



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa

Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Departamento de Química

**Síntesis de óxido de titanio mesoporoso  
usando como plantilla el bacteriófago M13**

Tesis que presenta:

**M. en C. Armin Hernández Gordillo**

Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias (Química)**

Dirigida por:

  
Dra. Liliana Irais Vera Robles

  
Dr. Antonio Campero Celis

Jurado:

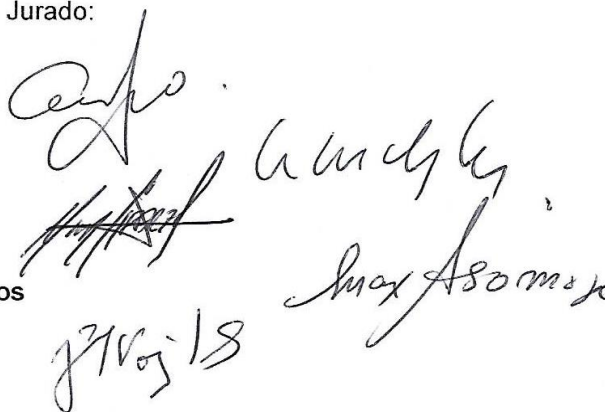
Dra. América Vázquez Olmos

Dr. Andrés Hernández Arana

Dr. Juan Marcos Esparza Schulz

Dr. Maximiliano J. Asomoza Palacios

Dr. Vojtech Jancik



Ciudad de México, Julio de 2018



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00149

Matrícula: 2113803073

Síntesis de óxido de titanio mesoporoso usando como plantilla el bacteriófago M13.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 31 del mes de julio del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA  
DR. MAXIMILIANO JOEL ASOMOZA PALACIOS  
DR. VOJTECH JANCIK  
DRA. AMÉRICA ROSALBA VÁZQUEZ OLMOS  
DR. JUAN MARCOS ESPARZA SCHULZ

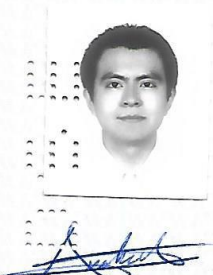
Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS (QUIMICA)  
DE: ARMIN HERNANDEZ GORDILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

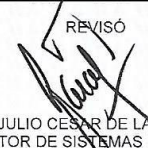
**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.




ARMIN HERNANDEZ GORDILLO  
ALUMNO

REVISÓ



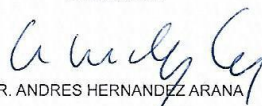
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI




DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE




DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

VOCAL



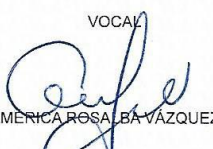
DR. MAXIMILIANO JOEL ASOMOZA PALACIOS

VOCAL



DR. VOJTECH JANCIK

VOCAL



DRA. AMÉRICA ROSALBA VÁZQUEZ OLMOS

SECRETARIO



DR. JUAN MARCOS ESPARZA SCHULZ

«Una nueva verdad científica no se impone por el convencimiento de sus opositores, haciéndoles reconocer la realidad, sino más bien porque algún día los opositores desaparecen y surge una nueva generación que ya está familiarizada con ella».

Max Karl Ernst Ludwig Planck (1858–1947)

## **Agradecimientos**

- Agradezco el apoyo brindado por mis asesores:  
Dr. Antonio Campero Celis  
Dra. Irais Vera Robles

Quienes me dieron la libertad y apoyo para realizar todas mis ocurrencias a lo largo del proyecto doctoral.

- Al jurado:  
Dra. América Vázquez Olmos  
Dr. Andrés Hernández Arana  
Dr. Juan Marcos Esparza Schulz  
Dr. Maximiliano J. Asomoza Palacios  
Dr. Vojtech Jancik

Por las valiosas observaciones y sugerencias realizadas para mejorar y enriquecer este trabajo.

- Al doctor Marcos Esparza y al futuro doctor Isaac Pérez por su apoyo en la caracterización textural de los materiales.
- Al laboratorio central de microscopía electrónica de la UAM-I y a Patricia Castillo por las facilidades para la caracterización de los materiales y por las sugerencias para mejorar la calidad de las imágenes.
- Al laboratorio de difracción de rayos X de la UAM-I (T-128) y al ingeniero Ricardo Rosas por los difractogramas de las muestras analizadas.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del doctorado (Becario: 265459).

**-A mi inquebrantable familia-  
Gracias**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>IV</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>V</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 DIÓXIDO DE TITANIO MESOPOROSO .....	3
1.1.1 <i>Síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso</i> .....	4
1.1.2 <i>Precursores para la síntesis de TiO<sub>2</sub></i> .....	8
1.2 BACTERIÓFAGO M13 .....	9
1.2.1 <i>Propiedades fisicoquímicas del fago M13</i> .....	11
1.2.2 <i>Selección de fagos: Biopanning</i> .....	14
1.3 BIOMINERALIZACIÓN DE TiO <sub>2</sub> .....	16
<b>2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>18</b>
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
2.2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
2.2.1 <i>Hipótesis</i> .....	18
2.2.2 <i>Objetivos</i> .....	18
2.2.2.1 <i>Objetivo general</i> .....	18
2.2.2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	18
<b>3 SECCIÓN EXPERIMENTAL .....</b>	<b>20</b>
3.1 SOLUCIONES AMORTIGUADORAS, MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.....	20
3.2 AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE FAGO M13 .....	21
3.3 CUANTIFICACIÓN DEL FAGO M13 .....	22
3.4 MODIFICACIÓN GENÉTICA DEL FAGO DERIVADO DEL VECTOR M13MP18 .....	23
3.5 BIOPANNING .....	26
3.6 BIOMINERALIZACIÓN DE TiO <sub>2</sub> USANDO PÉPTIDOS .....	27
3.7 SÍNTESIS DE TiO <sub>2</sub> MESOPOROSO .....	28
3.7.1 <i>Precursores de TiO<sub>2</sub></i> .....	31
3.7.1.1 <i>Isopropóxido de titanio</i> .....	31
3.7.1.2 <i>Dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH)</i> .....	33
3.8 CARACTERIZACIÓN DE LOS ÓXIDOS.....	34
3.8.1 <i>Microscopía de transmisión electrónica y difracción de electrones</i> .....	34
3.8.2 <i>Dispersión dinámica de luz</i> .....	34
3.8.3 <i>Difracción de rayos X</i> .....	35
3.8.4 <i>Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier</i> .....	35
3.8.5 <i>Análisis térmico gravimétrico y calorimetría diferencial de barrido</i> .....	35
3.8.6 <i>Adsorción de nitrógeno</i> .....	35
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>37</b>
4.1 MODIFICACIÓN GENÉTICA DEL FAGO M13MP18 .....	37
4.2 BIOPANNING .....	39
4.2.1 <i>Estudio de estabilidad del TiBALDH</i> .....	39
4.2.2 <i>Biopanning usando TiBALDH</i> .....	44
4.3 BIOMINERALIZACIÓN DE TiO <sub>2</sub> USANDO PÉPTIDOS .....	46
4.4 SÍNTESIS DE TiO <sub>2</sub> MESOPOROSO .....	50
4.4.1 <i>Precursores de TiO<sub>2</sub></i> .....	50
4.4.1.1 <i>Isopropóxido de titanio</i> .....	50
4.4.1.2 <i>Dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH)</i> .....	71

<b>5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>74</b>
5.1 CONCLUSIONES.....	74
5.2 PERSPECTIVAS .....	75
<b>6 REFERENCIAS .....</b>	<b>76</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>84</b>
APÉNDICE 1: TABLA DE AMINOÁCIDOS, ESTRUCTURA, ABREVIACIONES Y CARACTERÍSTICAS .....	85
APÉNDICE 2: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES AMORTIGUADORAS.....	87
APÉNDICE 3: CONCEPTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	89
APÉNDICE 4: CLASIFICACIÓN IUPAC DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN-DESORCIÓN.....	92

## Resumen

En este trabajo se propuso al bacteriófago M13 como una plantilla biológica para sintetizar  $\text{TiO}_2$  mesoporoso. El bacteriófago (fago) M13 es un virus con forma filamentosa, semiflexible y con un diámetro de 6.5 nm. La síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso se logró adaptando el método sol-gel al ambiente químico de la cápside del fago usando una metodología inspirada en el algoritmo genético para hallar los parámetros óptimos de reacción. La estructura semi-rígida del fago permitió obtener una estrecha distribución de tamaño de poro y evitó la microporosidad en la estructura. La remoción del fago por calcinación permitió obtener la fase anatasa sin provocar el colapso de la estructura mesoporosa. Con esta metodología fue posible obtener  $\text{TiO}_2$  mesoporoso con tamaño medio de poro de 6.1 y 8.2 nm, y área superficial específica de 130 y 80  $\text{m}^2/\text{g}$  respectivamente. El tamaño de los cristales de anatasa de la pared del poro influyó en el área superficial específica, el cual pudo controlarse simplemente ajustando el pH y la concentración del alcóxido en la solución (relación molar Ti:p8 y Ti:OH).

Inicialmente se intentó modificar genéticamente la proteína p8 del fago para la expresión de péptidos con afinidad a  $\text{TiO}_2$ , lo que permitiría adaptar los grupos funcionales de la cápside del fago a la síntesis de arreglos ordenados mesoporosos de  $\text{TiO}_2$  cristalino a temperatura ambiente. No obstante, las modificaciones genéticas no fueron viables probablemente debido a una saturación de cargas positivas en el extremo amino terminal de la proteína p8 que impide el adecuado ensamble del fago. Al no lograr la inserción genética de los péptidos propuestos, se optó por la selección de péptidos con un punto isoeléctrico bajo. Por medio de un *biopanning* sobre el precursor TiBALDH se identificaron cuatro posibles secuencias para la biomineralización de  $\text{TiO}_2$ . La elección del sistema amortiguador de pH y concentración del TiBALDH fueron vitales para una identificación confiable. Dos de las secuencias halladas, TNWQALAYMQRH (TN) y ENHWSLSTLMSS (EN), fueron elegidas para la biomineralización de  $\text{TiO}_2$ . Estos péptidos lograron formar nanopartículas de anatasa a temperatura ambiente los cuales, al tener pocos residuos básicos, su inserción genética en el fago podría ser posible.

**Abstract**

In this work, the bacteriophage M13 was proposed as a biological template for the synthesis of mesoporous TiO<sub>2</sub>. The bacteriophage (phage) M13 is a filamentous semi-flexible virus with a diameter of 6.5 nm. The synthesis of mesoporous TiO<sub>2</sub> was achieved by adapting the sol-gel method to the chemical environment of the phage capsid. The optimal parameters for the reaction were found by using a methodology inspired by the genetic algorithm. The semi-rigid structure of the phage allowed to obtain a narrow pore size distribution and to prevent microporosity in the structure. The removal of the phage by calcination produced the anatase phase without causing the mesoporous structure to collapse. With this methodology, it was possible to obtain mesoporous TiO<sub>2</sub> with a medium pore size of 6.1 and 8.2 nm, and a specific surface area of 130 and 80 m<sup>2</sup>/g respectively. The size of the anatase crystals in the pore wall influenced the specific surface area, which could be controlled by adjusting the pH and alkoxide concentration in the solution (molar ratio Ti:p8 and Ti:OH).

Initially, an attempt was made to genetically modify the p8 protein of the phage for the expression of TiO<sub>2</sub>-affinity peptides, which would allow the functional groups of the phage capsid to be adapted to the synthesis of ordered mesoporous arrays of crystalline TiO<sub>2</sub> at room temperature. However, the genetic modifications were not feasible, probably due to a positive charge saturation at the amino end of the p8 protein that prevents the proper phage assembly. As the proposed peptides could not be genetically inserted, a selection of peptides with a low isoelectric point was made. By performing a biopanning on the precursor TiBALDH, four possible sequences for the biomineralization of TiO<sub>2</sub> were identified. The selection of pH and concentration buffer system of TiBALDH was vital for a reliable identification. Two of the sequences found, TNWQALAYMQRH (TN) and ENHWSLSTLMSS (EN), were chosen for the biomineralization of TiO<sub>2</sub>. These peptides were able to form anatase nanoparticles at room temperature which, having few basic residues, could be genetically inserted into the phage.



