papillomavirus type 1. *Planta* 236, 1305-1313). De manera similar, las proteínas de la cubierta de otros virus como el virus del mosaico del caupí y el virus del papiloma humano, por ejemplo, tienen dicha utilidad. Además, también se pueden formar algunas nanopartículas esféricas libres de ARN a partir de proteínas de la cubierta de virus en forma de varilla, por ejemplo el virus del mosaico del tabaco (TMV).

55 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona un proceso para formar un material nanocompuesto que comprende un almacén de nanocelulosa, en donde el proceso incluye la etapa de proporcionar

5 un armazón de nanocelulosa con al menos una partícula de virus o una partícula similar a un virus, que presenta péptidos funcionales o proteínas completas o enzimas en la superficie de la partícula para proporcionar una mezcla de partículas de armazón y virus. En realizaciones, el proceso de formación del material nanocompuesto del primer aspecto de la invención comprende las etapas de mezclar el armazón de nanocelulosa con la partícula de virus o la partícula similar a un virus modificada para proporcionar una mezcla de armazón-partícula de virus y secar la mezcla para formar el nanocompuesto.

En realizaciones, un material nanocompuesto es un material multi-componente en donde uno de los componentes tiene una, dos o tres dimensiones inferiores a 100 nm. Normalmente, el nanocompuesto diferirá notablemente como consecuencia de la funcionalidad de los materiales componentes.

10 Armazón

En realizaciones, un armazón puede incluir dos o más fibras o estructuras de nanocelulosa dispuestas para formar una estructura bidimensional, por ejemplo una capa similar a una película, una capa similar a una red o una matriz de fibras entrecruzadas. En realizaciones, un armazón bidimensional puede incluir fibras de nanocelulosa entrecruzadas que proporcionan una gran superficie para aplicaciones como protocolos de separación, protocolos de concentración, 15 protocolos de filtración y similares. En realizaciones, un armazón puede ser un armazón polimérico, que comprende polímeros lineales, ramificados, hiper-ramificados o combinaciones de estos.

En realizaciones, una estructura de armazón bidimensional se puede combinar con estructuras de armazón bidimensional adicionales para proporcionar una película multicapa o una estructura laminada. Por lo tanto, una fibra de nanocelulosa y/o una estructura de armazón bidimensional pueden formar los bloques de construcción de un armazón tridimensional. En realizaciones, se puede formar un armazón proporcionando una primera capa y luego formando una segunda capa sobre la primera capa. 20

En realizaciones, el armazón de nanocelulosa puede comprender un sustrato orgánico, por ejemplo, un polímero orgánico, por ejemplo, en realizaciones, el armazón de nanocelulosa puede comprender nanopartículas o nanocristales de celulosa.

25 Los expertos en la técnica entenderán que tales materiales celulósicos diferirán de la celulosa microcristalina. De manera adecuada, en realizaciones, el material celulósico discutido en la presente memoria difiere de la celulosa microcristalina en que el material celulósico comprende componentes adicionales de la pared celular vegetal del material vegetal del que se deriva el material celulósico, por ejemplo, comprende además hemicelulosa, pectina, proteína o combinaciones de estos. Esto será evidente a partir de los métodos usados para extraer el material celulósico. En realizaciones adecuadas, el material de pared celular vegetal puede comprender celulosa, hemicelulosa (como xiloglucanos, xilanos y glucomanos), pectinas y proteínas como glicoproteínas. En tales realizaciones, un material de armazón puede incluir células vegetales, paredes de células vegetales o porciones de estas, componentes poliméricos de células vegetales asociados o combinaciones de estos, por ejemplo el armazón que comprende material celulósico puede comprender celulosa, hemicelulosa, pectina y proteína. 30

35 En realizaciones, el armazón puede ser una estructura monolítica. En otras realizaciones, el armazón puede ser una estructura laminada. En realizaciones adicionales, el armazón puede ser una estructura fibrosa o filamentosa o reticular. De manera adecuada, las partículas de virus y sus nanopartículas se pueden unir al armazón de manera que proporcionen una monocapa o monocapas ordenadas a través del armazón. Alternativamente, las partículas de virus y/o nanopartículas de estos se pueden distribuir por todo o parte del armazón. La distribución de las partículas de virus en o sobre el armazón puede verse influenciada por la provisión o aplicación de las partículas de virus y nanopartículas de estos al armazón. 40

Un armazón de nanocelulosa para su uso en la invención se puede producir mediante varias rutas de procesamiento diferentes. Por ejemplo, si el armazón de nanocelulosa comprende celulosa o materiales celulósicos, entonces se puede producir a partir de plantas leñosas, p. ej., árboles o plantas herbáceas, p. ej., tubérculos. Se pueden usar una variedad de métodos de extracción para producir el armazón de celulosa dependiendo de la naturaleza del material de partida y del producto final deseado. Por ejemplo, los métodos de extracción para producir un armazón de celulosa a partir de material vegetal herbáceo normalmente diferirán de los métodos de extracción basados en materiales de partida de tubérculos. Sin embargo, los métodos de extracción generalmente pueden comprender las etapas seleccionadas de 1) Extracción ácida (p. ej., ácido sulfúrico 0,3 M entre 50 y 90 °C, 2) Extracción con álcali (p. ej., NaOH 0,1-1 M a 90 °C, 3) Extracción enzimática, 4) Extracción con peróxido de hidrógeno a 90 °C, 5) Extracción con lejía, p. ej., Hipoclorito de sodio a 60°C, 6) tratamiento térmico a 90-110°C, 7) homogeneización, (alto cizallamiento o alta presión). 45 50

Las nanofibras de celulosa también se pueden producir a partir de bacterias. Esto se conoce como celulosa bacteriana. El cultivo de bacterias puede permitir la producción de cantidades de material de celulosa con una estructura de nanofibras, documento WO2014133249 (A1). Por ejemplo, se puede cultivar una cepa microbiana adecuada en un medio para preparar un primer gel de celulosa. Este gel de celulosa se puede pulverizar para obtener celulosa micronizada. Se puede dejar que la celulosa micronizada experimente una etapa de gelificación para obtener un segundo gel de celulosa. En realizaciones, el segundo gel de celulosa puede tener una longitud de fibra más micronizada pero un contenido de humedad o densidad similar en comparación con el primer gel de celulosa. 55

Estos métodos se pueden usar individualmente o en combinación dependiendo de la pureza deseada de la celulosa y del tamaño de partícula deseado del producto de celulosa final usado para formar el armazón. En muchos casos puede ser una ventaja tener celulosa impura ya que los otros componentes de la pared celular pueden añadir funcionalidades útiles. Por ejemplo, se ha determinado que es ventajoso para formulaciones reológicas si aún están presentes hemicelulosas como xiloglucano en cantidades significativas en el material extraído. Se considera que estos polímeros adicionales pueden proporcionar mejores sitios de unión de hidrógeno que la celulosa sola.

Los materiales celulósicos que pueden actuar como estructura de armazón se pueden fabricar mediante rutas de proceso diferentes y dar como resultado materiales con diferentes purezas de celulosa y diferentes unidades estructurales. En realizaciones adecuadas, el material celulósico se proporciona de manera que incluya componentes de la pared celular vegetal en lugar de celulosa sola, por ejemplo el material celulósico puede comprender celulosa, hemicelulosa (como xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomananos), pectinas y proteínas como las glicoproteínas. En tales realizaciones, el material celulósico puede incluir células vegetales, paredes celulares vegetales o porciones de estas, componentes poliméricos de células vegetales asociados o combinaciones de estos, por ejemplo, el armazón que comprende material celulósico puede comprender celulosa, hemicelulosa, pectina y proteína. En realizaciones, el material celulósico comprende celulosa parenquimatosa, un material de celulosa particulado que contiene, por peso seco del material celulósico particulado, al menos un 70 % de celulosa, menos de un 10 % de pectina y al menos un 5 % de hemicelulosa, en donde el material particulado tiene una dimensión de partícula principal mediana ponderada en volumen en el intervalo de 25 a 75 micrómetros, preferiblemente en el intervalo de 35 a 65 micrómetros medida por difracción de luz. Preferiblemente, las partículas tienen un diámetro de menos de 120 micrómetros, más preferiblemente menos de 110 micrómetros.

Como se usa en la presente memoria, la nanocelulosa se define ampliamente para incluir una variedad de materiales celulósicos y derivados de la celulosa, que incluyen, pero no se limitan a, celulosa microfibrilada (microfibrillas de celulosa), celulosa nanofibrilada, celulosa microcristalina, celulosa nanocristalina (nanocristales de celulosa) y pulpa derivada de madera particulada o fibrilada. Normalmente, la nanocelulosa proporcionada en la presente memoria incluirá partículas que tienen al menos una dimensión de longitud (p. ej., diámetro) en la escala nanométrica. La nanocelulosa, la celulosa nanofibrilada o las nanofibrillas de celulosa como se usan en la presente memoria también abarcan fibras o partículas de celulosa que pueden tener un tamaño nanométrico o tener porciones de tamaño tanto micrométricas como nanométricas.

En realizaciones, la nanocelulosa se puede proporcionar a partir del procesamiento de la madera. En realizaciones, la nanocelulosa se puede proporcionar a partir de material vegetal de desecho. En realizaciones, el material vegetal se puede seleccionar de zanahoria, nabo, colinabo, manzana, remolacha azucarera, remolacha, patata o cebolla.

De manera adecuada, la nanocelulosa se puede proporcionar cortando mecánicamente las fibras para liberar las microfibrillas. El cizallamiento mecánico se puede alcanzar mediante homogeneización a alta presión u homogeneización con alto cizallamiento. Se pueden utilizar pretratamientos adecuados, como corte mecánico, hidrólisis ácida, tratamiento alcalino, pretratamientos enzimáticos, carboximetilación, tratamiento con lejía, tratamiento con peróxido de hidrógeno u oxidación mediada por 2, 2, 6, 6-tetrametil-piperidin-1-oxilo (TEMPO).

De manera adecuada, las nanopartículas de celulosa o los nanocristales de celulosa proporcionados a partir de esta se pueden usar para formar un armazón de la presente invención. En realizaciones, las nanopartículas de celulosa se pueden modificar químicamente en su superficie para cambiar uno o más de sus grupos hidroxilo superficiales.

En realizaciones, se puede formar un armazón de nanocelulosa a partir de plaquetas de celulosa de tamaño micrométrico, pero con una estructura a nanoescala dentro de dichas plaquetas. En realizaciones, la estructura de armazón de nanocelulosa puede comprender una pluralidad de fragmentos de celulosa, estando cada fragmento hecho de una red de microfibrillas de celulosa y, por ejemplo, los fragmentos de celulosa por estrecha asociación pueden constituir una red más grande de microfibrillas de celulosa a través del cuerpo del material. En realizaciones, el armazón de nanocelulosa puede comprender tejido de planta herbácea tratado térmicamente y homogeneizado para proporcionar un armazón de material de pared celular. En realizaciones, el armazón de nanocelulosa se puede formar a partir de material celulósico como se discute en la presente memoria (por ejemplo, comprender componentes adicionales de la pared celular vegetal a partir del material vegetal del que se deriva el material celulósico), de manera adecuada, el material de la pared celular vegetal puede comprender celulosa, hemicelulosa (como xiloglucanos, xilanos, mananos y glucomananos), pectinas y proteínas como glicoproteínas), en particular el armazón de celulosa puede comprender celulosa parenquimatosa, un material de celulosa particulado que contiene, en peso seco del material celulósico particulado, al menos un 70% de celulosa, menos de un 10 % de pectina y al menos un 5 % de hemicelulosa, en donde el material particulado tiene una dimensión de partícula principal mediana ponderada en volumen en el intervalo de 25 a 75 micrómetros, preferiblemente en el intervalo de 35 a 65 micrómetros, medida por difracción de luz. Preferiblemente, las partículas tienen un diámetro de menos de 120 micrómetros, más preferiblemente menos de 110 micrómetros.