## Nomenclatura

Cápside = conjunto de proteínas que envuelven el material genético de un virus

Cistrón = gen que codifica la síntesis de un polipéptido

DLS = dispersión dinámica de luz

$e$  = carga del electrón ( $-1.62 \times 10^{-19}$  C)

IPTG = reactivo inductor de expresión isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

kpb = mil pares de bases

MES = ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico

PB = solución amortiguadora de fosfatos, pH 7.0

pb = par de bases (nucleótidos)

PCR = reacción en cadena de polimerasa

pI = punto isoeléctrico

Plásmido = moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico

*Primer* = fragmento de ADN complementario a una parte de la cadena de ADN a replicar

rpm = revoluciones por minuto

SDS = dodecil sulfato de sodio

TEM = microscopía electrónica de transmisión

TEMED = N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

Ti:OH = relación molar entre precursor de titanio y el alcohol usado

Ti:p8 = relación molar entre el precursor de titanio y la proteína p8 del fago

TiBALDH = Dihidroxidilactatotitanato(IV) de bis-amonio

Tris = Trishidroximetilaminometano (amortiguador de pH)

ufp = unidades formadoras de placas

Vector genético = moléculas transportadoras que transfieren y replican fragmentos de ADN que llevan insertados mediante técnicas de ADN recombinante, p. ej. plásmidos

X-gal = reactivo 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

## 1 INTRODUCCIÓN

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es uno de los materiales más prometedores para aplicaciones en captación, almacenamiento y transformación de energía.<sup>1</sup> El  $\text{TiO}_2$  es un semiconductor de tipo n de marcado carácter iónico. Este óxido puede presentarse con estructura amorfa o cristalina. Las tres principales fases cristalinas son: anatasa, rutilo y brookita con una banda prohibida (*band gap*) de 3.2, 3.02 y 2.96 eV respectivamente.<sup>2</sup>

El rutilo tiene una estructura tetragonal muy estable a altas temperaturas y presiones. Las estructuras de anatasa y brookita pueden transformarse a la fase de rutilo a temperatura elevada en función del tamaño de partícula, siendo el rutilo más estable que la anatasa para tamaños de partícula mayores a 14 nm.<sup>2</sup> La anatasa también tiene una estructura tetragonal y es la predilecta para aplicaciones en celdas solares y fotocátalisis por la alta movilidad de sus electrones, baja constante dieléctrica y menor densidad. La anatasa tiene también una mayor fotoreactividad respecto a las otras fases cristalinas, esto se debe al alto nivel de Fermi, baja capacidad para adsorber oxígeno y alto grado de hidroxilación. Hay evidencia de que incluso la disposición de los planos cristalinos en la superficie del  $\text{TiO}_2$  afecta la reactividad.<sup>3</sup> La brookita pertenece al sistema cristalino ortorrómbico. Esta estructura es más complicada, tiene un mayor volumen de celda respecto a las otras dos y no es utilizada comúnmente para aplicaciones tecnológicas.

En su estado amorfo, el  $\text{TiO}_2$  es muy utilizado en la industria (cosméticos, alimentos, pinturas, productos de higiene personal, etc.), aunque las propiedades fisicoquímicas del  $\text{TiO}_2$  dependen de la estructura, forma y tamaño. Por ejemplo, nanopartículas de anatasa son frecuentemente elegidas para fotocátalisis, mientras que el rutilo posee alto índice de refracción y se prefiere para aplicaciones ópticas (pigmentos, bloqueadores solares).<sup>4-6</sup>

Actualmente, los métodos de síntesis para nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  cristalinas requieren un tratamiento térmico durante o posterior a la síntesis, además de procesos intrincados que controlen adecuadamente el tamaño y la forma.<sup>7</sup> No obstante, si analizamos los datos termodinámicos del  $\text{TiO}_2$ , resulta que las energías de formación estándar ( $\Delta_f G_{298}^0$ ) para las principales fases cristalinas son

exergónicas (Tabla 1.1) por lo que su síntesis es posible a temperatura ambiente sin necesidad de tratamientos térmicos.

**Tabla 1.1.** Energía libre de formación estándar y temperatura de cristalización ( $T_c$ ) de algunas fases cristalinas de  $\text{TiO}_2$ .

<b>Estructura</b>	$\Delta_f G_{298}^0/\text{kJmol}^{-1}$	$T_c/^\circ\text{C}$
Anatasa	-883.27 <sup>a</sup>	400 <sup>c</sup>
Rutilo	-889.41 <sup>a</sup>	600-700 <sup>c</sup>
Brookita	-887.0 <sup>b</sup>	Variable

<sup>a</sup>ref. [8], <sup>b</sup>ref. [9], <sup>c</sup>ref. [10]

Este hecho nos permite plantear la posibilidad de sintetizar  $\text{TiO}_2$  mediante síntesis suaves que faciliten la obtención de estructuras con propiedades texturales únicas, ampliando las rutas de síntesis para materiales híbridos y la oportunidad de explorar su sinergia con moléculas poco estables o termosensibles. El reto actual es hallar esas rutas suaves de reacción, para ello, es necesario aprender del mayor experto en síntesis ideales, la naturaleza.

La naturaleza ha empleado un camino evolutivo para sintetizar materiales inorgánicos cristalinos y bien estructurados bajo condiciones suaves (biomineralización). Todo el control sintético en los organismos biológicos es dirigido por biomoléculas cuya especificidad es tan precisa que pueden formar arreglos de gran complejidad tales como la hidroxiapatita de los dientes, la aragonita en las conchas de mar, redes porosas de  $\text{SiO}_2$  en las diatomeas, la magnetita en bacterias, etc.<sup>11</sup>

En especial, las diatomeas y esponjas marinas llevan a cabo un proceso de síntesis inorgánica de  $\text{SiO}_2$  que ha sido imitado in vitro desde hace varias décadas. Mediante reacciones de tipo sol-gel estos organismos forman su exoesqueleto, donde proteínas llamadas silafinas interaccionan con el ácido silícico (producto de hidrólisis) para luego formar la red de  $\text{SiO}_2$  (condensación).<sup>12</sup> Así, el proceso sol-gel ofrece varias ventajas sobre otros métodos, pues implica un procedimiento simple, a baja temperatura y con gran homogeneidad que además permite la formación de

estructuras metaestables como la anatasa en el  $\text{TiO}_2$ .<sup>13-14</sup> Estos ejemplos demuestran las diversas posibilidades de síntesis de materiales inorgánicos mediados únicamente por péptidos y proteínas, lo que permitirían fácilmente la preparación de óxidos metálicos jerarquizados de relevancia tecnológica tales como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{ZrO}_2$ , etc. y de acuerdo a Dong,<sup>13</sup> la síntesis biomimética asociada con el proceso sol-gel sería la técnica ideal para el diseño y fabricación de materiales funcionales con propiedades físicas y químicas específicas, tales como su composición, estructura cristalina, tamaño, forma, etc.

Recientemente, las síntesis tradicionales que requerían tratamientos térmicos están siendo mejoradas a partir de los procesos cinéticos y termodinámicos involucrados en solución.<sup>15-16</sup> También se ha comenzado a estudiar nuevos precursores de elementos metálicos que permitan mejores resultados en la obtención de sus óxidos.<sup>17</sup> Debido a lo anterior, biomoléculas como proteínas, péptidos y estructuras virales han sido empleadas como bioplantillas o plataformas para la síntesis de materiales tales como nanopartículas metálicas y óxidos metálicos desarrollando nuevas y diversas aplicaciones.<sup>18-21</sup>

### ***1.1 Dióxido de titanio mesoporoso***

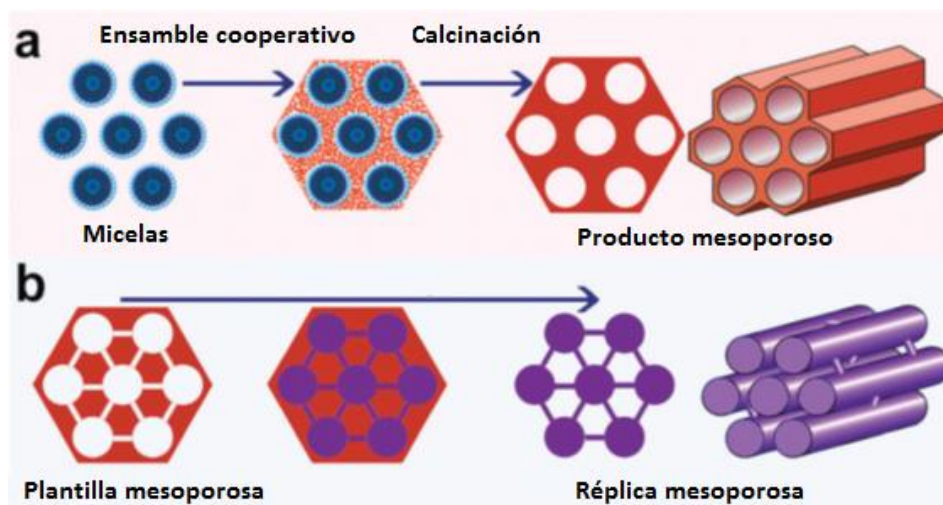
Los materiales porosos son de gran interés en el campo de la química por su habilidad para interactuar con átomos, moléculas, etc.; no sólo en la superficie, sino también en su interior. Así, la presencia de poros en materiales nanoestructurados puede incrementar en gran medida sus propiedades físicas y químicas, además de extender sus posibles aplicaciones para adsorción, separación, catálisis, sensores, almacenamiento y conversión de energía. A partir de la síntesis de sílice mesoporosa (e. g. MCM-41 y SBA-15) en los 90's, los materiales mesoporosos han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades texturales, tales como la capacidad de modificar diámetros de poro, áreas superficiales, volúmenes y formas de poro, composiciones de la estructura porosa, así como también de sus numerosas aplicaciones.

Desde inicios del siglo XXI, se han logrado sintetizar una gran diversidad de

materiales mesoporosos con múltiples composiciones, desde estructuras puramente inorgánicas u orgánicas, hasta compositos. El  $\text{TiO}_2$  mesoporoso se encuentra entre los materiales que han experimentado un rápido avance debido a su bajo costo, nula toxicidad, polimorfismo, estabilidad térmica y química y excelentes propiedades ópticas y electrónicas. Comparado con el  $\text{TiO}_2$  común, el  $\text{TiO}_2$  mesoporoso no sólo incrementa el número de sitios activos accesibles, sino también facilita la difusión de reactivos y productos; la mayor área superficial y las cavidades porosas proveen una mejor capacidad para la interacción de compuestos ya sea para catalizar las reacciones químicas o encapsular moléculas de interés. Esto tiene aplicaciones para celdas fotovoltaicas, fabricación de baterías y catálisis. De esta manera, el diseño y síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso con diámetros de poro y estructura controlables son muy importantes para temas tanto de ciencia básica (por ejemplo, para el estudio de fenómenos de adsorción) como de tecnología.<sup>22</sup>

### **1.1.1 Síntesis de $\text{TiO}_2$ mesoporoso**

La preparación de materiales mesoporosos está principalmente enfocada a obtener poros monodispersos a escala mesoscópica (2-50 nm) y con ordenamientos diversos. De forma similar a la síntesis de sílice mesoporoso, hay principalmente dos rutas para sintetizar mesoporos ordenados de  $\text{TiO}_2$  (Figura 1.1): el método de la plantilla suave, que consiste en utilizar agregados supramoleculares (micelas) formadas por tensoactivos; y el método de la plantilla rígida, utilizar sólidos mesoporosos tales como sílice tipo SBA. Aunque existen algunos métodos de síntesis que no necesitan utilizar plantillas para obtener  $\text{TiO}_2$  mesoporoso, tienen el inconveniente de no poder controlar parámetros como el tamaño de poro o su ordenamiento.<sup>22-23</sup> Algunos aspectos importantes de las dos rutas de síntesis principales se describen a continuación.



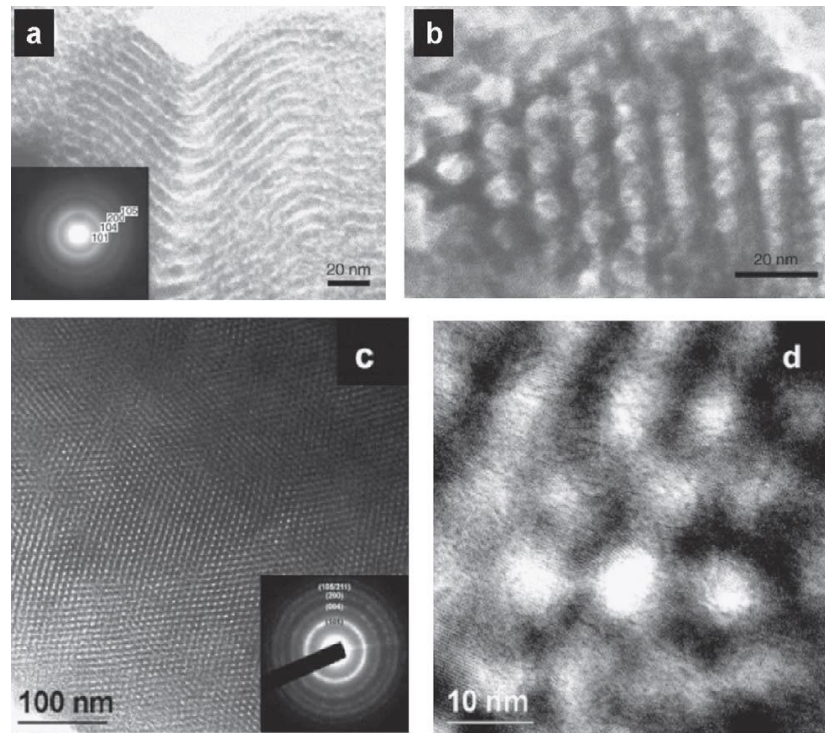
**Figura 1.1.** Esquema de las dos principales rutas de síntesis para materiales mesoporosos: a) método de plantilla suave y b) método de plantilla rígida. Adaptado de ref. <sup>23</sup> con permiso de The Royal Society of Chemistry.