En realizaciones, se puede formar un armazón de nanocelulosa a partir de nanofibras de celulosa individualizadas.

En realizaciones, la estructura de armazón de nanocelulosa puede comprender un material biocompuesto que comprende una pluralidad de fragmentos de celulosa formados por una red de nanofibras de celulosa, uno o más

aglutinantes hidrófilos localizados dentro de la red de nanofibras de celulosa y uno o más aglutinantes hidrófobos dispuestos para interactuar con los aglutinantes hidrófilos con el fin de encapsular la pluralidad de fragmentos de celulosa como se describe en la solicitud de patente internacional WO2006/056737. En tales realizaciones, los aglutinantes hidrófilos pueden comprender un polímero hidrófilo o sustancialmente hidrófilo. El polímero hidrófilo puede comprender una hemicelulosa, una resina acrílica o, alternativamente, un acetato de polivinilo parcialmente hidrolizado. Opcionalmente, el polímero hidrófilo puede comprender un polímero hidrófilo biológico, p. ej., gelatina y goma guar.

Opcionalmente, los aglutinantes hidrófobos pueden comprender un polímero hidrófobo. El polímero hidrófobo puede comprender un epoxi como un bisfenol-A o un epoxi de bisfenol A modificado. Alternativamente, el aglutinante hidrófobo puede comprender un aglutinante seleccionado del grupo que comprende poliuretanos, resinas fenólicas, acrílicos y siloxanos. Los expertos en la técnica conocerán otros aglutinantes hidrófilos e hidrófobos adecuados.

En realizaciones, la estructura de armazón de nanocelulosa puede comprender un material reforzado con fibras que comprende un material biocompuesto reforzado con una pluralidad de fibras en donde el material biocompuesto comprende uno o más fragmentos de celulosa constituidos por uno o más aglutinantes hidrófilos localizados dentro de la red de nanofibras de celulosa y uno o más aglutinantes hidrófobos dispuestos para interactuar con los aglutinantes hidrófilos con el fin de encapsular la pluralidad de fragmentos de celulosa como se describe en la solicitud de patente internacional WO2007/104990.

En realizaciones, la estructura de armazón de nanocelulosa puede comprender material particulado de celulosa de origen vegetal que comprende menos del 30 % en peso de glucosa extraíble; y xilosa extraíble en una cantidad de al menos el 5 % de la cantidad de xilosa extraíble en el material vegetal de partida. De manera adecuada, en tales realizaciones el material particulado de celulosa de origen vegetal comprende menos del 60% en peso de celulosa. Este material se produjo como se describe en el ejemplo de Material Reológico proporcionado en la sección de ejemplos de la presente memoria y la capacidad de extracción de los componentes se determinó usando un método de hidrólisis ácida como se establece en la presente memoria. De manera adecuada, se puede proporcionar un material usando un método como se establece en los documentos WO2014/147392 o WO2014/147393.

En realizaciones, el material particulado de celulosa derivado de origen vegetal puede comprender xilosa extraíble en una cantidad del 5 % al 10 % de la cantidad de xilosa extraíble en el material vegetal de partida, como se define mediante una técnica de extracción de hidrólisis ácida como se describe en la presente memoria.

En realizaciones del proceso, el armazón se puede proporcionar al virus o partícula similar a un virus como un sólido. En realizaciones alternativas, el armazón se puede proporcionar al virus como un líquido. En realizaciones, el armazón sólido puede ser una versión seca de una composición de armazón líquida, posiblemente con la adición de resinas/aglutinantes para que forme un compuesto. Los aglutinantes de resina pueden mejorar ventajosamente la resistencia, la rigidez, la dureza y también la resistencia al agua del armazón. Cuando la composición de armazón se proporciona como un líquido, por ejemplo una composición líquida de plaquetas de celulosa, en particular, en donde la composición se define por la capacidad de extracción de xilosa o con respecto a los modificadores de reología, dicha composición de armazón se puede añadir a sistemas a base de agua, como formulaciones de pintura, y ser fácilmente dispersable. Se considera que la incorporación de partículas metálicas en estas composiciones de armazón aumentará la funcionalidad de la composición, p. ej., catalizadores dispersables o modificadores de reología dispersables con acción biocida.

En realizaciones alternativas, los materiales nanocompuestos se pueden formar uniendo el virus a un armazón de nanocelulosa y luego secando o secando parcialmente el armazón de una manera que le permita conservar una buena porosidad. A continuación, la estructura del armazón se puede permear con agua que incluya una sal metálica, a través del armazón parcialmente seco. Se considera que esta metodología podría acelerar la concentración de partículas metálicas en el armazón.

En realizaciones, el armazón se puede modificar para proporcionar regiones de unión a partículas de virus en el mismo. Por ejemplo, el sustrato de armazón se puede funcionalizar en o sobre el sustrato para proporcionar regiones a las que se pueden unir las partículas de virus o sus nanopartículas. Alternativamente, las partículas de virus se pueden modificar para proporcionar a las partículas de virus una funcionalidad de unión al sustrato del armazón en la superficie del virus.

De manera adecuada, las partículas de virus o nanopartículas de este se pueden unir a la estructura de armazón mediante unión covalente. De manera adecuada, las partículas de virus pueden estar unidas a la estructura de armazón mediante enlaces no covalentes, por ejemplo, interacciones hidrófobas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals y similares. De manera ventajosa, en realizaciones ni las partículas de virus ni el armazón requieren ninguna modificación para permitir la unión de las partículas de virus al armazón.

En realizaciones, un armazón de nanocelulosa con partículas de virus o nanopartículas de este sobre o dentro del armazón puede proporcionar propiedades mecánicas mejoradas sobre un armazón de celulosa que no incluye virus o nanopartículas de este cuando el material se seca, por ejemplo, mayor rigidez, resistencia y dureza. De manera adecuada, las nanofibras de celulosa pueden tener una rigidez superior a 100 GPa y una resistencia superior a 2 GPa, que es del orden de los materiales de fibra de carbono. En realizaciones, un armazón de nanocelulosa puede ser poroso, siendo la distancia entre nanofibras en dicho armazón del orden de cientos de nm. De manera adecuada, en tales

realizaciones, se puede controlar el tamaño de los poros, por ejemplo, mediante métodos de secado controlado. En realizaciones, se puede usar liofilización para proporcionar poros en el armazón. En realizaciones, se puede usar secado lento al aire para proporcionar poros en el armazón, por ejemplo, secado al aire a temperatura ambiente (10 - 30 °C) durante un período de 0 a 24 horas. La liofilización normalmente proporcionará poros más grandes que el secado al aire.

5 Virus

Una partícula de virus o componentes estructurales de este, por ejemplo una partícula similar a un virus que no comprende ácido nucleico que se puede proporcionar al armazón, se puede modificar mediante cualquier medio adecuado conocido en la técnica, en particular la partícula de virus o la partícula similar a un virus se pueden modificar químicamente o por medios genéticos. De manera adecuada, en realizaciones, las partículas de virus o partículas similares a un virus se pueden modificar genéticamente para presentar en la superficie un péptido funcional, o alternativamente se puede adoptar un enfoque químico para unir covalente o no covalentemente un péptido funcional o una proteína completa (enzima) a un(os) residuo(s) particular(es) en la superficie viral (es decir, enlaces EDC/NHS de péptidos N-terminales protegidos con carboxibencilo a grupos lisina, por ejemplo). Se puede proporcionar un grupo funcional en la superficie de la partícula de virus o partícula similar a un virus, por ejemplo en donde el grupo funcional permite que la partícula de virus se una y reduzca sales metálicas o similares.

Ejemplos de partículas de virus adecuadas incluyen virus sin envoltura que tienen un revestimiento de cápside como una cápside helicoidal, una cápside filamentosa o una cápside icosaédrica. En realizaciones, la partícula de virus se puede seleccionar entre un virus helicoidal (en forma de varilla) que incluye el virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus cascabel del tabaco (TRV), el virus del mosaico estriado de la cebada (BSMV) y el virus del grupo del cacahuete (IPCV); un virus filamentoso como el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), el virus del ébola y el virus X de la patata (PVX), o un virus icosaédrico como el virus del papiloma bovino (BPV), el virus del enrollamiento de la hoja de la patata (PLRV), el virus del mosaico del caupí (CPMV), el virus de la polio, el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el virus de la lengua azul o similares u otras nanopartículas formadas por componentes estructurales de virus, por ejemplo partículas esféricas formadas por la proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco en forma de varilla.

En realizaciones particulares, la partícula de virus puede ser una partícula del virus del mosaico del tabaco (TMV). En realizaciones alternativas, la partícula de virus puede ser un bacteriófago. En realizaciones, el bacteriófago puede contener ADNbc lineal (*Rudoviridae* y *Podoviridae*), ADNbc circular (*Bicaudaviridae* y *Corticoviridae*), ADN circular monocatenario (*Microviridae*), ARNmc lineal (*Leviviridae*) o ARNbc (*Fuselloviridae*). En realizaciones, los bacteriófagos de utilidad para esta invención pueden tener morfologías isométricas (*Corticoviridae*), en forma de limón (*Fuselloviridae*), ovoide (*Guttavirus*), en forma de botella (*Ampullaviridae*), en forma de varilla (*Rudoviridae*), filamentosa (*Inoviridae*) y pleomórfica (*Plasmaviridae*). En realizaciones, el bacteriófago de utilidad puede tener (*Myoviridae*) o puede no tener colas contráctiles (*Siphoviridae*). De manera adecuada, dicho bacteriófago se puede modificar para presentar péptidos. Por ejemplo, el bacteriófago filamentoso M13 tiene una superficie externa que comprende 2.700 copias de la proteína principal de la cubierta (P8) dispuesta alrededor de un ácido nucleico que está limitado en un extremo con una disposición de proteínas P9 y P7 expuestas en la superficie, con el otro extremo limitado con proteínas P3 y P6. En tal ejemplo, se pueden modificar las proteínas de la cubierta para contener funcionalidades adicionales usando técnicas conocidas en la técnica (Sidhu SS. 2001. Engineering M13 for phage display. *Biomol Eng.* 2001 septiembre;18(2): 57-63).

En realizaciones, la partícula de virus puede tener un tamaño de entre aproximadamente 5 nm y aproximadamente 900 nm, adecuadamente de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 900 nm, adecuadamente de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 500 nm, en particular de aproximadamente 350 nm, en particular de aproximadamente 100 nm, en particular de aproximadamente 85 nm, o de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 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 70 nm o mayor que 80 nm. En realizaciones, la partícula de virus puede tener dimensiones de 18 nm a 900 nm, adecuadamente de 18 nm a 300 nm, en particular de 300 nm a 900 nm, por ejemplo.

En realizaciones, las nanopartículas formadas a partir de una partícula de virus pueden tener una forma seleccionada entre, por ejemplo, una esfera, una varilla, un prisma, un prisma hexagonal y mixto y otras formas.

La partícula de virus se puede proporcionar de manera adecuada sobre o dentro del armazón de nanocelulosa en donde el armazón actúa como una estructura molde para localizar una partícula de virus. En realizaciones, la funcionalización de la partícula de virus puede permitir que los péptidos presentados en la superficie de la partícula de virus reduzcan los iones metálicos para permitir la producción de una nanopartícula metálica. En otras realizaciones, la funcionalización de la partícula de virus puede permitir que los péptidos presentados en la superficie de la partícula de virus se unan a calcio y/o fosfato o permitir el enlace de otro elemento o sustancia a la partícula de virus, por ejemplo el enlace covalente de un anticuerpo o fragmento de este. De manera adecuada, la partícula de virus se puede modificar para proporcionar a la partícula de virus un grupo reactivo en la superficie de la partícula de virus. Se puede utilizar modificación química, funcionalización y/o modificación genética para modificar los aminoácidos de la proteína de la cubierta de la partícula de virus expuesta en la superficie exterior de la partícula. Además, o alternativamente, se puede usar modificación química, funcionalización y/o modificación genética para modificar el entorno de la cavidad interna de la partícula de virus. Se pueden proporcionar sustancias sobre la partícula de virus o sobre una partícula de virus funcionalizada antes de la incorporación de la partícula de virus dentro o sobre el armazón.

Alternativamente, la partícula de virus se puede proporcionar dentro o sobre el armazón y luego proporcionarse con la sustancia, por ejemplo, ion metálico, fosfato o ion calcio. Como se apreciará, una partícula de virus puede incluir múltiples copias de un péptido en su superficie y, por lo tanto, la partícula de virus se puede funcionalizar mediante la adición de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1.000, al menos 1.500, al menos 2.000, al menos 2.500 péptidos por partícula de virus.

En realizaciones, una partícula de virus puede ser una partícula de virus vegetal. En realizaciones, la partícula de virus vegetal se puede modificar en su superficie mediante la adición de un péptido capaz de unirse a un metal, capaz de unirse a fósforo (PO_4^{3-}), capaz de unirse al calcio (Ca^{2+}) u otros minerales óseos, capaces de proporcionar actividad reductora y/o capaces de actuar como catalizador.

En realizaciones, una partícula de virus, en particular un virus vegetales, se puede modificar para proporcionar un tripéptido funcional Pro-Pro-Glu en su superficie, en donde el tripéptido funcional puede actuar como un catalizador eficaz para reacciones de adición de conjugados entre aldehídos y nitroolefinas (Tales reacciones se discuten, por ejemplo por Wiesner M, Wennemers H. Peptide catalyzed conjugate addition reactions of aldehydes to nitroolefins. *Synthesis* 2010, 1568-1571; Wiesner M, Revell JD, Wennemers H. Tripeptides are efficient asymmetric catalysts for 1,4-addition reactions of aldehydes to nitroolefins- a rational approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, 47:1871-1874). En realizaciones alternativas, se pueden proporcionar péptidos en una partícula de virus adecuada para combinar un enolato con un aldehído o cetona para producir un compuesto de β -hidroxicarbonilo, o para proporcionar la adición de cetonas a nitroolefinas. En realizaciones alternativas, se pueden proporcionar péptidos en una partícula de virus, en donde el péptido puede actuar como organocatalizadores de carbeno N-heterocíclico competentes en la reacción intramolecular de Stetter, y también como catalizadores en reacciones de oxidación, transferencia de sulfínilo y fosforilación, Davie EAC, Mennen SM, Xu Y, Miller SJ. Asymmetric Catalysis Mediated by Synthetic Peptides. *Chem. Rev.*, 2007, 107 (12), págs. 5759-5812]. En realizaciones alternativas, la partícula de virus puede estar provista de péptidos con la capacidad de secuestrar aniones y cationes y poseer la capacidad de reducir diversos iones. Los péptidos también pueden tener actividades biológicas funcionales como capacidades antimicrobianas como se analiza, por ejemplo, en Domenyuk V, Lushkutov A, Johnston SA, Diehnelt CW. 2013. A technology for developing synbodies with antibacterial activity. *PLoS One*, 1, 8., de manera que se puedan incluir, unión ligando/receptor (anticuerpos por ejemplo), actividad del factor de adhesión celular, por ejemplo el péptido RGD que permite la unión a integrina (Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. 1996. *Annual Review Cell Developmental Biology*, 12: 697-715), y la capacidad de crecimiento/diferenciación celular (por ejemplo, el péptido llamado disruptina puede degradar el receptor del factor de crecimiento epidérmico e inhibir el crecimiento tumoral (Ahsan A, Ray D, Ramanand SG, Hegde A, Whitehead C, Rehemtulla A, Morishima Y, Pratt WB, Osawa Y, Lawrence TS, Nyati MK. 2013). Destabilization of the epidermal growth factor by a peptide that inhibits EGFR binding to heat shock protein 90 and receptor dimerization. (*The Journal of Biological Chemistry*, 288, 26879-26886.)). En una realización adicional, la partícula de virus puede comprender péptidos con la capacidad de unirse fuertemente a fenólicos, que pueden tener aplicaciones en la unión de colorantes (taninos y antocianinas) y en el secuestro de polifenólicos antioxidantes, por ejemplo, péptidos de unión a fenólicos, como se describe en el documento EP 2431048.

En realizaciones particulares, una partícula de virus se puede proporcionar con péptidos reductores y de unión a metales en la superficie de la partícula. De manera ventajosa, tales partículas de virus se podrían usar para incorporar un metal en un armazón de nanocelulosa, por ejemplo un armazón orgánico, adecuadamente un armazón de celulosa o material celulósico, en particular un armazón de nanocelulosa. En una realización, los péptidos reductores y de unión a metales de las partículas de virus, cuando se unen al armazón, se pueden mezclar directamente con sales metálicas con el fin de producir redes metalizadas. De manera adecuada, en tales realizaciones, se pueden hacer pasar sales metálicas u otros compuestos inorgánicos a través del armazón, por ejemplo una matriz de celulosa o material celulósico y virus para proporcionar la rápida acumulación de material inorgánico. En una realización alternativa, las partículas de virus con superficie que presentan péptidos de unión a metales se pueden unir al metal o al ion metálico para formar las nanopartículas metálicas (o virus metalizados) antes de la incorporación en el armazón, por ejemplo un armazón de celulosa/material celulósico, en particular, matriz de nanocelulosa.

En realizaciones, se puede usar la inclusión de péptidos reductores y de unión a metales en la superficie de una partícula de virus para proporcionar partículas de virus, por ejemplo partículas de virus modificadas con TMV, en un armazón como un armazón de nanocelulosa. El armazón (armazón de nanocelulosa), que incluye las partículas de virus, se puede entonces mezclar o proporcionar a una solución de sal metálica, por ejemplo, una solución de sal de plata, de modo que las nanopartículas metálicas, por ejemplo, nanopartículas de plata, se proporcionen en el armazón, por ejemplo, armazón de nanocelulosa.

En realizaciones, un ion metálico, que se puede reducir, o un metal se puede unir mediante un péptido proporcionado en la superficie de la partícula de virus modificada. El ion metálico o el metal se puede seleccionar del grupo que comprende metales de transición que incluyen Al, Ga, In, Ge y Sn, plata, oro, hierro, cobre, indio, platino, paladio, rodio, manganeso, zinc, molibdeno, iridio, cobalto y similares, seleccionados adecuadamente entre plata, oro, hierro, indio, platino, paladio, rodio, cobalto o iridio.

De manera adecuada, se puede proporcionar a una partícula de virus un péptido en la superficie del virus modificado de modo que pueda proporcionar un potencial de reducción en el intervalo de 1,5 V a -0,44 V.

Para un péptido determinado, se esperaría que la conversión de iones metálicos en nanopartículas metálicas favorecería a aquellos metales con potenciales de reducción positivos. La capacidad reductora de un péptido determinado se puede probar usando varios ensayos de antioxidantes (como FRAP). En realizaciones, el TMV funcionalizado con el péptido MBP (reducción y unión de metales) puede producir nanopartículas metálicas a partir de 5 iones metálicos con potenciales de reducción de 1,5 V (oro (III)) a -0,44 V (hierro (II)).

La unión de metales y la unión de iones metálicos y los péptidos reductores unidos al virus no solo permiten la formación de nanopartículas, sino que también pueden permitir que los metales se depositen preferentemente en el almacén, por ejemplo, una partícula de virus recubierta de metal que se proporcionará sobre o dentro de una matriz de nanocelulosa. Se pueden proporcionar partículas de virus recubiertas de cobalto, oro y plata unidas a un almacén, 10 por ejemplo un almacén de celulosa o material celulósico o una matriz de nanocelulosa para permitir la catálisis química; por ejemplo, la funcionalización del oro puede facilitar las reacciones de acoplamiento carbono-carbono o la oxidación del alcohol o del CO, la funcionalización de la plata puede promover la conversión del CO₂ a CO. La funcionalización/recubrimientos de platino o cobalto pueden facilitar la fotólisis del agua para la evolución de gas hidrógeno en las pilas de combustible.

En realizaciones alternativas, las partículas de virus se pueden proporcionar con péptidos de unión a PO₄³⁻ y/o Ca²⁺ en la superficie de las partículas. De manera ventajosa, tales partículas de virus se podrían usar para incorporar un fosfato y/o calcio en un almacén de nanocelulosa, por ejemplo un almacén orgánico, en particular un almacén de nanocelulosa para permitir la deposición de minerales óseos (hidroxiapatito, HA). Esto permitiría la producción de 15 armazones que se pueden parecer a redes o matrices recubiertas de minerales óseos que se pueden utilizar en reparación ósea y/o ingeniería de tejidos. Tales nanocompuestos pueden ser útiles para promover la osteogénesis, incluida la entrada de células y la unión a estructuras de almacén.

En realizaciones, la partícula de virus puede ser cualquier partícula de virus sin envoltura, sea o no infecciosa la partícula. En realizaciones, el virus puede ser un virus vegetal.

En realizaciones particulares, los grupos funcionales presentados en la superficie viral pueden tener capacidad quelante y reductora de metales, o actividades antimicrobianas o actividades secuestradoras y de unión de Ca²⁺ y fosfato. Dichas funcionalidades se podrían usar para la producción de nanopartículas metálicas/superficies recubiertas de metal (síntesis de nanopartículas y nuevos tipos de baterías), recubrimientos antimicrobianos (anti-biopelículas y superficies desinfectantes) y aplicaciones de reparación ósea, respectivamente, cuando los virus decorados se incorporan a dicha matriz de nanocelulosa.

Otros virus, como los fagos, se pueden explotar de manera similar para presentar funcionalidades en la superficie. Se ha determinado que los virus se pueden unir dentro o sobre el almacén, por ejemplo, celulosa o nanocelulosa, sin requerir alteración del virus. Se considera que la unión se produce por cualquier medio adecuado, como enlaces de hidrógeno, coordinación de metales, interacciones de Van der Waals y/o hidrofóbicas o una combinación de enlaces. En realizaciones, la incorporación del virus en la matriz se puede promover mediante el uso de formulaciones 30 particulares de nanocelulosa que son propicias a dicha formación de enlaces con el virus. En realizaciones adicionales, se puede usar la inclusión de péptidos de unión a celulosa en la estructura viral para promover la interacción del virus con los armazones de celulosa, por ejemplo armazones de nanocelulosa. En realizaciones, los enlaces covalentes entre el virus y la nanocelulosa se pueden facilitar mediante enfoques químicos como se conocería en la técnica, por ejemplo, de acuerdo con Arola y cols. 2012 (Arola S, Tammelin T, Setälä H, Tullila A, Linder MB. 2012. Immobilization-Stabilization of Proteins on Nanofibrillated Cellulose Derivatives and Their Bioactive Film Formation. Biomacromolecules 2012, 13, 594-603). En realizaciones, el virus puede tener actividad de unión a celulosa o a nanocelulosa con otras funcionalidades que se le atribuyen (producidas usando métodos genéticos y químicos de la técnica actual), que a su vez se pueden unir a estructuras celulósicas e impartir reactividades deseadas y otras propiedades físicas y químicas a la matriz. En realizaciones, se pueden usar de forma combinatoria diferentes 40 composiciones de nanocelulosa, modificación química de la nanocelulosa y diversas modificaciones químicas y genéticas de las estructuras del virus para crear nanocelulosa con las características deseadas.

Otras nanopartículas formadas por componentes estructurales de virus como las partículas esféricas formadas por la proteína de la cubierta del virus del mosaico del tabaco (documento de patente WO2012078069 A1; Trifonova E, Nikitin N, Gmyl A, Lazareva E, Karpova O, Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature. J Biomol Struct Dyn. 2014; 32(8):1193-1201) también se puede explotar de manera similar para funciones de presentación de superficie. Se ha determinado que tales nanopartículas se pueden unir de forma covalente o no covalente a diversos péptidos funcionales o proteínas completas (enzimas).