#### l) Método de plantilla suave

Este método fue propuesto inicialmente para la síntesis de sílice mesoporosa usando el método sol-gel, que con ayuda de arreglos micelares es posible llevar a cabo las reacciones de condensación de alcóxidos de silicio para formar mesoporos de  $\text{SiO}_2$  con tamaños y formas diversas.<sup>24</sup> Sin embargo, la adaptación de este método para la síntesis de óxidos metálicos ha sido difícil.

Particularmente, a diferencia de los alcóxidos de silicio, los precursores de titanio tienen alta reactividad química debido a la mayor densidad de carga del catión de titanio y su habilidad para expandir su esfera de coordinación. Así, los precursores de titanio tienden a hidrolizarse rápidamente y formar agregados amorfos, lo cual complica el ensamblaje con los arreglos micelares, dando como resultado una indeseable separación de fases y presencia de microporos debido a la encapsulación de las moléculas dispersas del tensoactivo producto de la disrupción del arreglo micelar.<sup>25</sup> Por ello, el punto clave para la preparación de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso utilizando tensoactivos es controlar la velocidad de hidrólisis y condensación de los alcóxidos de titanio para permitir a las moléculas de tensoactivo organizarse y una vez organizadas proceder a la formación del óxido (condensación) sobre la superficie de éstas. También se necesita ser cuidadoso de

que los poros no colapsen al remover la plantilla o al cristalizar térmicamente el material. Algunos ejemplos de mesoporos sintetizados por este método se muestran en la Figura 1.2.



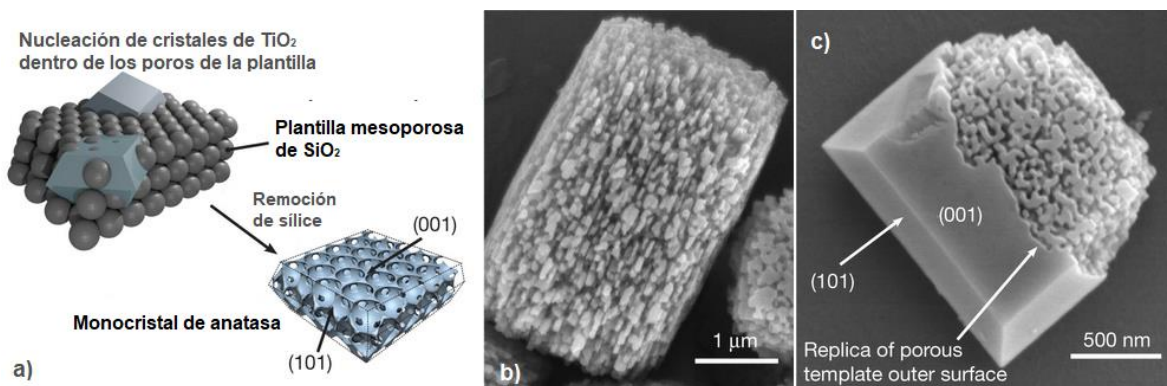
**Figura 1.2.** Micrografías de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso sintetizado por el método de plantilla suave usando como plantilla Pluronic P123. Reimpreso de ref. <sup>26</sup> con permiso de Elsevier.

## II) Método de plantilla rígida

El uso como plantillas rígidas de sólidos preformados para sintetizar materiales mesoporosos ha permitido nuevas posibilidades para la preparación de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso con paredes cristalinas y mesoestructuras novedosas. En este caso, los mesoporos de  $\text{TiO}_2$  se forman a partir de un arreglo regular de nanoalambres/nanoesferas generalmente de  $\text{SiO}_2$  en tres pasos principales: i) el precursor se infiltra por los canales de la plantilla; ii) se lleva a cabo la conversión del precursor (formación de la red de óxido) dentro de estos canales; iii) finalmente la remoción de la plantilla mesoporosa rígida (Figura 1.3).

Comparado con el método de plantilla suave, el método de plantilla rígida es más complicado, pues es necesario obtener la plantilla rígida a través de otros métodos

(generalmente por plantilla suave). Como ventajas, esta estrategia de síntesis permite tener una porosidad homogénea evitando la presencia de microporos. Además, no sólo evita tener que controlar la mezcla de ensamble entre precursor y plantilla sino también impide el colapso de los mesoporos en el proceso de cristalización del  $\text{TiO}_2$ , obteniendo así, una síntesis de mesoporos de  $\text{TiO}_2$  con alta cristalinidad y estabilidad térmica.



**Figura 1.3.** a) esquema del método de plantilla rígida para mesoporos de  $\text{TiO}_2$ . b) y c) Imágenes de SEM de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso obtenido por el método de plantilla rígida. Adaptado con permiso de Macmillan Publishers Ltd: ref. <sup>27</sup>.

Dependiendo el tipo de plantilla, pueden obtenerse resultados diversos en cuanto a las propiedades texturales del material. En la Tabla 1.2 se resumen algunos resultados de materiales mesoporosos preparados con estos métodos. La microporosidad es característica de los óxidos preparados por plantilla suave, lo que incrementa el área superficial específica pero no necesariamente accesible a moléculas voluminosas (área superficial aparente).



**Tabla 1.2.** Propiedades texturales de TiO<sub>2</sub> mesoporoso reportados en la literatura.

<b>Tipo de plantilla</b>	<b>Tamaño medio de poro/nm</b>	<b>Área superficial específica/(m<sup>2</sup>/g)</b>	<b>Microporosidad</b>	<b>Ref.</b>
Suave	2.78	1230	alta	28
Suave	2.4	712	alta	29
Suave	6.3	205	baja	30
Suave	5.7	100	baja	31
Rígida	20	70	-	27
Rígida	2.7	258	baja	32
Rígida	5.98	753	baja	33
Rígida	6.0	166	baja	34

### 1.1.2 Precursores para la síntesis de TiO<sub>2</sub>

Las características del TiO<sub>2</sub> no sólo dependen de la ruta de síntesis elegida, sino también del tipo de precursores que se utilicen. Existe una gran variedad de precursores de titanio que son empleados para la síntesis de TiO<sub>2</sub>, estos precursores pueden dividirse en dos categorías: complejos orgánicos de titanio y sales inorgánicas. Las sales de titanio como el TiCl<sub>4</sub> son muy reactivas, por lo que se emplean especialmente en métodos solvotérmicos. Por el otro lado, los complejos de titanio a su vez se pueden dividir en dos subgrupos principales: alcóxidos y carboxilados.

Tradicionalmente se utilizan los alcóxidos de titanio para la síntesis de TiO<sub>2</sub> vía el método sol-gel. Los alcóxidos son también complejos muy reactivos cuya velocidad de hidrólisis depende del grupo alcóxido, siendo menos reactivos entre más voluminoso sea el grupo alcoxi. La condensación de los alcóxidos puede ser controlada por medio del pH o por ligandos que sustituyen los grupos alcóxido para estabilizar los oxotitanatos formados por la hidrólisis. Por otro lado, los complejos carboxilados de titanio cumplen con esta tarea, cuya estabilidad en agua es mucho mayor a la de los alcóxidos. Entre los precursores carboxilados están, por ejemplo, los complejos con acetato, citrato, lactato, etc.

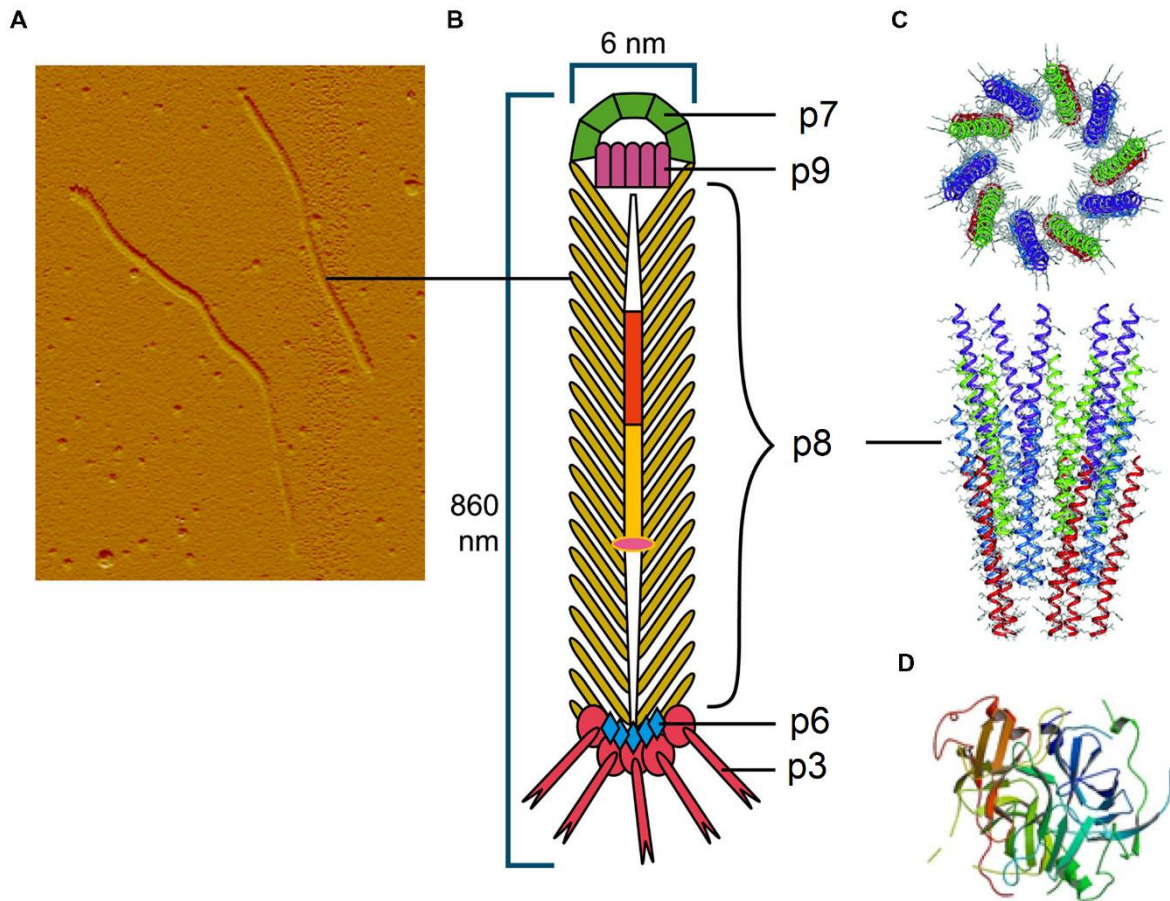
Los ligandos lactato y oxalato han sido ampliamente usados para coordinar iones

de titanio y disolver óxidos de titanio en menas. En particular el lactato de titanio es un complejo muy estable en agua, lo que permite un mejor control en la hidrólisis del titanio. Además, el lactato es un compuesto biocompatible, por lo que este precursor es idóneo para aplicaciones de  $\text{TiO}_2$  en implantes y administración de medicamentos o su uso en síntesis biomimética. Desafortunadamente, la reactividad de los complejos de lactato y oxalato de titanio ha sido poco estudiada y su aplicación en la síntesis de  $\text{TiO}_2$  ha sido mayormente empírica.<sup>35</sup>

### **1.2 Bacteriófago M13**

Los bacteriófagos (fagos) son los virus más numerosos en la tierra, los cuales se caracterizan por utilizar bacterias como organismo hospedero. Entre las especies de fagos se encuentra el M13 que pertenece a la familia de los *inoviridae*, los cuales infectan a través de un filamento F a *Escherichia coli* por lo que también son llamados fagos Ff y son totalmente inocuos para el ser humano.<sup>36-37</sup> A diferencia de los otros virus inocuos, como el del mosaico del tabaco (TMV) o el fago  $\lambda$ , los fagos Ff tienen la ventaja de poderse replicar fácilmente en el laboratorio usando cultivos bacterianos y su purificación es relativamente sencilla.