El virus funcionalizado y las estructuras similares a virus (proteínas de cubierta que se han auto-ensamblado en virus u otras nanopartículas, pero que carecen de ácido nucleico) usadas en la invención, que se pueden producir usando células de plantas, bacterias, levaduras o insectos (como se analiza en el documento WO2014/045055), pueden generar a partir de precursores químicos, nanopartículas que se pueden incorporar al sustrato del almacén; formando así armazones decorados o incrustados con nanopartículas. Además o de manera alternativa, los virus funcionalizados y las partículas similares a virus se pueden incorporar en el sustrato del almacén para conferir nuevas funciones como promover la deposición de metal en el sustrato del almacén o la formación de nanopartículas metálicas libres distales a la superficie del sustrato después de la aplicación de precursores. A diferencia de los métodos anteriores de formación de 60

nanopartículas para su uso con un almacén, este novedoso enfoque permite la formación de matrices de nanopartículas metálicas o metalizadas de una manera que no requiere la adición de productos químicos peligrosos (borohidruro de sodio, por ejemplo) o extractos de plantas frescas para la reducción de grupos químicos en formas de nanopartículas.

5 Respecto a los iones Ca y PO₄, se ha determinado que los almacenes de celulosa, por ejemplo almacenes de nanocelulosa que contienen virus funcionalizados con el péptido formador de hidroxiapatito (MIP3), dan lugar a una deposición significativa y regulada de HA en la celulosa, por ejemplo, almacén de nanocelulosa. Dichos nanocompuestos que comprenden un almacén de celulosa, en particular nanocelulosa y virus funcionalizados con péptido formador de hidroxiapatito (MIP3), se pueden usar para aplicaciones en ingeniería de tejido óseo.

10 Una partícula de virus proporcionada sobre un almacén de nanocelulosa permite la inclusión de partículas a nanoescala en o sobre el sustrato del almacén. De manera ventajosa, el uso de partículas de virus permite que dichas partículas a nanoescala tengan una distribución de tamaño definida y homogénea. Por homogéneo se entiende que la mayoría de las partículas de una muestra tienen sustancialmente el mismo tamaño. Además, las partículas a nanoescala pueden tener una forma homogénea, en donde la mayoría de las partículas tienen sustancialmente la misma forma. En realizaciones, el método de unión del virus al almacén puede permitir controlar la distancia entre las nanopartículas, lo que permite controlar la porosidad funcional del almacén.

15 En realizaciones para formar la estructura de almacén de virus funcionalizado, se puede utilizar una concentración de 100 ng a 10 mg de virus por 250 µl de sustrato de almacén, por ejemplo, un almacén de celulosa. En realizaciones, se pueden utilizar 220 µg de virus por 250 µl de nanocelulosa. Como apreciarán los expertos en la técnica, en aplicaciones particulares se puede proporcionar una baja concentración de partículas de virus al sustrato del almacén, de manera que las partículas de virus se proporcionan espaciadas en el almacén, por ejemplo, es posible que solo se requieran catalizadores metálicos. En concentraciones muy bajas, por ejemplo a 100 ng por 250 µl. De manera alternativa, es posible que solo sea necesario proporcionar biocidas en concentraciones muy bajas, por ejemplo, 100 ng por 250 µl, sobre un sustrato de almacén. En realizaciones en donde se utiliza un almacén de nanocelulosa y el almacén está formado por plaquetas de material celulósico, el virus se puede ubicar preferiblemente en el exterior de las plaquetas. También podríamos idear métodos inteligentes que les permitan ubicarse dentro o fuera de las plaquetas, según los requisitos.

En realizaciones, el virus se puede añadir directamente a la estructura de almacén, por ejemplo, nanocelulosa y luego secarse inmediatamente, por ejemplo, secarse al aire.

30 En realizaciones, el proceso puede comprender además la etapa de incubar la mezcla antes del secado. De manera adecuada, el virus y la estructura de almacén se pueden almacenar/incubar durante horas, días o semanas en el intervalo de temperatura de 0 a 25 °C para proporcionar una mezcla de partículas de virus con estructura de almacén. En algunos casos, puede ser necesario un tiempo de incubación para permitir que se produzcan asociaciones entre el virus y la estructura de almacén, por ejemplo una celulosa o un material celulósico, en particular nanocelulosa. En realizaciones, la incubación a temperaturas de aproximadamente 25 °C y superiores puede provocar contaminación bacteriana o fúngica después de un tiempo prolongado. De manera alternativa, la mezcla de virus/celulosa, en particular de nanocelulosa, se puede incubar de 25°C a 60°C, de 25°C a 70°C, de 25°C a 80°C o de 25°C a 90°C, durante duraciones variables. Por ejemplo, el virus del mosaico del tabaco sigue siendo estable después de calentarlo a 80°C y, por tanto, su funcionalidad se debe conservar a esta temperatura.

40 Para formar una mezcla de estructura de almacén y partículas de virus, se pueden usar técnicas de mezcla como agitación, remover, agitación con vórtex, inversión y sonicación de baja amplitud (esto será menos probable que rompa y altere potencialmente la estructura y las funcionalidades del virus y la celulosa, en particular la nanocelulosa). puede ser usado. En otras situaciones, es posible que no sea necesario mezclar, ya que los virus se pueden adherir a la superficie de la celulosa seca ya formada, en particular a la membrana de nanocelulosa mediante la acción de péptidos que se unen a la celulosa (si es necesario en un caso particular).

45 En realizaciones, se puede formar un almacén entrelazando o laminando el material del almacén para localizar las partículas de virus en porciones particulares del entrelazado o del laminado. En realizaciones, el almacén puede comprender fibras y las fibras, por ejemplo celulosa, en particular fibras de nanocelulosa, se pueden girar y entrelazar para formar un almacén con una estructura tridimensional. En tales realizaciones, si las partículas de virus se proporcionan sobre las fibras, entonces las fibras se pueden girar en hilos y se pueden formar estructuras y materiales de almacén mediante métodos de tejido. En realizaciones, se puede usar la impresión o la disposición para formar la estructura y las funcionalidades a nivel de escala micrométrica, lo que da lugar a la producción de materiales con características particulares.

55 De acuerdo con un tercer aspecto de la presente invención se proporciona el uso del nanocompuesto del primer aspecto de la invención o como se proporciona mediante el proceso del segundo aspecto de la invención en al menos uno de pintura, revestimientos, hormigón, fluidos de perforación, optoelectrónica, productos farmacéuticos, biomedicina, como catalizadores o soportes de catalizadores, tecnología de pilas de combustible, biorreactores, membranas de electrolitos, tecnología de sensores, en particular biochips, material de almacén 3D para reparación de tejidos, cosméticos, reparación de huesos y productos de cuidado personal.

En realizaciones, se puede usar un armazón para mostrar una variedad de diferentes partículas de virus modificados en donde los diferentes virus modificados pueden proporcionar al menos dos funcionalidades diferentes al armazón. El armazón con virus funcionalizado, o una nanopartícula de virus de este, dentro o sobre el armazón, se puede superponer encima de otro armazón para crear una matriz con diferentes regiones funcionales. Por ejemplo, en realizaciones, se puede funcionalizar una primera capa de armazón con proteínas y péptidos unidos a un virus que inhibe la formación de biopelículas en el armazón, y se puede proporcionar una segunda capa de armazón, funcionalizada con virus en donde el virus contiene péptidos antimicrobianos que pueden matar bacterias activamente, adyacente a la primera capa de andamio. En tal ejemplo, se puede formar un filtro para matar microbios en agua y otras soluciones. De manera alternativa, un armazón, por ejemplo una celulosa o un material celulósico, en particular un armazón de nanocelulosa, se puede recubrir con hidroxiapatito (HA) mediante virus unidos al armazón en donde los virus están funcionalizados de forma que secuestran iones de Ca y PO₄. Este armazón se puede funcionalizar aún más usando virus que muestren tanto actividades de unión a HA como péptidos que promuevan la adhesión celular y la osteogénesis. En tales realizaciones, el armazón forma eficazmente material óseo que promueve la integración y la curación.

En realizaciones adicionales, los virus funcionalizados pueden proporcionar metalización (o decoración con nanopartículas metálicas) al armazón, por ejemplo metalización de un armazón de nanocelulosa, por ejemplo de manera que se pueden proporcionar al armazón capas de tipos de metales (ya sea el mismo tipo de metal o al menos dos tipos de metales diferentes). Un armazón de este tipo se puede utilizar en pilas de combustible, baterías y materiales conductores y catalíticos. Los virus se podrían distribuir de manera uniforme a través de un armazón o, como se analizó anteriormente, se podrían usar capas para controlar espacialmente la distribución de virus modificados y su funcionalidad.

Como entenderán los expertos en la técnica, un armazón, por ejemplo una celulosa, en particular nanocelulosa, estructura de armazón funcionalizada con un virus cuya superficie presenta péptidos químicamente catalíticos, puede proporcionar una membrana de gran superficie para catalizar reacciones. En realizaciones, se pueden utilizar armazones, por ejemplo armazones derivados de celulosa, por ejemplo, nanocelulosa que incorpora virus o nanopartículas que contienen además factor de crecimiento celular y péptidos de adhesión celular, en aplicaciones de reparación de huesos y tejidos como apósitos o como armazones 3D.

Las características y realizaciones preferidas de cada aspecto de la invención son las mismas para cada uno de los otros aspectos cambiando lo que se deba cambiar, a menos que el contexto exija lo contrario.

La referencia al material citado o a la información contenida en el texto no se debe entender como una concesión de que el material o la información formaba parte del conocimiento general común o era conocido en cualquier país.

A lo largo de la especificación, a menos que el contexto exija lo contrario, se entenderá que los términos "comprende" o "incluye", o variaciones como "comprende" o "que comprende", "incluye" o "que incluye" implican la inclusión de un número entero dado o grupo de números enteros, pero sin exclusión de cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

A continuación se proporcionarán realizaciones de la presente invención únicamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas en las que

La Figura 1 ilustra el análisis de SEM llevado a cabo únicamente en nanocelulosa;

La Figura 2 ilustra el análisis de SEM llevado a cabo en nanocelulosa funcionalizada con virus no modificado;

La Figura 3 ilustra una sección transversal TEM de un virus no modificado marcado con inmuno-oro en nanocelulosa (localización del virus indicada por puntos oscuros);

La Figura 4 ilustra la formación de nanopartículas de plata en una muestra funcionalizada con TMV-MBP;

La Figura 5 ilustra la formación de nanopartículas de plata en una muestra de TMV no modificada;

La Figura 6 ilustra una SEM de una membrana de nanocelulosa expuesta a precursores de hidroxiapatito;

La Figura 7 ilustra el análisis de SEM realizado en nanocelulosa funcionalizada con virus no modificado después del tratamiento con precursores de hidroxiapatito;

La Figura 8 ilustra el análisis de SEM realizado en nanocelulosa funcionalizada con virus modificado con MIP3 después del tratamiento con precursores de hidroxiapatito;

La Figura 9 ilustra las velocidades de corte s-1 frente a la viscosidad (CP).

La Figura 10 ilustra las velocidades de corte s-1 frente a la viscosidad (CP).

La Figura 11 ilustra el cambio de color observado cuando se lavaron películas secas compuestas solo de celulosa (a) o de celulosa con SPs (b) o de partículas esféricas - fosfatasa alcalina intestinal de ternera (SP-CIP) (c) con el sustrato CIP (BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indonil-fosfato) junto con NBT (nitro azul de tetrazolio)). Las películas

de celulosa compuestas solo de celulosa (a) o de celulosa con SPs (b) no mostraron ninguna reactividad, como lo indica el hecho de que no hubo cambio de color de blanco a azul oscuro (Figuras 11a, 11b). Por el contrario, se detectó un fuerte cambio de color a azul oscuro en películas de nanocelulosa que contenían la enzima SP-CIP (Fig. 11c).

5 Ejemplo 1

Modificación genética del virus del mosaico del tabaco.

Se modificó genéticamente el virus del mosaico del tabaco (TMV) de modo que se insertaron péptidos pequeños como el péptido reductor y de unión a metales (MBP), (MBP; Tan, Y. N., Lee, J. Y. y Wang, D. I. C. 2010. Uncovering the design rules for peptide synthesis of metal nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 5677-5686.) SEKLWWGASL (SEC ID N.º: 1), o un péptido de deposición de hidroxiapatito (MIP3), (MIP3; Choi, Y. S., Lee J. Y., Suh, J. S., Lee, G., Chung, C. P., Park, YJ 2013. The mineralization inducing peptide derived from dentin sialophosphoprotein for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 101(2), 590-8.) SESDSSDSDSKS (SEC ID N.º: 2), en las regiones expuestas a la superficie de la proteína de la cubierta. (Turpen, T. H., Reinl, S. J., Charoenvit, Y., Hoffman, S. L., Fallarme, V., Grill, L. K. 1995. Malarial epitopes expressed on the Surface of recombinant tobacco Mosaic virus. *Nature Biotechnology* 13(1), 53-57.) y (Bendahmane, Karrer, E., Beachy, R. N. 1999. Display of epitopes on the surface of tobacco mosaic virus: impact of charge and isoelectric point of the epitope on virus-host interactions. *J Mol Biol.* 290(1), 9-20.). La inserción de péptidos no comprometió la formación de viriones. Además, estos virus se podrían obtener con un alto rendimiento usando plantas (>1 g/kg de peso de tejido fresco).

El método puede utilizar sitios de restricción que ya están presentes o diseñados en la secuencia de ácido nucleico de las regiones expuestas en la superficie de TMV, por ejemplo, un sitio de restricción PpuMI permite la inserción de secuencias en el extremo C-terminal expuesto en la superficie de la proteína de la cubierta; o, de manera alternativa, se pueden usar sitios de restricción NgoMIV/BstZ171 para introducir secuencias en un bucle expuesto en la superficie de la proteína de la cubierta que se encuentra entre 195-210 pares de bases de la proteína de la cubierta.

La digestión con enzimas de restricción adecuadas del vector TMV en la región para la presentación en superficie, antes de la inserción de secuencias de interés en esta región, se puede llevar a cabo como se muestra a continuación. Por ejemplo, se combinaron 200 ng de vector TMV con 2,5 unidades de NgoMIV y BstZ171 y una marca patentada de solución tampón inteligente de corte 1x (New England Biolabs; 240 County Road Ipswich, MA) antes de la incubación a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente, se añadieron a la reacción 20 unidades de CIP de New England Biolabs y se continuó la incubación durante otras 3 horas a 37°C con el fin de eliminar los fosfatos en el sitio de escisión. Las reacciones se sometieron a electroforesis en gel en geles de agarosa 1XTBE al 1 % que se ejecutaron a 100 V durante 4 horas. Después de que se resolvieron las bandas en el gel, se cortó el plásmido linealizado del gel y se extrajo el ADN usando un kit de extracción en gel Qiagen (QIAGEN GmbH QIAGEN Strasse 140724 Hilden; Alemania). Los plásmidos purificados, digeridos y desfosforilados se ligaron luego a cebadores de oligonucleótidos hibridados fosforilados (véanse las secuencias a continuación) usando ADN ligasa y tampón de ligasa según los protocolos de New England Biolabs. Los oligonucleótidos hibridados contienen salientes complementarios que permiten la ligación en marco de las secuencias que corresponden a los péptidos de interés. Este procedimiento genera por ejemplo una secuencia de ADN que cuando se expresa en un organismo o sistema *in vitro*, produce una proteína de cubierta de virus que presenta una secuencia peptídica funcional de interés, y el péptido aún conserva su funcionalidad y accesibilidad incluso después de auto-ensamblarse en un virus más grande o en una estructura similar a un virus.

40 Cebadores de MIP3

F: 5' **CCGGC** TCT GAA TCT GAT TCT TCT GAT TCT GAT TCT AAG TCT **GTA** (SEC ID N.º: 3)

R: 5' **TAC** AGA CTT AGA ATC AGA ATC AGA AGA ATC AGA TTC AGA **G** (SEC ID N.º: 4)

Cebadores de MBP

F: 5' **CCGGC** TCTGAAAAGCTTTGGTGGGGAGCTTCTCT**GTA** (SEC ID N.º: 5)

45 R: 5' **TAC** AAAGAGAAGCTCCCCACCAAAGCTTTTCAG**G** (SEC ID N.º: 6)

De manera adecuada, un vector TMV usado en tales manipulaciones puede contener un promotor transcripcional T7 para permitir la transcripción *in vitro*, que da lugar a la formación de transcritos de ARN infecciosos que posteriormente se pueden frotar en plantas como *Nicotiana benthamiana* para propagar el virus. El virus se puede extraer fácilmente con un alto rendimiento triturando finamente el material de la hoja infectada en presencia de tampones acuosos, que luego se somete a varias etapas de centrifugación a baja velocidad en presencia de polietilenglicol y sales, resuspendiéndose el sedimento puro resultante en un tampón de fosfato apropiado de acuerdo con Gooding y Herbert (Gooding, GV y Herbert, TT. 1967. A simple technique for purification of tobacco mosaic virus in large quantities. *Phytopathology* Volumen: 57 Número: 11 Páginas: 1285).

50

Ejemplo 2

Preparación de películas de nanocelulosa funcionalizadas usando virus.

Se usaron TMV modificados con los péptidos MBP y MIP3 para funcionalizar el armazón de nanocelulosa. Se produjeron dispersiones viscosas de nanocelulosa purificada y dispersiones de partículas de pared celular que contenían fibras de nanocelulosa a partir de material vegetal de desecho, mediante diferentes técnicas de extracción, en donde se trató el material vegetal con tratamiento con NaOH (como se especifica en el documento WO2013/128196 por ejemplo, en donde, por ejemplo, residuos de tubérculos, como zanahoria o remolacha azucarera de procesos industriales existentes, se pueden procesar para formar una mezcla que tiene una concentración de entre el 0,1% y el 10% de contenido de sólidos en peso en agua. Se puede añadir hidróxido de sodio (NaOH) 0,5 M a la solución, elevando y manteniendo el pH de la solución a pH 14 de modo que la adición de NaOH extraiga una proporción significativa de hemicelulosa y la mayoría de la pectina de la celulosa de las células dentro de la mezcla. Luego, la mezcla se puede calentar a 90°C durante cinco horas y homogeneizar periódicamente durante el período de calentamiento durante un total de una hora con una paleta mezcladora que gira a una velocidad de 11 m/s (6), seguido de la homogeneización durante un período de cinco minutos, al final del período de calentamiento, con una pala mezcladora girando a una velocidad de 30 m/s (8). La homogeneización separa las células a lo largo de la línea de la laminilla media y luego las rompe en plaquetas. Las plaquetas de celulosa resultantes son aproximadamente 10 veces más pequeñas que las células separadas originales y la mezcla resultante se puede filtrar después para eliminar los materiales disueltos hasta un contenido de sólidos de menos del 8% en peso, tratamiento con peróxido (como se especifica en los documentos WO2014/147392 o WO2014/147393), por ejemplo, en donde se puede añadir una solución acuosa de peróxido al 35 % en una cantidad del 0,5 % en peso o menos del peso de material vegetal herbáceo (contenido seco) y se puede llevar a cabo una etapa de tratamiento con peróxido hasta que se haya consumido sustancialmente todo el peróxido y luego se termina de manera que se obtenga un material de celulosa particulado con una viscosidad de al menos 2.500 cps (a una concentración de sólidos del 1% en peso) o de tratamiento enzimático.

Se prepararon soluciones madre de virus TMV (natural y modificado) en tampón de fosfato sódico 10 mM a pH 7.

1. Se mezclaron 250 µl de dispersión de celulosa con 10 µl de TMV de tipo salvaje o modificado (22 mg/ml; el virus total por reacción es de 220 µg) para proporcionar una mezcla de celulosa.

2. Después de la incubación a temperatura ambiente (entre 20°-25°C) durante 2 horas, se pipeteó la dispersión de celulosa y se extendió sobre un área de 1 cm² sobre una lámina de plástico flexible.

3. La dispersión de celulosa se dejó secar durante toda la noche a temperatura ambiente en un lugar libre de polvo para formar una muestra seca.

4. La muestra seca se despegó de la lámina de plástico y se lavó varias veces en agua destilada, antes de volver a secarla para su análisis mediante microscopía electrónica o para su inclusión en experimentos catalíticos de metal o hidroxipatito.

Usando microscopía electrónica de barrido (SEM), se encontró que la nanocelulosa y las partículas que contenían nanocelulosa formaban una red de fibras de nanocelulosa o una película o membrana de nanocelulosa (Figura 1), mientras que las muestras que contenían TMV tenían cantidades significativas de virus en la superficie de la película o de la membrana (Figura 2).

Ejemplo 3

Prueba de la inmunorreactividad conservada de TMV en la película de nanocelulosa

El virus del mosaico del tabaco integrado en la estructura de nanocelulosa tenía reacción cruzada con anticuerpos específicos para el virus, como lo indica la localización de conjugados de partículas de oro-anticuerpo en el virus (Figura 3). Esto demuestra que la incorporación de estructuras virales al sustrato de nanocelulosa no compromete su capacidad inmunogénica. Dado que los virus y las partículas similares a virus se pueden modificar en su superficie para presentar regiones inmunogénicas de diversos patógenos (Thuenemann, E.C., Lenzi, P., Love, A.J., Taliansky, M.E., Bécares, M., Zuñiga, S., Enjuanes, L., Zahmanova, G.G., Minkov, I.N., Matic, S., Noris, E., Meyers, A., Hattigh, A., Rybicki, E.P., Kiselev, O.I., Ravin, N.V., Eldarov, M.A., Skryabin, K.G. y Lomonosoff, G.P. 2013. The use of transient expression systems for the rapid production of virus-like particles in plants. *Current Pharmaceutical Design* 19, 5564-5573.), también es probable que estos sean reconocibles por los anticuerpos apropiados después de su incorporación en la red de nanocelulosa. La combinación de la flexibilidad de los sustratos y la facilidad con la que se pueden modificar el virus y las partículas similares a virus para presentar regiones inmunogénicas de diversos patógenos proporciona utilidad en la producción de nuevos dispositivos de diagnóstico.

Después de la confirmación de la incorporación del virus, se probó la utilidad de las membranas funcionalizadas con virus en varias reacciones catalíticas diferentes dependiendo de las funcionalidades del virus.

Ejemplo 4

Prueba de formación de nanopartículas metálicas.

5 Se colocó una película de nanocelulosa lavada y funcionalizada con TMV-MBP en un tubo eppendorf y se añadieron 500 μ l de sales metálicas de AgNO_3 ($2,9 \times 10^{-3}$ M). El análisis TEM encontró que se formaron cantidades significativas de nanopartículas de plata en el sobrenadante en una hora en la muestra funcionalizada con TMV-MBP (Figura 4), con poca o ninguna formación en la muestra de TMV no modificada (Figura 5).

Ejemplo 5

Prueba de deposición de hidroxipatito

10 Se produjeron películas de nanocelulosa con TMV-MIP3 o con TMV como anteriormente excepto que se usó el doble de cantidad de virus (440 μ g por 250 μ l de nanocelulosa).

15 Las membranas lavadas se incubaron durante 17 horas en CaCl_2 100 mM (pH 4,83). Posteriormente las membranas se lavaron en agua destilada y se incubaron en Na_2HPO_4 60 mM (pH 8,36) con ligera agitación. El proceso de lavado e incubación secuencial con los precursores de HA (CaCl_2 y Na_2HPO_4) se repitió una vez más, con una etapa de lavado final antes de un secado final. Se llevó a cabo un análisis SEM y se encontró que solo la nanocelulosa (Figura 6) y la nanocelulosa funcionalizada con virus no modificado (Figura 7) que habían estado expuestas a precursores de HA tenían muy poca deposición de HA. Por el contrario, se observó una deposición significativa de HA con la nanocelulosa que había sido funcionalizada con TMV-MIP3 (Figura 8).