El M13 es un virus filamentoso (en forma de rodillo) con una longitud de  $880 \pm 30$  nm y un diámetro aproximado de 6.5 nm (medido por TEM).<sup>36</sup> En su interior se encuentra el ADN circular de cadena sencilla con 6407 nucleótidos que contiene la información genética necesaria para su replicación en bacteria. De sus nueve genes, únicamente cinco cistrones presentes en el material genético son los que codifican las proteínas que conforman la cápside. La proteína helicoidal p8 (50 residuos) es la que cubre toda la parte longitudinal del fago con  $2750 \pm 100$  unidades por fago. Las otras cuatro proteínas cubren los extremos del fago y están presentes en menor cantidad, alrededor de 5 copias por fago (ver Figura 1.4).<sup>38-39</sup>



**Figura 1.4.** A) Imagen de microscopía de fuerza atómica del bacteriófago M13. B) esquema del fago, conformado por cinco proteínas (p3, p6, p7, p8 y p9) y ADN circular de cadena sencilla. C) Visualización de la estructura secundaria y ensamble de la proteína p8 la cual está helicoidalmente ensamblada envolviendo al ADN genómico (no mostrado), PDB 2C0W. D) Visualización de los dominios N1 y N2 de la proteína p3, la proteína más grande del fago, PDB 1G3P. Adaptado de ref. <sup>40</sup>.

Actualmente el fago M13 es una de las plantillas más complejas y versátiles empleadas en nanociencia. Las múltiples proteínas en su cápside que contienen una gran diversidad de grupos funcionales y su facilidad de cultivarlos en el laboratorio permiten su uso en este campo. También, gracias a su forma y a que adoptan arreglos tridimensionales en ciertos intervalos de concentración y pH<sup>41</sup> es viable su uso como bioplantilla para la síntesis de materiales ordenados. Además, al tener un ensamble muy estable de las proteínas p8 no se necesitan solventes o concentraciones delimitadas para formar un arreglo tubular, como es el caso de las

micelas formadas con tensoactivos, lo cual permite clasificarlo como una plantilla semirrígida. Otro aspecto importante es que la producción del fago, comparado con la de otras biomoléculas, es mucho más barata y sencilla.

La información para la síntesis de las proteínas de su cápside está contenida en su ADN, lo que permite la modificación genética para expresar variedad de secuencias de aminoácidos en las proteínas. Con ello, es posible utilizar la diversidad química de los grupos funcionales de la superficie del virus, haciendo factible el diseño de síntesis inorgánica dirigida por el virus.

Por ejemplo, actualmente se construyen bibliotecas de péptidos con secuencias aleatorias (casi las  $20^n$  secuencias posibles, donde  $n$  es el número de aminoácidos del péptido) que se expresan sobre la proteína p3 de fagos modificados genéticamente. Esta biblioteca de péptidos expresados en fagos permite seleccionar secuencias peptídicas con alta afinidad a materiales a partir de una técnica combinatoria llamada *biopanning*.

En el caso de la síntesis de materiales inorgánicos, el fago M13 se ha usado como plantilla para producir mesoporos de  $\text{SiO}_2$ .<sup>42</sup> En dicha síntesis, el fago M13 se funcionaliza químicamente para que en la proteína p8 tenga grupos tiol, que además de servir como plantilla para crear mesoporos, permiten controlar el crecimiento de nanopartículas de metales nobles. Estos resultados refuerzan la viabilidad del uso del M13 para materiales mesoporosos.

### **1.2.1 Propiedades fisicoquímicas del fago M13**

En los años posteriores al descubrimiento del fago M13 en 1963,<sup>43</sup> se realizaron múltiples investigaciones sobre su composición y propiedades bioquímicas. Sin embargo, tuvieron que pasar décadas para que comenzara su estudio en nanotecnología y ciencia de materiales. Todo esto debido a que la mayoría de las aplicaciones del fago se enfocaron para su uso como vector en biología molecular, relegando el interés de estudiar sus propiedades fisicoquímicas que pudieran motivar su uso en síntesis de materiales.

El fago M13 silvestre tiene propiedades fisicoquímicas similares a las de otros fagos Ff (fd, f1), pero también existen variantes genéticas que se han creado para su uso

como vector en biología molecular. Ejemplos como los vectores M13mp y los M13KE,<sup>44</sup> con un mayor número de nucleótidos, producen fagos de mayor longitud respecto al fago silvestre. El uso de vectores de clonación derivados del M13 silvestre es tan rutinario que muchos autores lo reportan como M13 silvestre.

En este trabajo, para obtener el fago, se utilizó el vector M13mp18 (New England BioLabs), por lo que es importante hacer hincapié en las diferencias con respecto al silvestre. Si consideramos que el M13mp18 tiene 7249 bases y el número de nucleótidos por proteína p8 en los fagos Ff es en promedio  $2.3 \pm 0.11$ , entonces el fago derivado de este vector está formado por  $3150 \pm 150$  proteínas p8 y una longitud de  $995 \pm 30$  nm, teniendo mayor flexibilidad respecto al M13 silvestre. Con respecto a la masa molar, el fago M13 silvestre tiene una masa molar de  $(16.1 \pm 0.3) \times 10^6$  g/mol, mientras que la del fago derivado del vector M13mp18 es de  $(18.2 \pm 0.3) \times 10^6$  g/mol.<sup>36, 45</sup> Estas diferencias son las más importantes y es vital tomarlas en cuenta cuando se usan fagos derivados de vectores de clonación.

Dado que hay pocos trabajos sobre la fisicoquímica del M13, a continuación, se recopila información sobre propiedades fisicoquímicas del grupo de fagos filamentosos Ff y algunas específicas del M13. Su forma filamentosa y la similitud del 98% en su genoma entre los fagos Ff, es suficiente para generalizar algunas propiedades importantes.

El fago M13 tiene un punto isoeléctrico de 4.3y es estable en un amplio intervalo de pH y temperatura.<sup>46-48</sup> Para soluciones acuosas a pH 4.5-9, cuando la temperatura es de 50 °C al menos la mitad de los virus Ff mantienen su infectividad (estabilidad media) durante 30 minutos. A pH 7 la estabilidad media es máxima (60 min) e incrementa cuando se disminuye la temperatura. La presencia de medio de cultivo (mayor fuerza iónica) también es factor importante de su estabilidad, donde la temperatura máxima tolerada por el virus llega hasta 80 °C.<sup>46, 49</sup> La estabilidad del fago se mantiene a intervalos de pH de 3-11 en medio de cultivo NB2. Su estabilidad en sistemas acuosos amortiguados no ha sido reportada, pero se esperaría un intervalo de estabilidad menor.<sup>49</sup> En uno de los primeros trabajos sobre fagos filamentosos se menciona que el fago es estable al menos por una hora a 25 °C en un intervalo de pH de 2.5-10.5,<sup>37</sup> el cual concuerda con los resultados más recientes.

Es importante señalar que estos estudios han relacionado directamente la estabilidad del fago con su capacidad de infectar a la bacteria, la cual depende directamente del adecuado plegamiento de la proteína p3, mas no del ensamble de toda su cápside. Por lo que la forma de rodillo del fago se podría conservar incluso en condiciones mucho más extremas, pues sólo se necesita el ensamble de las proteínas p8 cuyas interacciones hidrofóbicas y electrostáticas estabilizan fuertemente la estructura.

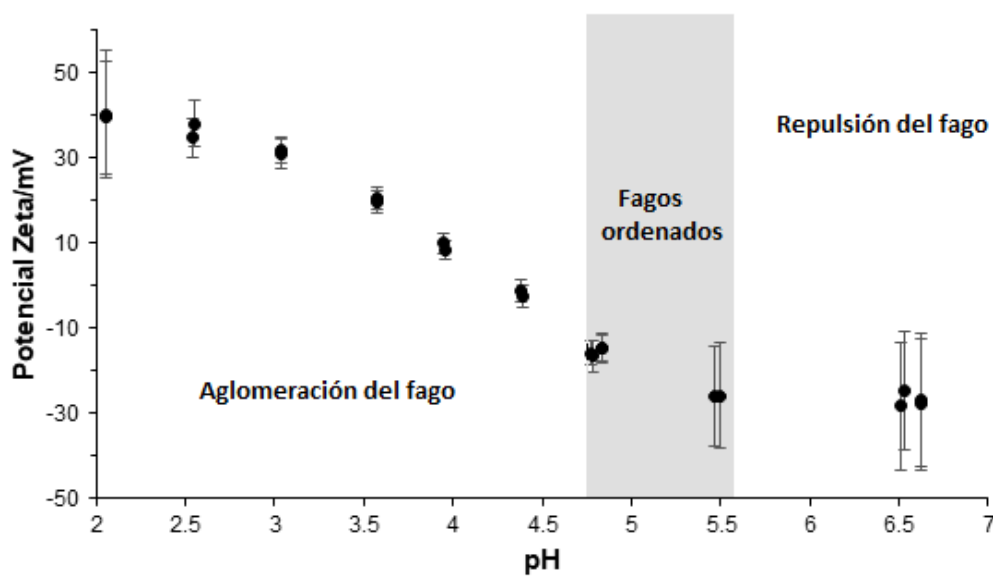
Los fagos Ff pueden resistir a cosolventes tales como alcoholes u otros solventes orgánicos. Entre menor sea la polaridad de los solventes, mayor es el desensamble del fago debido a la solvatación de la proteína p8, la cual se compone mayormente de residuos hidrofóbicos. Existe un estudio sobre la estabilidad de virus filamentosos donde el metanol, etanol e isopropanol son soportados hasta concentraciones en agua de 60, 50 y 30% respectivamente, antes de disminuir su infectividad después de 30 min.<sup>50</sup> Esta resistencia a alcoholes es muy importante para su uso en reacciones sol-gel.

Con respecto al rendimiento, la cantidad de fago obtenida in vitro es bastante variable, se puede obtener de 3-30 mg de fago por litro de cultivo e incluso superar los 100 mg/L.<sup>49</sup> Esto depende del tipo de bacteria infectada y si el fago está modificado genéticamente. Su purificación es simple, pues cercano al punto isoeléctrico los fagos se agregan pudiendo recuperarlos por centrifugación. La precipitación del fago > 90% se logra cuando el pH está entre 3.9-4.5. A pH 4.3 incubado por 1 h a 4 °C y centrifugado por 8 min a 13000 rpm resulta en un 99% de fago recuperado. Otra manera de purificar el fago es la precipitación por polietilenglicol (PEG), que al 2% p/v de PEG (masa molar promedio 6000 g/mol) y 300 mM de NaCl permite una óptima recuperación del fago, mejorando el resultado si se utiliza MgCl<sub>2</sub>.<sup>51</sup> La desventaja de la precipitación con PEG es que la solución de fago contiene aún cantidades de PEG y sal, haciendo necesario dializar la solución para eliminarlas por completo.

Tomando en cuenta que cerca del punto isoeléctrico el fago se agrega, entonces a pH > 4.5 prácticamente no hay precipitación, por lo que el uso del fago como plantilla a esos valores de pH es factible. En la Figura 1.5 se muestra el potencial Z del fago

M13 respecto al pH y se señalan las diversas zonas de pH donde los fagos se agregan ( $\text{pH} < 4.8$ ), se organizan ( $4.8 \leq \text{pH} \leq 5.5$ ) o se repelen ( $\text{pH} > 5.5$ ) entre ellos. De esta forma, el fago dependiendo de su carga superficial se puede organizar en arreglos tridimensionales haciéndolo una plantilla adaptable a diferentes requerimientos.

Es interesante el grado de autoorganización de los fagos filamentosos, pues no sólo dependen del pH del medio, sino también de la concentración, fuerza iónica y longitud.<sup>52</sup> Los fagos Ff presentan un comportamiento de cristal líquido dando ordenamientos en función de la concentración: isotrópico, nemático y esméctico.<sup>41</sup> Las fases esmécticas aparecen a concentraciones  $> 2.59 \text{ mg/mL}$ ,<sup>53</sup> mientras que las nemáticas se forman incluso a concentraciones de  $0.1 \text{ mg/mL}$ .<sup>54</sup>



**Figura 1.5.** Diagrama de potencial Z vs pH del virus M13.<sup>48</sup> Se especifica la región donde existe un ordenamiento del fago.

### 1.2.2 Selección de fagos: *Biopanning*

El *biopanning* es una técnica de química combinatoria que consiste en utilizar una gran colección de péptidos expresados en la superficie de una proteína, los cuales son insertados genéticamente. La proteína modificada genéticamente forma parte de la estructura externa en levaduras, bacterias o virus permitiendo que la modificación esté expuesta al ambiente.<sup>55</sup>

La fuente de péptidos más usada para la selección de secuencias con interacción a sólidos inorgánicos es la biblioteca de péptidos expresados en fagos. Esta biblioteca se compone de fagos modificados genéticamente, lo que permite expresar secuencias aleatorias de aminoácidos expuestas al medio. Estos fagos se generan insertando oligonucleótidos con secuencias aleatorias dentro del gen III, de tal forma que una vez expresada la proteína, el péptido insertado se encontrará expuesto sobre su superficie.

En las bibliotecas de fagos, los péptidos insertados tienen el mismo número de aminoácidos, pero diferente secuencia, donde alguna(s) puede(n) enlazarse fuertemente a un sustrato específico. En experimentos de *biopanning*, los fagos que despliegan las secuencias peptídicas son puestos en contacto con el material deseado (blanco) y después de varias eluciones, únicamente aquellos con las secuencias peptídicas de mayor afinidad quedarán enlazados. La secuencia de aminoácidos con afinidad al blanco se conoce al secuenciar el ADN proveniente del fago que las expresa y posteriormente se pueden utilizar los péptidos con dicha secuencia como plantillas para la formación de estructuras inorgánicas (biomineralización).

Sin embargo, hallar secuencias peptídicas con afinidad específica al material de interés no asegura que sea capaz de biomineralizarlo. Pero una interacción fuerte entre el péptido y el material inorgánico incrementa la posibilidad de que el péptido pueda dirigir la biomineralización. Por lo tanto, resulta un método alternativo para la síntesis de materiales, pues es una técnica relativamente sencilla que permite seleccionar secuencias, entre las  $20^n$  posibles, con una alta probabilidad de actividad biomineralizante.<sup>56</sup>

Recientemente se han hecho experimentos de selección por *biopanning* utilizando el precursor en vez del material inorgánico. Esto con la finalidad no sólo de hallar secuencias con afinidad a materiales, sino también seleccionar fagos capaces de biomineralizar in situ. De esta manera, al poner en contacto la biblioteca de fagos en la solución de reacción, sólo si existen mutantes capaces de catalizar e interaccionar con el producto de reacción serán recuperadas. Dicha variante de la técnica asegura que los fagos seleccionados son capaces de biomineralizar a partir



de un precursor, además de ser selectivos al producto inorgánico.<sup>24, 57</sup>

### **1.3 Biomineralización de $TiO_2$**

La principal limitante que se presenta al intentar imitar las síntesis inorgánicas que se dan en la naturaleza (biomimética) es el reducido número de biomoléculas conocidas capaces de biomineralizar. En principio, únicamente los materiales inorgánicos que son sintetizados por organismos vivos podrían obtenerse por biomineralización en condiciones *in vitro*. Por ejemplo, actualmente no se conoce ningún organismo capaz de biosintetizar óxido de titanio naturalmente, ni siquiera se conocen biomoléculas que interaccionen específicamente con algún precursor de titanio.<sup>58</sup>

Por esta razón se han buscado métodos que logren identificar biomoléculas capaces de tener actividad en la síntesis de materiales inorgánicos. Recientemente, usando bibliotecas peptídicas expresadas sobre el fago M13, se han encontrado secuencias de péptidos capaces de unirse a la superficie de óxido de titanio. Con esta técnica, Dickerson *et al.*<sup>59</sup> identificaron dodecapéptidos capaces de reconocer selectivamente diferentes estructuras cristalinas. Incluso, los péptidos son capaces de diferenciar entre distintos planos cristalinos de anatasa. A pesar de que dichos péptidos fueron capaces de inducir biomineralización, ninguno produjo fases totalmente cristalinas. Por otro lado, Chen *et al.*<sup>60</sup> realizaron un *biopanning* con una biblioteca de péptidos de 7 residuos sobre nanopartículas de anatasa y  $SiO_2$  hallando repetidamente en ambos casos la secuencia HKKPSKS (H1, el Apéndice 1 enlista la nomenclatura de los aminoácidos). Sin embargo, cuando se estudió la secuencia H1 y su capacidad de biomineralizar  $TiO_2$  a partir de TiBALDH, concluyen que la afinidad del péptido H1 al  $TiO_2$  es necesaria pero insuficiente para lograr una adecuada biomineralización, pues no observan fases cristalinas ni un control de la forma o tamaño.<sup>61</sup>

Por otra parte, Hernández-Gordillo *et al.*<sup>56</sup> estudiaron la biomineralización de  $TiO_2$  empleando el método sol-gel. En dicho estudio, el péptido H1 y algunas mutantes fueron utilizados como plantillas para la síntesis de  $TiO_2$  a partir de alcóxidos de titanio. Bajo condiciones adecuadas de reacción (pH, relación molar

péptido/precursor) lograron obtener nanopartículas de anatasa de 5 nm a temperatura ambiente.<sup>62</sup> Cuando se utilizaron mutantes del péptido también indujeron la formación de nanopartículas, sin embargo, no fue posible obtener nanocristales. Con estos resultados se mostró que los cambios puntuales en cada una de las mutantes modifican la interacción péptido-precursor, lo que impide la formación de productos cristalinos, debido en parte a las distintas cargas superficiales. Los péptidos utilizados en la síntesis de TiO<sub>2</sub> por biomineralización parecen actuar como heteroligandos, permitiendo controlar el tamaño, morfología y cristalinidad del material final.

Además de emplear péptidos y proteínas para biomineralizar materiales inorgánicos, los virus se ha explotado recientemente para sintetizar nanoestructuras.<sup>63</sup> La gran variedad de formas en que se ensamblan las cápsides de los virus permiten utilizarlas como plantillas. Además, como se ha mencionado, pueden modificarse química o genéticamente para adaptar sus propiedades fisicoquímicas y así obtener un mejor control en la biomineralización.

De este modo, en este proyecto se presenta la síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso usando el fago derivado del vector M13mp18, cuyas propiedades estructurales son una combinación entre las plantillas suaves y rígidas. Se intentó su modificación genética en la superficie para la inserción de péptidos con afinidad a TiO<sub>2</sub> con el objetivo de mejorar su interacción con los precursores de titanio. No obstante, las mutaciones no fueron viables, probablemente debido a una descompensación de carga en la proteína p8 lo que impidió su ensamble. A partir de esto, se empleó únicamente el fago prístino, adaptando la síntesis al ambiente químico de su cápside. Se estudiaron diversas variables para la optimización de la homogeneidad, tamaño de partícula, cristalinidad y área superficial del TiO<sub>2</sub>.

También se probó una metodología especial para el *biopanning* sobre un precursor de titanio estable en agua, obteniendo secuencias peptídicas con actividad biomineralizante. Estas secuencias podrían ser utilizadas para síntesis de TiO<sub>2</sub> cristalino a temperatura ambiente e incluso insertarlas genéticamente sobre el fago M13.

## **2 Planteamiento del problema**

### **2.1 Planteamiento del problema**

Actualmente se emplean dos tipos de plantillas para la síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso, plantillas suaves (tensoactivos) y plantillas rígidas (sólidos mesoporosos). Sin embargo, ambas plantillas presentan dificultades para su aplicación. Por ejemplo, las plantillas suaves deben formar arreglos micelares cuya estabilidad es sensible a la temperatura, pH, solvente, concentración, por lo que pueden ser destruidos al interaccionar con los precursores de titanio. Por otro lado, las plantillas rígidas permiten controlar mejor la cristalinidad y emplear rutas de síntesis a altas temperaturas y presiones. No obstante, para usar esta plantilla es necesaria sintetizarla previamente por métodos de plantilla suave, además de tener que sacrificar la plantilla mesoporosa. Resulta necesario buscar nuevas plantillas que permitan combinar las ventajas de las plantillas suaves y rígidas, y que a su vez puedan evitar las problemáticas intrínsecas de dichas plantillas. Se plantea entonces, usar el bacteriófago M13 como plantilla semi-rígida, la cual tiene una forma filamentosa estable y puede adoptar arreglos ordenados.

### **2.2 Hipótesis y objetivos**

#### **2.2.1 Hipótesis**

El fago M13 tiene una estructura filamentosa estable y su cápside está compuesta por múltiples grupos funcionales por lo que se puede emplear como plantilla para la formación de dióxido de titanio mesoporoso controlando la reactividad de los precursores de titanio bajo condiciones suaves de reacción.

#### **2.2.2 Objetivos**

##### **2.2.2.1 Objetivo general**

Sintetizar  $\text{TiO}_2$  mesoporoso utilizando el fago M13 como bioplantilla.

##### **2.2.2.2 Objetivos específicos**

- 1.- Modificar genéticamente el fago derivado del vector M13mp18 para que exprese diversas secuencias en la proteína p8.
- 2.- Hallar secuencias peptídicas capaces de biomineralizar  $\text{TiO}_2$  a través de un

*biopanning* utilizando el precursor de titanio TiBALDH.

- 3.- Probar la actividad de biomineralización de  $\text{TiO}_2$  de las secuencias peptídicas halladas en el *biopanning*.
- 4- Sintetizar y caracterizar  $\text{TiO}_2$  mesoporoso utilizando el fago derivado del vector M13mp18 como bioplantilla.

### 3 SECCIÓN EXPERIMENTAL

#### 3.1 Soluciones amortiguadoras, medios de cultivo y reactivos

Los detalles de la preparación de las soluciones amortiguadoras y medios de cultivo se presentan en el Apéndice 2.

- Sistemas amortiguadores 0.1 M (Aldrich, Amresco):

Acetatos pH 4.5: Acetato de sodio, ácido acético glacial.

Citratos pH 5.5: Citrato de sodio, ácido cítrico.

MES pH 6.0: ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES).

TRIS pH 8.0 y 9.0: Trishidroximetilaminometano (Tris).

Fosfatos (PB) pH 7.0: Fosfato de potasio, fosfato ácido de potasio.

Boratos pH 9.0: Tetraborato de sodio.

- Medios de cultivo (Invitrogen):

Luria Broth (LB)

Luria Broth Agar (LB agar)

2xYT

Top Agar

Aditivos:

Clorhidrato de tetraciclina (Aldrich)

IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) (Amresco)

X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido) (Amresco)

- Equipos y materiales para biología molecular:

Agarosa ultra pura (Invitrogen)

Polietilenglicol, masa molar aproximada de 8000 g/mol (PEG 8000, Amresco)

Solución de carga para ADN (Agilent)

Marcador de referencia de ADN 1 kpb (Agilent)

Solución reveladora de ADN GelRed (Biotium)

Marcador de referencia de proteína 14 kDa (New England BioLabs)

Solución amortiguadora TBE de corrida para electroforesis con agarosa

Solución amortiguadora de corrida SDS para electroforesis con poliacrilamida

- Kit para purificación de plásmidos:  
QIAprep Spin (QIAGEN)  
StrataPrep Plasmid (Agilent)  
QuickClean II (GenScript)
- Kit para mutagénesis dirigida:  
QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)  
Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit, (New England BioLabs)
- Kit para purificación de producto de PCR:  
QuickClean PCR Purification Kit (GenScript)
- Kit para purificación de ADN en gel:  
GenElute Gel Extraction Kit (Aldrich)
- Reactivos para reacciones inorgánicas (Aldrich):  
Isopropóxido de titanio ( $\text{Ti}(\text{iPrO})_4$ ) 97%, etanol absoluto, propanol (PrOH), isopropanol (iPrOH), acetil acetona (acac), ácido acético glacial, ácido bórico, ácido fosfórico (85%), ácido clorhídrico concentrado, agua desionizada estéril, dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH, lotes MKBP1038V y MKCC1000, almacenado a 4 °C), hidróxido de sodio, cloruro de sodio.

### **3.2 Amplificación y purificación de fago M13**

Para la amplificación del fago silvestre (derivado del vector M13mp18) y mutantes se empleó el siguiente método:<sup>64</sup>

- De un cultivo de *E. coli* (XL1-Blue) incubado durante la noche se hace una dilución 1:50 en medio 2xYT y se incuba por 2 h a 37 °C con agitación vigorosa.
- El cultivo anterior se diluye un orden de magnitud y se colocan 5.0 mL en la cantidad de tubos (cap. 50 mL) que sean necesarios.
- De un cultivo de fagos en placa (top agar), se pica cada placa a amplificar y se colocan en el tubo correspondiente, se deja reposar unos minutos antes de incubarlo por  $\geq 5$  h a 37 °C, 200 rpm. En el caso de mutantes, el tiempo de incubación no debe ser mayor a 5 h para evitar mutaciones no deseadas.
- Para amplificación a gran escala, se utiliza el sobrenadante del procedimiento anterior después de haberlo centrifugado 8000 rpm por 5 min.