Producción de estructuras formadas a partir de componentes proteicos virales para la visualización de proteínas/enzimas completas

20 Se determinó que se generaba una nueva plataforma para la presentación superficial de péptidos o proteínas/enzimas completas mediante remodelación térmica de virus vegetales, como el TMV. El calentamiento de los virus con forma de varilla TMV a 94 °C durante 5 minutos da lugar a la formación de partículas esféricas (SPs) a nanoescala (documento de patente WO 2012078069 A1), que no contienen ARN y se pueden unir a cualquier péptido o proteína/enzima completa para la formación de complejos funcionales. Se usó TMV (concentración de 1 mg/ml) para preparar SPs de aproximadamente 200 a 500 nm de diámetro. Las SPs en solución (0,1 mg en 100 μ l) se mezclaron con fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIP) (0,02 mg en 6 μ l); la mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se centrifugó (2.300 g, 5 min) para separar la proteína no unida. El sedimento obtenido se resuspendió en 100 μ l de agua milli-Q. Las SPs decoradas con CIP (SP-CIP) se mezclaron con 100 μ l de suspensión de nanocelulosa y se dejaron secar a temperatura ambiente en películas delgadas. Como controles negativos se usaron películas finas que comprendían celulosa sola o celulosa que contenía la misma cantidad de SPs.

35 Las películas de celulosa secas se lavaron varias veces con agua. Se añadió el sustrato CIP (BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indonil-fosfato) junto con NBT (nitro azul de tetrazolio)) a las membranas de celulosa lavadas y se observaron cambios de color. Las películas compuestas solo de celulosa o celulosa con SPs no mostraron ninguna reactividad, como lo indica el hecho de que no hubo cambio de color del blanco al azul oscuro (Fig. a, b). Por el contrario, se detectó un fuerte cambio de color a azul oscuro en películas de nanocelulosa que contenían la enzima SP-CIP (Fig. c), lo que demuestra que la actividad enzimática en las películas de nanocelulosa se conservó incluso después del secado y lavado. Así, la incorporación de plataformas decoradas con enzimas confiere funcionalidad a la matriz de nanocelulosa que es estable.

Ejemplo 6

40 Estudio de pintura: Uso de partículas que contienen nanocelulosa para elaborar formulaciones de pintura

Se prepararon dos conjuntos de formulaciones de pintura (véanse las Tablas 1 y 2 a continuación). Uno se realizó mediante un sistema de resina epoxi y el otro mediante un sistema de resina acrílica. Para cada conjunto, se prepararon varios lotes que contenían diferentes cantidades de Curran (partículas que contienen nanocelulosa) producido mediante el método descrito en los párrafos de formulación reológica siguientes. El peso de todos los aditivos tanto en las formulaciones epoxi como en la acrílica se mantuvo constante de un lote al siguiente, excepto el agua y el modificador de viscosidad. El peso del modificador de viscosidad se varió de un lote a otro, para probar los efectos de diferentes niveles de adición sobre la viscosidad de la formulación. Con el fin de mantener constante el peso total de la formulación, se ajustó también el peso del agua añadida a un lote dependiendo del nivel de adición del modificador de la viscosidad, de modo que el peso del agua más el modificador de la viscosidad fuera constante de un lote a otro.

55 Las partículas que contenían celulosa se habían prensado para reducir el contenido de agua al 25% de sólidos y luego se rallaron usando un rallador de queso parmesano hasta obtener un polvo grueso. Los ingredientes de cada formulación se mezclaron a temperatura ambiente usando un mezclador de pintura Dispermat, con una hoja de dientes de sierra de 4 cm de diámetro que giraba a 3.000 rpm. La mezcla se llevó a cabo durante 1 hora para asegurar que todos los ingredientes estuvieran completamente dispersados. Las formulaciones mezcladas se dejaron reposar

durante 1 día. Luego se escaneó la viscosidad de cada muestra en un intervalo de velocidades de corte usando un reómetro.

5 Para la formulación de epoxi se usó un punto de referencia, que era un modificador reológico de arcilla bentonita bien conocido, para permitir la comparación con el material de la pared celular. Este se mezcló con la formulación a una concentración de $0,2 \pm 5\%$ en peso total de la formulación.

De manera similar, para la formulación acrílica se usó un punto de referencia adecuado para la comparación, que era un espesante asociativo Acrysol. Este se mezcló con la formulación al 0,6% del peso total de la formulación.

Tabla 1

Material	%	g
Componente de resina epoxi		
Beckopox EP 2384w/57WA	20,30	101,50
Agua	8,71	43,53
Material de la pared celular: polvo	0,09	0,47
Antiespumante Additol VXW-6393	0,40	2,00
Additol VXW-6208/60	1,00	5,00
Óxido de hierro rojo RO-4097	7,00	35,00
Pigmento anticorrosivo Halox SZP-391	4,60	23,00
Sulfato de bario	9,20	46,00
Polvo de wollastonita Minelco MW50	13,90	69,50
Microesferas Cerámicas Zeosphere 400	9,30	46,50
Mica Molida de Agua de 325 de malla	0,70	3,50
Beckopox EP 2384w/57WA	20,30	101,50
Antiespumante Additol VXW-6393	0,40	2,00
BYK 348	0,40	2,00
Benzoato de Amonio Cotrol AMB (10% en Agua)	3,70	18,50
	100,00	500,00

10 En la Figura 9 se muestra un gráfico que muestra la viscosidad en función de la velocidad de corte para una formulación de pintura epoxi con cantidades variables de partículas que contienen celulosa añadidas como modificador de viscosidad (aquí denominado como A) y en comparación con un modificador de viscosidad de arcilla bentonita (denominado Bentone EW). Se puede observar que el uso de partículas que contienen un 0,15% de celulosa genera viscosidades más altas en la formulación epoxi que la arcilla bentonita, particularmente a velocidades de corte bajas.

15 **Tabla 2**

Formulación acrílica/baja en PVC		
Material	%	g
Agua	15,57	93,42
Material de la pared celular: Polvo al 2,3%	2,33	13,98
Propilenglicol	2,00	12,00
Pat-Add AF16	0,20	1,20
Pat-Add DA 420	0,60	3,60
Pat-Add DA 202	0,40	2,40
Kemira RDI-S	22,20	133,20
Neocryl XK 98	55,30	331,80
Pat Add AF 16	0,10	0,60

Formulación acrílica/baja en PVC		
Material	%	g
Parrmetol A 23	0,30	1,80
Pat-Add COAL 77	1,00	6,00
Total	100,00	600,00

5 En la Figura 10 se muestra un gráfico que muestra la viscosidad en función de la velocidad de corte para una formulación de pintura acrílica con cantidades variables de partículas que contienen celulosa añadidas como modificador de la viscosidad (aquí denominada A) y en comparación con un espesante asociativo que actúa como modificador de la viscosidad (Acrysol). Estos datos muestran que las partículas que contienen celulosa se diluyen más por cizallamiento que el Acrysol y son particularmente eficaces para proporcionar alta viscosidad a velocidades de corte bajas.

Ejemplo 7

Materiales Cementosos/Hormigón: Uso de partículas que contienen nanocelulosa como aditivo en el hormigón

10 Se probó el material particulado de celulosa producido mediante el proceso descrito en la sección Formulación reológica de la presente memoria para determinar su idoneidad en materiales compuestos, particularmente materiales cementosos como hormigón y mortero.

15 El material particulado de celulosa se incorporó a una mezcla de mortero en cantidades del 1% en peso, 5% en peso y 10% en peso como se establece a continuación. El mortero usado fue un mortero decorativo llamado Enduit Béton Coloré disponible en Mercardier.

Composición:

4,3 kg de cemento en polvo

1 kg de aglutinante de resina acrílica .

Material particulado de celulosa (CPM) al 1 % en peso o al 5 % en peso

20 Se probó la resistencia a la indentación del material compuesto usando una muestra de material de 2 mm de espesor. La prueba usó un punzón de 62,5 MPa con una matriz de punzón de 1 cm de diámetro. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación:

Tabla 3

Composición	Resultados en MPa			Promedio
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	
EBC	29,5	26,5	29,5	28,5
EBC + CPM al 1%	36,5	37,5	34,5	36,17
EBC + CPM al 5%	30,5	35	31,5	32,33
EBC + CPM al 10%	29	30	26,5	28,5

25 Estos datos muestran que la inclusión de hasta un 5% en peso del material particulado de celulosa descrito en la presente memoria dio lugar a una mejora en la resistencia del material, lo que demuestra que el material particulado de celulosa es capaz de fortalecer o reforzar materiales compuestos inorgánicos tales como el hormigón.

Ejemplo 8

Composiciones de papel: Uso de partículas que contienen nanocelulosa como aditivos para el papel

30 Se probó la opacidad y la porosidad de una composición de papel que comprende diferentes cantidades del material particulado de celulosa (CPM) producido mediante el proceso descrito en la sección de formulación de material reológico a continuación.

35 La inclusión de material particulado de celulosa descrito en la presente memoria disminuyó la porosidad con respecto a un papel base formado a partir de una celulosa estándar. La disminución de la porosidad de una composición de papel proporciona ventajas para envases de tipo alimentario, cosmético y de fragancias donde no es deseable la

permeación de gases, microbios y otras sustancias.

A partir de los ejemplos anteriores, se puede observar que los materiales particulados de celulosa descritos en la presente memoria y los procesos para producir tales materiales particulados de celulosa encuentran utilidad en muchas aplicaciones diferentes.

- 5 Se describen ahora ejemplos de formación y análisis de composiciones de armazones celulósicos de la invención.

Ejemplo 9

Formulación de compuesto: Uso de partículas que contienen nanocelulosa para fabricar compuestos

Se pelaron 30 kg de zanahorias, se cortaron en trozos y luego se añadieron a una olla con un peso igual de agua del grifo y se cocinaron durante 3 horas a 95 °C hasta que estuvieran blandas. Luego se homogeneizó el material usando un homogeneizador en tanque Silverson FX. Se usaron cabezales gruesos, medianos y finos en el homogeneizador para reducir gradualmente el tamaño de las partículas hasta alcanzar un tamaño medio de partículas de aproximadamente 100 micrómetros. Luego se añadió hidróxido de sodio en una proporción de 2 partes de NaOH por 1 parte de sólidos de material vegetal. Luego se recalentó el material a 90°C mientras se agitaba continuamente. El material agitado se mantuvo a 90°C durante 8 horas. Luego el material se enfrió y se filtró usando un filtro de gravedad. Se realizaron varios lavados con agua limpia al material hasta que el pH alcanzó 7. Luego, el material se mezcló con alcohol polivinílico /acetato y resina epoxi a base de agua + endurecedor en una proporción de un 85 % de material vegetal, un 10 % de epoxi + endurecedor y un 5 % de PVA (en base sólida). El PVA se mezcló primero añadiendo el PVA líquido (que contenía aproximadamente un 70 % de agua) al material vegetal, mezclándolo bien durante 30 minutos y luego presionando el material hasta obtener un 7,7 % de sólidos (la mayor parte del PVA permanece atrapado en la mezcla vegetal durante este prensado). El prensado se llevó a cabo colocando el material en una bolsa porosa de material filtrante y presionándolo en un filtro de prensa hidráulica entre 2 placas metálicas hasta que los sólidos en la bolsa alcanzaron el 7,7%. Luego se mezcló resina epoxi a base de agua (ya sea una dispersión o una emulsión) con el material vegetal + PVA usando una mezcladora de masa. Se puede añadir agua adicional dependiendo de la aplicación. El material resultante, cuando se seca, se encoge y forma un material biocompuesto duro. Se pueden formar láminas si el material vegetal + PVA + Epoxy y el endurecedor + agua es líquido y se vierte este líquido en bandejas de plástico y se seca el material.

Como entenderán los expertos en la técnica, el material vegetal que se va a mezclar con el epoxi PVA y el endurecedor se puede producir por tratamientos alternativos. Otros ejemplos incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento del material vegetal con peróxido de hidrógeno a 90°C o mediante tratamiento del material vegetal con enzimas.