- Se incuba una colonia fresca de bacteria en 5.0 mL de medio en un tubo de 20 mL estéril durante 6-8 h a 37 °C con agitación. Por cada 2.5 mL de este cultivo se agregan 0.5 mL del sobrenadante que contiene al fago, aproximadamente  $5 \times 10^{11}$  ufp (unidades formadoras de placas). Posteriormente se diluyen en 250 mL de medio previamente equilibrado a 37 °C en un matraz de 1.0 L. Incubar por 5 h a 37 °C con agitación vigorosa.
- Después de la incubación, se centrifuga a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C y se recupera el sobrenadante. Se agrega PEG para tener una concentración final de 2% y 200 mM de NaCl, se homogeniza e incuba 1 h a 4 °C. Se recolecta el precipitado centrifugando a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se redisuelve en agua o solución amortiguada y se repite la precipitación con PEG para finalmente redissolver en agua estéril.
- Posteriormente se ajusta el pH entre 4.1 y 4.4 para precipitar el fago por punto isoeléctrico. Se deja reposar una hora a 4 °C y se centrifuga a 8000 rpm por 5-8 minutos. Se descarta el sobrenadante para redissolver el precipitado en agua estéril ajustando el pH a 7 con NaOH diluido. La solución se almacena a 4 °C.
- Para el caso de amplificación de fago silvestre M13 derivado del vector M13mp18 se mejora el rendimiento a gran escala incubando durante toda la noche ( $\geq 16$  h) a 32 °C en medio 2xYT.

### **3.3 Cuantificación del fago M13**

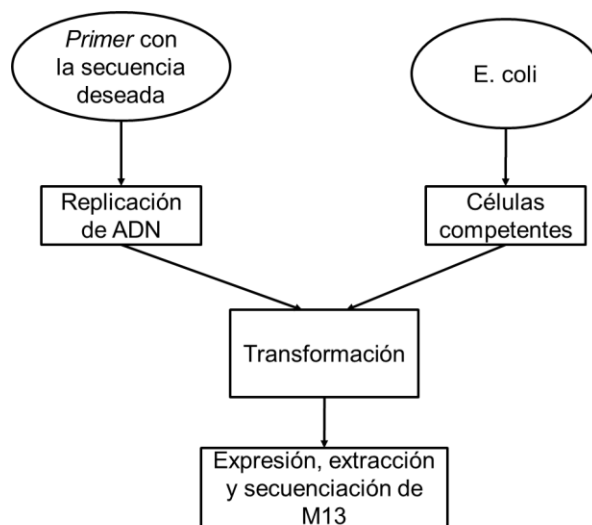
Para determinar la concentración del fago silvestre y modificado se empleó la espectroscopía UV-vis, considerando que la cápside y el ADN que conforman el fago presentan juntos un coeficiente de absortividad a 269 nm de  $3.84 \text{ cm}^2 \cdot \text{mg}^{-1}$ .<sup>65</sup> También se utilizó un método de titulación (método de Miles y Misra) para cuantificar el número de fagos con actividad infectiva. Este método se empleó para el proceso de *biopanning*, pues la cantidad de fago para cada etapa es inferior a la detectable por espectrofotometría UV-vis. El método de titulación de fagos se realizó conforme al protocolo del *biopanning*,<sup>66</sup> en el cual se cultivan bacterias junto con diluciones (un orden de magnitud de diferencia entre ellas) de la solución del fago en Top Agar sobre una caja Petri de LB Agar y posteriormente se cuentan las placas para dar el

número de unidades formadoras de placas (ufp). El número de ufp son los fagos que presentan actividad para infectar a las bacterias. La presencia de IPTG y X-Gal induce la formación de placas azules lo que permite una mejor identificación de las placas, además de asegurar que no existen fagos silvestres, pues las placas que forma el fago silvestre no se tiñen de azul.

### 3.4 Modificación genética del fago derivado del vector M13mp18

Los detalles sobre las técnicas de biología molecular usadas en este trabajo se pueden consultar en el Apéndice 2.

En la Tabla 3.1 se enlistan los *primers* utilizados para las diversas rutas de mutagénesis. Se propusieron dos secuencias a insertar, H1 (HKKPSKS) y H3 (HHHPSHS). La serie de pasos para la modificación genética se muestra en la Figura 3.1.



**Figura 3.1.** Diagrama de flujo con los pasos realizados para la modificación genética del fago derivado del vector M13mp18.

El primer experimento de mutagénesis para la inserción de la secuencia H1 fue usando los *primers* F-H1 y R-H1, donde la inserción se realizó entre los residuos 4 y 5, la región de la proteína p8 que está más expuesta al solvente.

De manera paralela se emplearon dos rutas para la inserción de ambas secuencias



(H1 y H3). La primera consiste en la inserción de la secuencia entre los residuos 4 y 5 además de sustituir el nucleótido T por A en la posición 1371 para insertar un sitio de restricción PstI (F-InsH1 y F-InsH3). La segunda ruta consistió en insertar la mutación entre los residuos 2 y 5 al mismo tiempo que se sustituye los residuos 3 y 4 evitando así un aumento excesivo del número de residuos en la proteína, también se insertó el sitio de restricción PstI (F-SustH1 y F-SustH3).

Por otro lado, para confirmar que la metodología de mutagénesis es adecuada, se propuso mutación puntual que asegure su viabilidad. Se realizó únicamente la modificación de un nucleótido para insertar un nuevo sitio de restricción PstI (F-PstI y R-PstI). La identificación de las mutantes con el nuevo sitio de restricción se hizo por digestión con PstI y gel de agarosa. Después de digerir los vectores con la enzima PstI, deben aparecer dos fragmentos del ADN en el gel, siempre y cuando el nuevo sitio de restricción esté presente.

Además de la posición de inserción para la secuencia deseada, el diseño de los *primers* también fue modificado. En el caso de los experimentos usando el kit de mutagénesis Q5, se emplearon *primers* no complementarios para evitar la interacción entre ellos de sus bases complementarias. Esto mejora la eficacia de la PCR, asegurando que la replicación contiene la mutación deseada. Para estos experimentos, la mutación está dividida en dos, la mitad de la mutación en cada *primer* (F-Q5 y R-Q5).

El procedimiento general seguido para la modificación genética del fago derivado del vector M13mp18 fue el siguiente:

- Mutagénesis del vector de interés (PCR con M13mp18, digestión, purificación y ligación en caso de que aplique)
- Preparación de células competentes (*E. coli* cepa XL1-Blue)
- Transformación con el producto de mutagénesis
- Expresión del fago de las placas formadas (clones) por amplificación en *E. coli*.
- Extracción y secuenciación del plásmido
- En caso de tener la mutación, replicación y purificación del fago a gran escala.

**Tabla 3.1.** *Primers* utilizados para mutagénesis. La mutación se muestra en negritas y entre paréntesis la posición del nucleótido adyacente.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Residuos	Descripción
M13 Silvestre	GCT GAG GGT GAC(1381) GAT CCC GCA AAA GCG...	AEGDDPAKA ...	Secuencia inicial de la proteína p8 (madura)
F-H1	GCT GAG GGT GAC <b>CAT</b> <b>AAG AAG CCA TCT AAG</b> <b>TCT</b> (1382)GAT CCC GCA AAA GCG	AEGD <b>HKKPS</b> <b>KSDPAKA</b>	Inserción de la secuencia H1 entre los residuos 4 y 5
R-H1	CGC TTT TGC GGG ATC <b>AGA CTT AGA TGG CTT CTT</b> <b>ATG</b> GTC ACC CTC AGC	-	Secuencia complementaria a F-H1
F-InsH1	AT ATA TCT GC(1371) <b>A</b> GAG GGT GAC(1381) <b>CAT AAG</b> <b>AAG CCA TCT AAG TCT</b> GAT CCC GCA AAA GCG	AEGD <b>HKKPS</b> <b>KSDPAKA</b>	Inserción de la secuencia H1 entre los residuos 4 y 5 además del cambio de T por A en la posición 1372 para añadir el sitio de restricción PstI
F-SusH1	AT ATA TCT GC(1371) <b>A</b> GAG(1375) <b>CAT AAG AAG</b> <b>CCA TCT AAG TCT</b> GAT CCC GCA AAA GCG	AE <b>HKKPSKS</b> DPAKA	Inserción de H1 se entre los residuos 2 y 5 para sustituir los residuos 3 y 4, de esta manera evitar un aumento excesivo de residuos en la p8. Se inserta también el sitio de restricción PstI.
R-L2	<b>GGA AGC</b> TGC AGC GAA AGA CAG CAT	-	Región complementaria al plásmido de la posición 5872 a la 5895
F-Q5	<b>CCC TCT CAT TCT</b> (1382)GAT CCC GCA AAA GCG GCC	<b>PSHSDPAKAA</b>	La inserción de la secuencia HHHPSHS fue entre los residuos 2 y 5 (E y D) de la proteína p8, lo que provoca la eliminación de los residuos 3 y 4 (G y D). El cambio de A por T en el sitio 5878 fue para tener un sitio de restricción para PstI.
R-Q5	<b>ATG ATG ATG</b> CTC TGC AGC GAA AGA CAG CAT CG	MLSFAAE <b>HH</b> <b>H</b>	
F-InsH3	AT ATA TCT GCA GAG GGT GAC <b>CAT CAT CAT CCC TCT</b> <b>CAT TCT</b> GAT CCC GCA AAA GCG	AEGD <b>HHHPS</b> <b>HSDPAKA</b>	Inserción de la secuencia HHHPSHS entre los residuos 4 y 5
F-SusH3	AT ATA TCT GCA GAG <b>CAT</b> <b>CAT CCC TCT CAT TCT</b> GAT CCC GCA AAA GCG	AE <b>HHHPSHS</b> DPAKA	Inserción de la secuencia HHHPSHS entre los residuos 2 y 5, sustituyendo los residuos 3 y 4.
F-PstI	G CTG TCT TTC GCT GC(1371) <b>A</b> GAG GGT G	SFAAEGD	Sustitución de un solo nucleótido para obtener un sitio de restricción para PstI sin modificar la secuencia de la proteína.
R-PstI	C ACC CTC TGC AGC GAA AGA CAG C	-	Cadena complementaria a la F-PstI.

### 3.5 *Biopanning*

- Estabilidad del dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH)

Antes de realizar el *biopanning* con el TiBALDH, se realizó un estudio de estabilidad del complejo de titanio para asegurar el éxito del experimento. Se prepararon diluciones por triplicado de TiBALDH, desde 2.0 M hasta 10 mM. Todas las soluciones fueron incubadas a temperatura ambiente al menos 24 h y analizadas por dispersión dinámica de luz (DLS).

Para el estudio de la estabilidad en diferentes medios, se prepararon soluciones de TiBALDH 50 mM junto con los siguientes sistemas amortiguadores (0.1 M): acetato de sodio pH 4.5, citrato de sodio pH 5.5, MES pH 6.0, fosfato de sodio (PB) pH 7.0, Tris pH 8.0. Y también se usaron otros sistemas inorgánicos no amortiguados (0.1 M): ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), sulfato de sodio ( $Na_2SO_4$ ), nitrato de sodio ( $NaNO_3$ ) y cloruro de sodio ( $NaCl$ ). Para estudiar el efecto del pH se ajustaron soluciones acuosas de TiBALDH: una solución a pH 4.0 con ácido clorhídrico 2.0 M y otra a pH 8.5 con hidróxido de sodio 2.0 M. Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente se midió el tamaño de partícula de todas las soluciones por DLS. Los experimentos fueron por triplicado.

Se cuantificó el Ti(IV) soluble usando un método colorimétrico con Tiron (ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencenodisulfónico). Después de 5 días de incubar las soluciones de TiBALDH 50 mM en los diferentes medios, se mezclaron 10  $\mu$ L de cada solución junto con 190  $\mu$ L de una solución de Tiron 5.0 mM en sistema amortiguado de acetatos pH 4.5. Se dejaron 24 h en reposo para alcanzar el equilibrio, se midió la absorbancia a 380 nm en un NanoDrop (paso óptico 1.0 mm) y se comparó la absorbancia de cada solución con la del TiBALDH 50 mM en agua pura.

- *Biopanning*

La metodología para la selección de fagos con actividad biomineralizante se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante de las bibliotecas de péptidos expresados en fagos de 12 y 7 residuos (New England BioLabs, Ph. D. Phage Display Libraries), modificando la sección del material objetivo:<sup>57</sup>

1. Agregar el volumen de la biblioteca de fagos equivalente a 100 veces menos el número de clones de la biblioteca ( $10^{11}$  ufp) a una solución de 0.5 mL de TiBALDH 50 mM, en agua o solución amortiguadora 0.1 M. Mezclar agitando suavemente y dejar reaccionar por 5 días.
2. Centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos, descartar sobrenadante.