30 **Ejemplo 10**

Formulación de material reológico: Uso de partículas que contienen nanocelulosa para hacer un modificador reológico

Se lavaron e hidrataron 900 g de pélets de remolacha azucarera añadiéndolos a agua tibia, escurriendo el agua sucia a través de un colador. Este hidrato de remolacha azucarera se colocó en un balde grande con exceso de agua y se agitó antes de sacarlo con un colador y lavarlo con agua, para garantizar que no entren piedras o arena en la siguiente etapa de procesamiento.

La remolacha azucarera lavada se cocinó durante 3 horas a 100 °C, antes de homogeneizarse usando un homogeneizador Silverson FX equipado con rejillas de estator inicialmente gruesas y pasar a la rejilla emulsionante con orificios pequeños (tiempo de procesamiento de 15 minutos para cada rejilla). Los sólidos se midieron usando un medidor de sólidos Oxford y la mezcla se ajustó a un 2% de sólidos mediante la adición de agua limpia.

40 Después se colocó la mezcla en un recipiente de reacción de vidrio de 25 litros y se calculó el contenido de sólidos secos en el recipiente. Cuando se calentaba la mezcla, se añadió peróxido en función de una proporción de solución acuosa de peróxido (al 35%) a sólidos secos de 0,25:1. La temperatura se mantuvo durante 2 horas a 90°C (una vez que alcanzó los 90°C), momento en el cual el pH bajó de aproximadamente 5 a 3,5.

Luego se retiró el líquido de reacción del recipiente y se lavó antes del blanqueo.

45 Luego se llevó a cabo el blanqueo resuspendiendo el material lavado en agua limpia y colocándolo nuevamente en el recipiente. El blanqueo se realizó a 60°C, con un blanqueo 2:1 (2 partes de solución blanqueadora con un 10% de cloro activo por 1 parte de sólidos, durante 30 minutos).

Luego, se lavó y se homogeneizó el material durante 30 minutos en el tamiz del estátor con ranuras finas del homogeneizador Silverson FX.

50 El material se drena luego a través de un filtro y se prensa entre paños absorbentes hasta alcanzar el contenido de sólidos final deseado. La resuspensión de los sólidos en agua al 1% en peso de sólidos dio como resultado una viscosidad (medida como se describió anteriormente) de 4.600 cps.

Ejemplo 11

Análisis de las partículas que contienen celulosa (producidas mediante extracción con peróxido como se describe en el ejemplo 10 y en los documentos WO2014/147392 o WO2014/147393) usando extracción por hidrólisis ácida

5 Se analizó el contenido de monosacáridos/polisacáridos extraíbles del material seco de tres etapas del proceso (inicio; después del tratamiento con peróxido; después del tratamiento con hipoclorito de sodio). Los materiales vegetales de partida analizados fueron remolacha azucarera y zanahoria.

10 El procedimiento de prueba se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo estándar de dos etapas a continuación, que se basa en la separación de monosacáridos y oligosacáridos de polisacáridos hirviendo la muestra en una solución de alcohol al 80%. Los monosacáridos y oligosacáridos son solubles en soluciones alcohólicas, mientras que los polisacáridos y la fibra son insolubles. Los componentes solubles se pueden separar de los componentes insolubles mediante filtración o centrifugación. Luego, las dos fracciones (soluble e insoluble) se pueden secar y pesar para determinar sus concentraciones.

Los materiales secos se pueden usar después para el análisis mediante HPLC, después de la hidrólisis ácida.

(i) Separación de componentes solubles e insolubles en alcohol.

15 **Materiales**

- Muestras secas
- Etanol al 80%
- Nitrógeno comprimido

Método

20 Para cada muestra de material, se extrajeron 50 mg tres veces con 5 ml de etanol al 80%, hirviendo las muestras en tubos de vidrio con tapa en un baño de agua a 95 °C durante 10 minutos cada uno. Después de cada extracción, los tubos se centrifugaron a 5.000 × g durante 5 minutos y los sobrenadantes de las tres extracciones se combinaron para el análisis de azúcares.

25 El residuo y el sobrenadante se secan en estufa antes de la hidrólisis ácida. La hidrólisis ácida que usa ácido trifluoroacético degrada pectinas, hemicelulosas y regiones altamente amorfas de celulosa, mientras que la hidrólisis ácida que usa ácido sulfúrico al 72% (p/v) degrada todos los polisacáridos con la excepción de las regiones altamente cristalinas de la celulosa.

(ii)(a) Análisis de polisacáridos de matriz. Hidrólisis con ácido trifluoroacético

Materiales

- 30
- Muestras secas
 - Tubos con tapón de rosca
 - Ácido trifluoroacético 2 M = 11,4 g en 50 ml (o 3 ml de TFA al 99,5 % y 17 ml de dH₂O)
 - Nitrógeno comprimido
 - Estándares de monosacáridos
- 35
- Mezcla de azúcar estándar de tres monosacáridos (glucosa, fructosa, xilosa). Cada azúcar está en una solución madre de 10 mM (100X). La preparación de los estándares se realiza pipeteando 250, 500 y 750 µl en viales con tapa de rosca y evaporando hasta sequedad. Proceder a la hidrólisis del mismo modo que con las muestras.

Método

40 **Día 1**

- Pesar 5 mg de la fracción insoluble en alcohol de la etapa (i) en tubos con tapa de rosca.
- Secar todas las muestras y estándares de monosacáridos (250 µl, 500 µl, 750 µl)

ES 2 960 919 T3

Día 2

- En la campana extractora, hidrolizar añadiendo 0,5 ml de TFA 2 M. Lavar los viales con nitrógeno seco, colocar la tapa y mezclar bien. Limpiar la boquilla de nitrógeno con un pañuelo de etanol entre muestras para evitar la contaminación.

- 5
- Calentar los viales a 100 °C durante 4 h y mezclar varias veces durante la hidrólisis.
 - Evaporar completamente en un evaporador centrífugo o bajo un chorro de nitrógeno con extracción de vapores durante la noche.

Día 3

- Añadir 500 µl de propan-2-ol, mezclar y evaporar.
- 10
- Repetir
 - Resuspender las muestras y los estándares en 200 µl de dH₂O. Mezclar bien.
 - Centrifugar y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
 - Filtrar el sobrenadante a través de filtros de PTFE de 0,45 µm antes del análisis por HPLC.

(ii)(b) Análisis de polisacáridos de matriz. Hidrólisis con ácido sulfúrico

15 Materiales

Ácido sulfúrico al 72 % (p/v) (AR)

Hidróxido de bario (150 mM)

Azul de bromofenol (solución al 1% en agua)

Filtros de 0,45 µm

- 20
- SPE en fase reversa (estireno-divinilbenceno); p. ej. 30 mg de Strata-X, 1ml de volumen.

Método

- Pesar con precisión 4 mg de la fracción insoluble en alcohol de la etapa (i) en un tubo de microcentrífuga con tapa de rosca de 2,0 ml. Alternativamente, usar el residuo seco de la digestión del azúcar de matriz.
- 25
- Añadir 70 µl de ácido sulfúrico al 72 % (p/v) al vial con tapa de rosca. Mezclar hasta que los sólidos se dispersen/disuelvan.
 - Incubar en baño maría a 30°C durante 2 horas. Mezclar las muestras cada 15 minutos.
 - Añadir agua para reducir la concentración de ácido sulfúrico hasta el 4,6 % (p/p); añadir 1.530 µl de agua.
 - Mezclar bien y calentar en un bloque calentador a 121 °C durante 4 horas. Agitar en vórtex cada 30 minutos.
- 30
- Dejar enfriar a temperatura ambiente. (En este momento, las muestras se pueden almacenar en el refrigerador hasta durante 2 semanas).
 - Tomar 300 µl en un tubo nuevo y añadir 1 µl de azul de bromofenol al 1%. Neutralizar parcialmente añadiendo 0,8 ml de hidróxido de bario 150 mM. Finalizar añadiendo carbonato de bario en polvo. El indicador se vuelve azul.
- 35
- Centrifugar para eliminar el sulfato de bario precipitado (10 min a 10.000 × g). Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Congelar y descongelar para finalizar la precipitación y repetir la centrifugación (volumen total 1.050 µl).
 - Antes de la HPLC, las muestras (alícuota de 700 µl) se pasan por una columna de fase reversa (p. ej., Strata X 30 mg) y se filtran a través de un filtro de 0,45 µm.

- 40
- Los resultados de estos análisis, con respecto al contenido de xilosa y al contenido de glucosa, se muestran en la Tabla 4. Se pueden obtener datos cuantitativos mediante inyección de una cantidad conocida de un monosacárido de referencia, por ejemplo glucosa o xilosa, como es habitual en la técnica, así como materiales comparativos como los

descritos en el documento WO2014017911 (Ejemplos CeluComp 8 a 10).

Aunque la invención se ha presentado y descrito particularmente con referencia a ejemplos particulares, los expertos en la técnica entenderán que se pueden realizar varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la presente invención.

Muestra	Materia	Proceso	Número tomado de muestras con TPA (mg)	Área de pico	plancha (mg)	Resistencia de planta %
Calcularse 1	Resistencia acetona	Materia de prueba	4,8	38.274	0,385	19,85
Calcularse 2	Resistencia acetona	Proceso pretratado	6,7	2.960	0,968	1,56
Calcularse 3	Resistencia acetona	Proceso completo	8,1	3.281	0,122	3,83
Calcularse 4	Resistencia acetona	Proceso completo con lavado extra	8,4	3.161	0,978	1,82
Calcularse 5	Zanahoria	Materia de prueba	5,4	3.255	0,128	1,56
Calcularse 6	Zanahoria	Proceso pretratado	4,9	1.334	0,265	0,85
Calcularse 7	Zanahoria	Proceso completo	4,7	1.695	0,348	0,98
Calcularse 8	Espejo Compostado (Zanahoria)	Material + compostado	6,6	1.021	0,830	0,34
Calcularse 9	Espejo Compostado (Zanahoria)	Calcularse 8 seguido de lavado	4,6	1.368	0,888	0,89
Calcularse 10	Resistencia acetona (ajo resuspendido)	Proceso completo	4,2	1.191,5	0,428	0,48

Muestra	Materia	Proceso	Número tomado de muestras con TPA (mg)	Área de pico	plancha (mg)	Resistencia de planta %
Calcularse 1	Resistencia acetona	Materia de prueba	4,8	361	0,383	1,83
Calcularse 2	Resistencia acetona	Proceso pretratado	6,7	1.121	0,726	11,88
Calcularse 3	Resistencia acetona	Proceso completo	8,1	1.836	1,698	17,57
Calcularse 4	Resistencia acetona	Proceso completo con lavado extra	8,4	1.654	1,873	18,71
Calcularse 5	Zanahoria	Materia de prueba	5,4	869	0,965	11,36
Calcularse 6	Zanahoria	Proceso pretratado	4,9	1.335	0,948	18,89
Calcularse 7	Zanahoria	Proceso completo	4,7	1.734	1,664	22,88
Calcularse 8	Espejo Compostado (Zanahoria)	Material + compostado	6,6	3,978	1,987	81,46
Calcularse 9	Espejo Compostado (Zanahoria)	Calcularse 8 seguido de lavado	4,4	2.585	1,468	38,35
Calcularse 10	Resistencia acetona (ajo resuspendido)	Proceso completo	4,3	2,247	1,311	35,76