3. Lavar el precipitado 3 veces con 0.5 mL de la solución amortiguadora con 0.1% de Tween 20.
4. Eluir los fagos con 1.0 mL de solución amortiguadora de elución (0.2 M glicina-HCl pH 2.2, 1.0 mg/mL BSA) durante 15 minutos y posterior centrifugación, recuperación del sobrenadante y neutralización con 0.15 mL de solución amortiguadora de Tris 1.0 M pH 9.1.
5. Titular eluato.
6. Amplificar el resto del eluato en un cultivo de 20 mL de ER2738 (dilución 1:100 de un cultivo incubado durante la noche). Incubar 4.5 h a 37 °C, 200 rpm.
7. Centrifugar a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Transferir el 80% de sobrenadante más 1/6 de solución de PEG-NaCl (20% de PEG y 2.5 M de NaCl). Dejar reposar toda la noche a 4 °C.
8. Centrifugar el sobrenadante a 8000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Descartar el sobrenadante.
9. Resuspender el precipitado en 1.0 mL de Tris. Transferir a un tubo para microcentrífuga y centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos a 4 °C para separar residuos celulares. Transferir el sobrenadante en otro tubo para microcentrífuga y añadir 1/6 de PEG. Incubar 1 h a 4 °C. Centrifugar y descartar sobrenadante.
10. Resuspender nuevamente en 0.2 mL de Tris, titular.
11. Repetir dos veces los pasos 1 al 9 (ciclo de *biopanning*) utilizando la solución del paso 10. En el último ciclo, la concentración de Tween 20 se duplica y no es necesaria la titulación del eluato.
12. Amplificar cada eluato y titular para su posterior selección de clones (20 por cada experimento).
13. Amplificar cada clon seleccionado, purificar ADN de doble cadena con el kit de purificación y secuenciar.

Todas las secuenciaciones de ADN fueron realizadas por Eurofins MWG Operon (Louisville, KY).

### **3.6 Biomineralización de $TiO_2$ usando péptidos**

Se eligieron los péptidos TN (TNWQALAYMQRH) y EN (ENHWSLSTLMSS) obtenidos del *biopanning*. Los péptidos (pureza  $\geq 96\%$ ) fueron sintetizados por Biomatik (USA). La solución

inicial del péptido fue de 5.0 mg/mL en agua estéril. Se prepararon soluciones de TiBALDH 50 mM con diferentes concentraciones de péptido para determinar la concentración óptima. Se emplearon dos sistemas amortiguadores, Tris y acetatos 100 mM. Después de incubar las soluciones por 24 h se recuperó el producto por centrifugación y se lavó una vez con la solución amortiguadora respectivo y dejó secar a temperatura ambiente. Se caracterizó por DLS, microscopía electrónica y espectroscopia infrarroja.

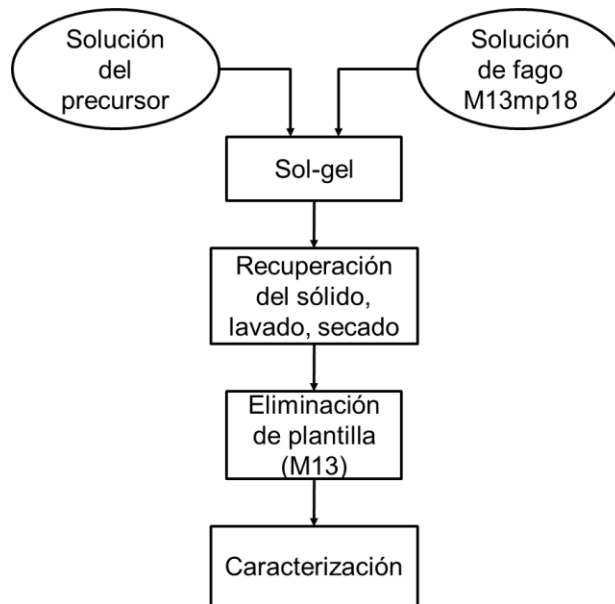
Para determinar la cantidad de  $\text{TiO}_2$  biomineralizado se cuantificó el Ti(IV) soluble por colorimetría utilizando Tiron (ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencenodisulfónico). Debido a que la técnica es muy sensible, se prepararon muestras de TiBALDH 5.0 mM, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para biomineralización. Todas las muestras fueron monitoreadas durante 5 días para asegurar que la reacción fuera completa.

### **3.7 Síntesis de $\text{TiO}_2$ mesoporoso**

Al emplear el método sol-gel se consideraron las siguientes variables:

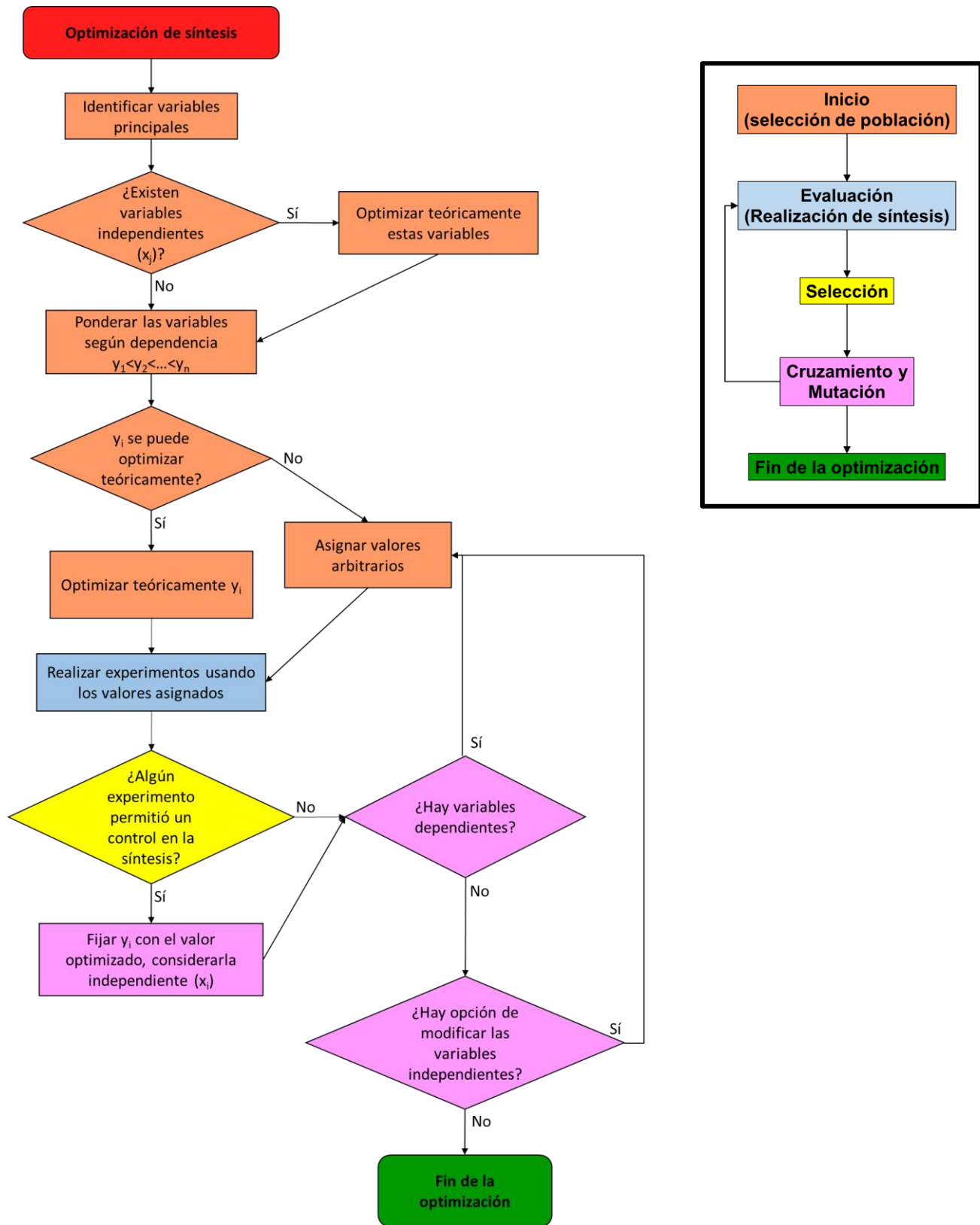
- Precursor de titanio
- Relación molar Ti:M13
- Solvente
- Relación molar Ti:cosolvente
- pH
- Concentración del fago M13

Aunque a bajas temperaturas se puede controlar la reactividad de los alcóxidos de titanio, en esta metodología la temperatura no se tomó como variable. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente para simplificar la metodología. El método general para la síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso se muestra en la Figura 3.2.



**Figura 3.2.** Esquema de la síntesis y caracterización de TiO<sub>2</sub> mesoporoso usando el fago M13.

Al existir tantas variables, se propuso un método sistemático para optimizar las condiciones experimentales sin necesidad de probar combinaciones de parámetros excesivas. Este método, basado en el algoritmo genético, se detalla en la Figura 3.3.



**Figura 3.3.** Diagrama de flujo que describe el método para optimizar la síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso considerando las variables más importantes en la reacción. En el recuadro se resumen los pasos más importantes del algoritmo genético.

### 3.7.1 Precursores de TiO<sub>2</sub>

Se eligieron los alcóxidos y el lactato de titanio para emplearlos como precursores para la síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso. Los alcóxidos propuestos fueron el etóxido, propóxido, isopropóxido y butóxido de titanio. Como lactato de titanio se empleó el reactivo comercial dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH, 50% en agua).

#### 3.7.1.1 Isopropóxido de titanio

De acuerdo con la Figura 3.2, para la solución del precursor de titanio se utilizó una mezcla de isopropóxido de titanio:etanol con una relación molar entre 1:1000 a 1:100 (31 mM a 310 mM respectivamente), la cual se añadió en agitación gota a gota a la solución del fago con una concentración inicial desde 0.05 mg/mL a 6.0 mg/mL. Se dejó en agitación por 10 minutos, se centrifugó a  $\geq 12000$  rpm durante 10 minutos y se secó a temperatura ambiente para posteriormente calcinar a 500 °C durante 2 h usando una rampa de calentamiento de 1 °C/min. La solución del fago se mantuvo a pH neutro, mientras que la solución alcohólica fue acidificada con HCl concentrado.

A continuación, se detalla cada una de las consideraciones tomadas a partir del diagrama de flujo de la Figura 3.3.

❖ Asignación de variables:

Cosolvente, contraiones, pH, relación molar Ti:p8, concentración del fago M13, relación molar Ti:cosolvente.

❖ Variables independientes:

- Cosolvente

El cosolvente utilizado para retardar la reacción del alcóxido (principalmente la hidrólisis) generalmente es el alcohol derivado de su grupo alcoxi, por lo que al usar isopropóxido de titanio lo común es utilizar isopropanol. Aunque el fago es bastante resistente a diversos tipos de ambientes químicos, es más resistente al etanol respecto al isopropanol, por lo que se empleó únicamente etanol para las reacciones con el isopropóxido de titanio. La concentración máxima de etanol para las reacciones fue del 50%, considerando que esa concentración es el límite para mantener al fago ensamblado.

- Contraiones (sistemas amortiguadores)

En el caso de las reacciones con alcóxido no se utilizaron soluciones amortiguadoras, pues impiden un buen control de la reactividad del precursor.<sup>56</sup>



- pH

El pH ácido ayuda a la solubilidad de las especies de titanio permitiendo un control en la condensación de las redes de  $\text{TiO}_2$ , por lo que se optó trabajar en condiciones ácidas. Por otro lado, los fagos M13, por su punto isoelectrónico, sólo pueden interactuar favorablemente para adoptar arreglos ordenados en ambientes con pH entre 4.7 y 5.5 (Figura 1.5). Tomando esto en cuenta, se optó por acidificar la solución del alcóxido con ácido clorhídrico concentrado y mantener la solución del fago a pH neutro de tal manera que la combinación de las soluciones diera un pH final dentro del intervalo de organización del fago. Bajo estas condiciones se asegura que las especies de titanio en medio ácido (con carga positiva) interactúen favorablemente con las proteínas p8 del fago (cargadas negativamente a  $\text{pH} > 4.3$ ).

- ❖ Variables dependientes:

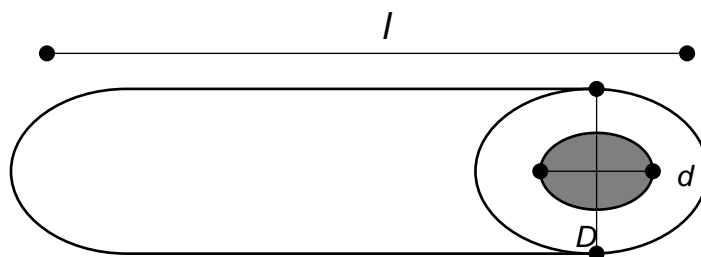
- Relación molar Ti:M13, Ti:p8

La relación molar teórica de Ti:M13 se obtuvo considerando el área superficial del virus derivado del vector M13mp18 y el espesor de la pared del mesoporo deseado (Figura 3.4).