Tabla 4

REIVINDICACIONES

1. Un material nanocompuesto que comprende un almacén de nanocelulosa en donde el almacén tiene unido sobre este al menos una de una partícula de virus, o partícula similar a un virus, en donde la partícula de virus, o partícula similar a un virus presenta péptidos funcionales o proteínas completas o enzimas en la superficie de la partícula.
- 5 2. Un proceso de formación de un material nanocompuesto de la reivindicación 1, que comprende
- mezclar un almacén de nanocelulosa con al menos una partícula de virus o una partícula similar a un virus que presenta péptidos funcionales o proteínas completas o enzimas en la superficie de la partícula para proporcionar una mezcla de almacén-partícula de virus
- y
- 10 - secar la mezcla para formar el nanocompuesto.
3. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde el almacén de nanocelulosa se selecciona entre celulosa nanofibrilada, nanopartículas de celulosa y nanocristales de celulosa.
4. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde el almacén de nanocelulosa comprende componentes de células vegetales, seleccionados entre hemicelulosa, pectina, proteína o combinaciones de estos.
- 15 5. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde el almacén de nanocelulosa es una estructura bidimensional seleccionada entre una capa similar a una película, una capa similar a una red o una matriz de fibras entrecruzadas, opcionalmente en donde el almacén está formado por una primera capa de un almacén bidimensional y una segunda capa de un almacén bidimensional formada sobre la primera capa para formar una estructura laminada o multicapa.
- 20 6. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde el almacén de nanocelulosa comprende una pluralidad de fragmentos de celulosa formados por una red de nanofibras de celulosa, uno o más aglutinantes hidrófilos localizados dentro de la red de nanofibras de celulosa y uno o más aglutinantes hidrófobos dispuestos para interactuar con los aglutinantes hidrófilos con el fin de encapsular la pluralidad de nanofibras de celulosa.
- 25 7. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde el almacén de nanocelulosa comprende plaquetas de celulosa caracterizadas porque las plaquetas de celulosa comprenden al menos un 60 % de celulosa en peso seco, menos de un 10 % de pectina en peso seco y al menos un 5 % de hemicelulosa en peso seco.
8. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde el almacén de nanocelulosa comprende material particulado de celulosa de origen vegetal que comprende menos del 30% en peso de glucosa extraíble; y xilosa extraíble en una cantidad de al menos un 5 % de la cantidad de xilosa extraíble en un material vegetal de partida.
- 30 9. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde la partícula de virus tiene péptidos reductores y de unión a metales en la superficie de la partícula.
10. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde la partícula de virus o partícula similar a un virus de este es un virus vegetal, un virus animal sin envoltura o un bacteriófago.
- 35 11. El material nanocompuesto de la reivindicación 1, en donde la partícula viral o partícula similar a un virus es un virus vegetal.
12. Uso del nanocompuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 y de 3 a 11 en al menos uno de pintura, revestimientos, hormigón, fluidos de perforación, optoelectrónica, productos farmacéuticos, biomedicina, como catalizadores o soportes de catalizadores, tecnología de pilas de combustible, biorreactores, membranas de electrolitos, tecnología de sensores en biochips de partículas, material de soporte 3D para reparación de tejidos, cosméticos, reparación ósea y productos de cuidado personal.
- 40

Figura 1

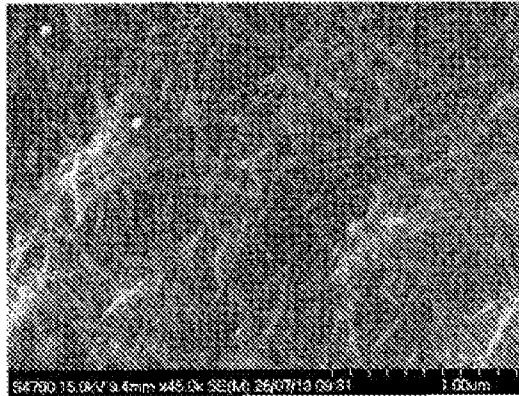


Figura 2

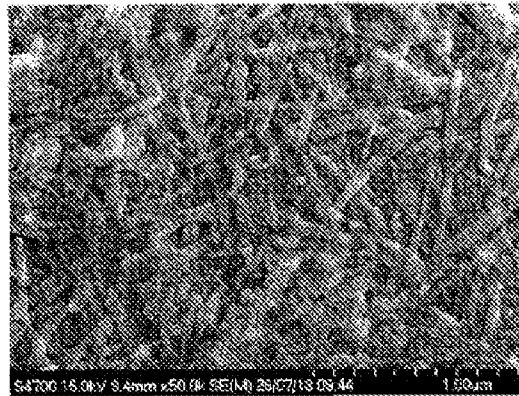


Figura 3

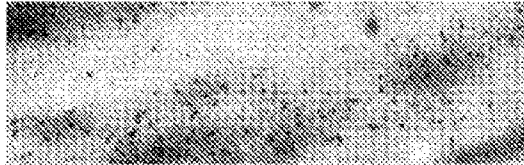


Figura 4

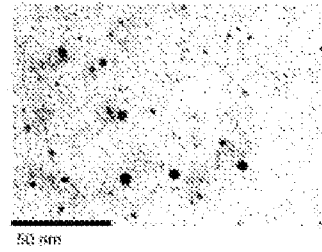


Figura 5

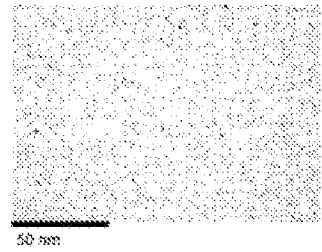


Figura 6

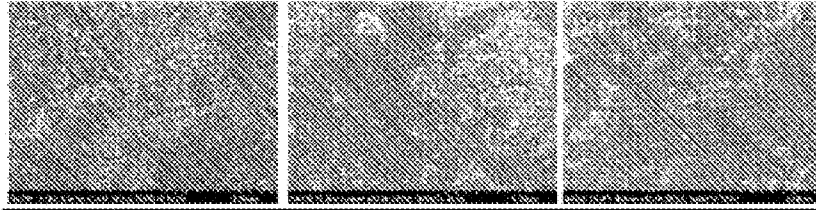


Figura 7

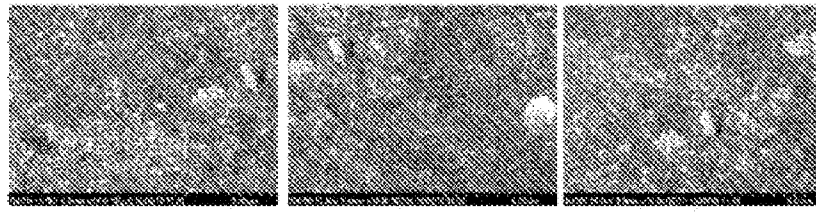


Figura 8

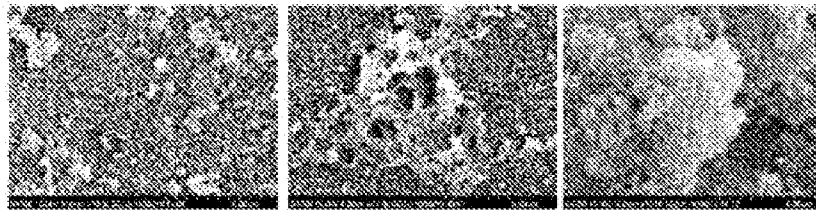


Figura 9

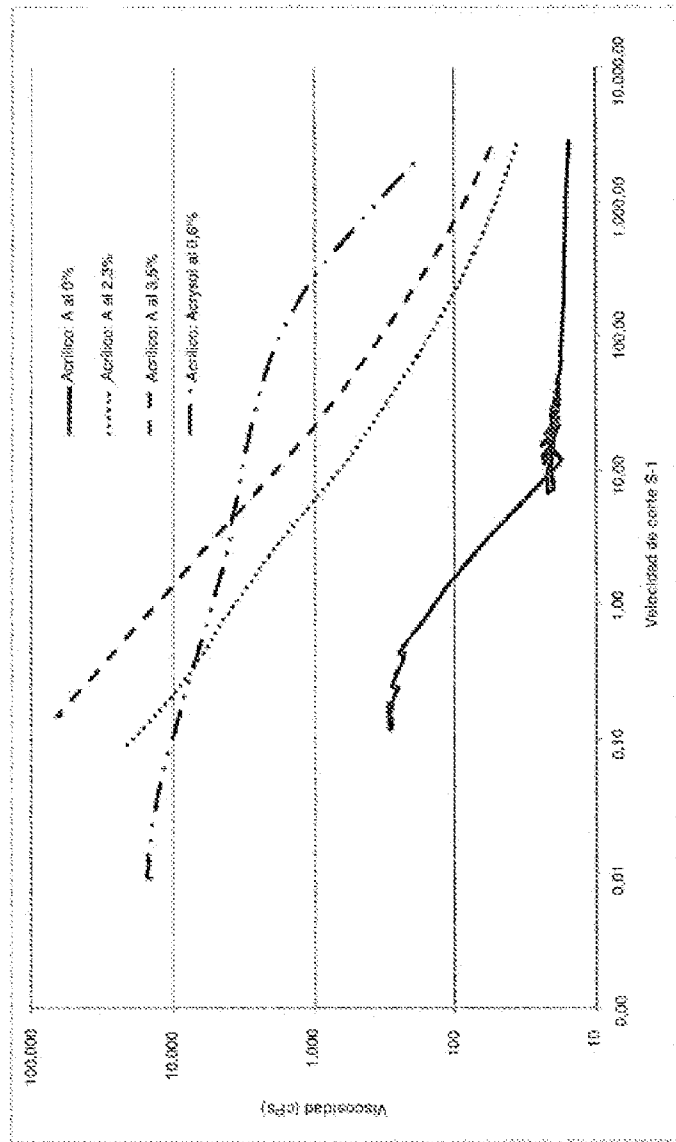


Figura 10

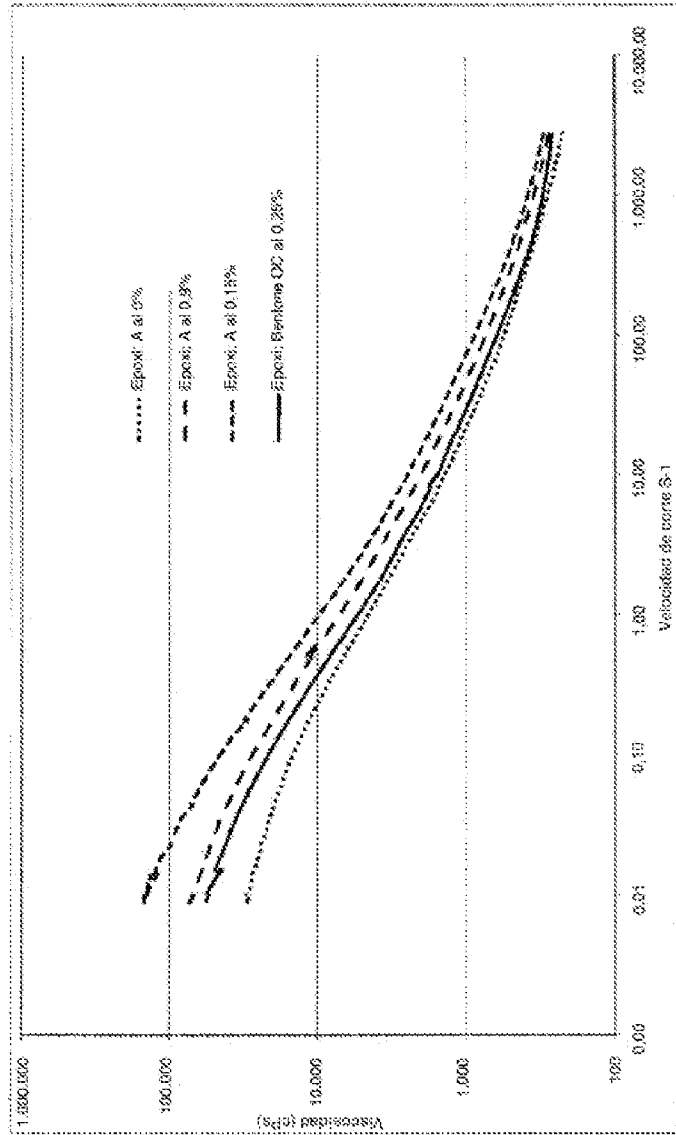


Figura 11