El área superficial del virus se calculó suponiendo una geometría cilíndrica y sin considerar los extremos:

$$A = \pi dl$$

Donde  $A$  es el área del virus,  $d$  es su diámetro (6.5 nm) y  $l$  es la longitud del virus (995 nm). El espesor de la pared mesoporosa para dicho cálculo fue de 10 nm, el cual asegura una buena estabilidad térmica.<sup>67</sup>



**Figura 3.4.** Diagrama del poro que formaría el fago, donde la longitud ( $l$ ) corresponde a la longitud del fago, el diámetro del poro ( $d$ ) es igual al diámetro del fago y el diámetro del poro considerando las paredes ( $D$ ) es la suma del espesor de las paredes más el diámetro del fago.

Por lo tanto, el volumen de  $\text{TiO}_2$  que recubrirá a cada fago se calculó con la siguiente ecuación:

$$V = \frac{\pi l}{4} (D^2 - d^2)$$

Donde  $D$  es el diámetro del poro considerando el espesor de la pared de  $\text{TiO}_2$ , 26.5 nm. Lo cual da una cantidad de  $5.1 \times 10^{-22} \text{ m}^3$ , que es equivalente a  $14.7 \times 10^6$  moléculas de  $\text{TiO}_2$  en fase anatasa ( $3.8 \text{ g/cm}^3$ ). Por lo tanto, la relación molar máxima Ti:M13 será  $14.7 \times 10^6:1$ . O bien, como hay 3150 proteínas p8 por cada fago M13mp18, la relación molar Ti:p8 será de  $4.6 \times 10^3:1$ . Para que la relación molar sea comparable con los valores en la literatura, se empleará únicamente la relación Ti:p8, donde cada p8 podría considerarse una molécula de tensoactivo que forma parte de una micela (en este caso, el fago).

El análisis cualitativo de titanio en la solución de reacción se llevó a cabo por espectrofotometría utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se coloca un volumen pequeño de la muestra (0.5-2.0  $\mu\text{L}$ ) entre dos fibras ópticas fijando un paso óptico de 1 mm. Las especies de Ti(IV) tienen gran absorptividad a 400 nm por lo que el paso óptico es ideal para este análisis.

- Concentración del fago M13

A pesar de que a concentraciones altas los fagos se ordenan con arreglos esmécticos a concentraciones superiores a 2.59 mg/mL, en la reacción también se exploraron concentraciones más bajas debido a la alta reactividad del alcóxido de titanio en presencia del fago. La concentración del fago es dependiente de la relación molar Ti:p8.

- Relación molar Ti:cosolvente

Como ya se mencionó, el solvente elegido para la solución del precursor fue el etanol, por lo que la relación molar se designará como Ti:OH. Esta relación molar depende de la concentración del fago, ya que, a mayor concentración del fago la cantidad de alcohol para tener una concentración del 50 % v/v es menor. Para la síntesis, se tomó la relación molar Ti:OH máxima soportada por el fago, que depende de la concentración del fago y de la relación molar Ti:p8.

### 3.7.1.2 Dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH)

Para formar el gel, se mezcló TiBALDH con la solución de fago para tener una concentración final de 0.3 M. Se ajustó el  $\text{pH} \geq 11$  con hidróxido de sodio (5 M) con agitación vigorosa. Se dejó reposar 24 h para consolidar el gel, posteriormente se secó a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  y calcinó a  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  por 4 h.

Los detalles de las variables consideradas se presentan a continuación:

- Relación molar Ti:p8

De la misma manera que para el isopropóxido de titanio, la relación molar teórica para la formación de mesoporos fue de Ti:p8 de  $4.6 \times 10^3:1$ .

- Solvente

El precursor es muy estable en ambientes acuosos, pero la presencia de solventes menos polares como el etanol promueve la condensación del TiBALDH. Por esta razón, todas las reacciones con este precursor fueron sólo en presencia de agua, lo cual evita también la desnaturalización del fago.

- Contraiones (sistemas amortiguadores)

Dos sistemas amortiguadores fueron utilizados para la síntesis de  $\text{TiO}_2$  con TiBALDH, fosfatos a pH 7.0 y tetraboratos a pH 9.0.

- pH

El pH fue ajustado con hidróxido de sodio 5 M para un valor  $> 10$ .

### **3.8 Caracterización de los óxidos**

#### **3.8.1 Microscopía de transmisión electrónica y difracción de electrones**

El tamaño y cristalinidad de las partículas de  $\text{TiO}_2$  fue estudiado por microscopía de transmisión electrónica (TEM) y difracción de electrones usando un microscopio de transmisión electrónica (JEOL 2010). Las muestras fueron preparadas usando rejillas de cobre cubiertas con carbono tipo B (para baja resolución) o con carbono hueco (para alta resolución) y malla de 300. Fueron preparadas mezclando una pequeña cantidad de la muestra en agua y añadiendo 2-3  $\mu\text{L}$  de ésta sobre la rejilla dejando secar al aire.

#### **3.8.2 Dispersión dinámica de luz**

También se empleó un equipo de dispersión dinámica de luz (ZetaSizer Nano ZSP, Malvern Instruments) para determinar tamaños de partícula a  $25^\circ\text{C}$  en agua. Por medio de la ecuación de Stokes-Einstein se relaciona el radio hidrodinámico con el coeficiente de difusión de las partículas. El coeficiente de difusión se calcula a partir de la dispersión dinámica de un haz de luz ( $\lambda=633\text{ nm}$ ) debido al movimiento browniano de las partículas en solución. El método fue optimizado automáticamente por el software para cada muestra, a excepción de las mediciones de TiBALDH en agua cuya posición del haz fue de 4.65 mm. El tratamiento de datos fue con el modo "general purpose" del software. Todos los resultados que se presentan fueron obtenidos a partir de la distribución del tamaño por intensidad.

### 3.8.3 Difracción de rayos X

Para conocer si el TiO<sub>2</sub> sintetizado era cristalino se utilizó la difracción de rayos X. Se utilizó un equipo Bruker D8 Advance con radiación CuK<sub>α</sub> (λ=1.54 Å) y un paso de 0.02° y t=7 s, los datos se adquirieron entre 10-70° en 2θ.

El tamaño de cristal de los sólidos de TiO<sub>2</sub> se calculó utilizando la ecuación de Scherrer:

$$\varepsilon = \frac{K\lambda}{b\cos\theta}$$

Donde ε es el diámetro medio del cristal, K es la constante de Scherrer (con valor de 0.9), λ es la longitud de onda de la radiación de rayos X, b es el ancho del pico de difracción a media altura (en radianes) y θ es el ángulo de Bragg.

También se empleó la difracción de rayos X a ángulo bajo para determinar si los mesoporos en las muestras tenían un arreglo periódico. La medición se hizo con el equipo Bruker D8 Advance con un intervalo de 0.6 a 7° en 2θ, un voltaje de 30 kV y una corriente de 30 mA.

### 3.8.4 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

Para conocer qué tipos de enlaces o grupos funcionales hay en la muestra, se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Las muestras se midieron en un equipo Perkin Elmer modelo Spectrum GX con un aditamento para reflectancia total atenuada GladiATR (Pike Tec.). El intervalo de medición fue de  $\tilde{\nu}$  4000-300 cm<sup>-1</sup>, resolución de 4 cm<sup>-1</sup>, y promediando ocho mediciones.

### 3.8.5 Análisis térmico gravimétrico y calorimetría diferencial de barrido

La pérdida de peso respecto a la temperatura y el comportamiento térmico de las muestras se analizó con ayuda de un equipo de análisis térmico gravimétrico y calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC) Pyris Diamont (Perkin Elmer). La velocidad de calentamiento fue desde 1 a 10 °C/min de 25 °C hasta 1000 °C con flujo de aire usando una celda de platino.

### 3.8.6 Adsorción de nitrógeno

Para determinar el área superficial específica de los materiales se empleó la técnica de adsorción de nitrógeno isotérmico con un equipo Micromeritics ASAP 2020. La muestra se degasificó en vacío antes de la medición (12 horas a 373 K). A 77 K se mide la cantidad de nitrógeno adsorbido (y posteriormente desorbido) de la muestra en función de la presión relativa del nitrógeno. La distribución del tamaño de poro se determinó usando el algoritmo NLDFT<sup>68</sup> en el software Autosorb 1 (Qantachrome). El área superficial específica se calculó usando el método BET (Brunauer, Emmett y Teller),<sup>69</sup> tomando los volúmenes adsorbidos entre 0.01 y 0.25 de presión relativa.

Los detalles de los tipos de isothermas de adsorción-desorción y su relación con la estructura del material pueden consultarse en el Anexo 4.

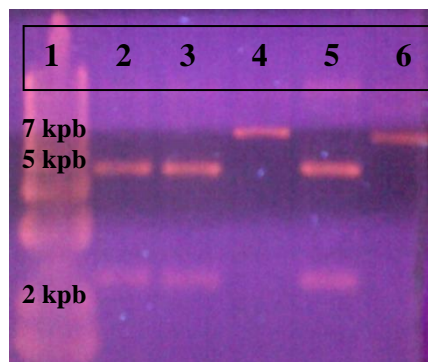
## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Modificación genética del fago M13mp18

#### Mutagénesis

Con el objetivo de insertar genéticamente la secuencia de ADN que codifica al péptido H1 (HKKPSKS) para expresarlo en la proteína p8 del fago, se realizaron múltiples variantes de mutagénesis (PCR), usando distintos tipos de polimerasas y *primers*. Los productos de mutagénesis fueron cuantificados y purificados por gel de agarosa y espectroscopía UV para asegurar la calidad del ADN. A pesar de haber transformado dichos productos de mutagénesis, siempre se obtuvieron resultados negativos para la inserción de la secuencia peptídica H1. Aunque hubo formación de placas (presencia de fagos viables) en los cultivos con células transformadas, éstas resultaron ser siempre de fagos derivados del vector M13mp18 prístino. Una de las posibles explicaciones para la nula modificación genética es la pérdida de viabilidad biológica en el ensamble de la proteína p8. Después de realizar una exhaustiva búsqueda de reportes con mutaciones similares, se encontró que en varios trabajos evitan el uso de lisina para modificar el extremo N-terminal de la proteína principal. Esto debido a que el otro extremo (C-terminal) tiene 4 residuos de lisina los cuales interaccionan electrostáticamente con los fosfatos del ADN del fago, lo cual implica que el ensamble de la proteína depende principalmente de fuerzas electrostáticas entre las cargas positivas de ese extremo y las negativas de la cadena de ADN.<sup>70-77</sup> Por otro lado, también los codones pueden afectar la expresión de la proteína en la bacteria. En *E. coli* los dos codones para lisina AAG y AAA tienen una relación de frecuencia de 1:3 respectivamente, por lo que la elección de los codones para lisina en los *primers* para la mutagénesis pudo haber influido en la expresión de la proteína.<sup>78</sup> En contraste, el uso de homonucléotidos puede ser contraproducente en la transcripción, como lo es también un exceso de un mismo aminoácido, donde la disponibilidad de RNA de transferencia limita su síntesis (tal es nuestro caso, dos lisinas son contiguas en la secuencia H1 y un mismo residuo se repite 3 veces).<sup>77, 79</sup> Debido a lo anterior y con base en la literatura<sup>56</sup>, se optó por sustituir los residuos de lisina por histidina (de HKKPSKS a HHHPHS). Ya que la histidina tiene un pK<sub>a</sub> cercano a 7 y en la bacteria *E. coli* existe un ambiente ligeramente básico, por lo que los residuos no estarían cargados positivamente y los fagos podrían ser viables.<sup>77</sup>

Después de emplear estas nuevas consideraciones para la inserción del péptido H3 (HHHPSHS) a partir de los *primers* mencionados y asegurar que el producto de mutagénesis no contenía ADN de fago silvestre por medio de la purificación en gel de agarosa de los fragmentos digeridos con PstI, los resultados nuevamente fueron negativos. De manera similar a los experimentos iniciales, a pesar de haber formación de placas, no presentaron mutación. Como prueba de que la mutagénesis era exitosa y descartar su influencia en el producto de transformación, se propuso insertar el sitio de restricción PstI, el cual podría ayudar a identificar a las mutantes. Se realizó una mutagénesis únicamente para cambiar el nucleótido A por T en el sitio 1372 y posteriormente con la enzima PstI comprobar la sustitución. En la Figura 4.1 se muestra el gel de agarosa de 4 clones purificados después de la transformación, donde los clones de los carriles 2, 3 y 5 fueron cortados por la enzima en dos regiones del vector, por lo que se observan dos bandas, una de 2347 pb y la otra de 4902 pb; mientras que el clon del carril 4 sólo fue cortado una vez y aparece la única banda correspondiente a 7249 pb, es decir, el tamaño original. Este nuevo vector con dos sitios de restricción PstI podría servir como plantilla de mutagénesis. Este vector se podría emplear para distinguir entre fago silvestre y los genéticamente modificados sin necesidad de secuenciar el gen, logrando descartar rápidamente secuencias no viables.



**Figura 4.1.** Gel de agarosa de plásmidos purificados a partir de placas formadas después de una transformación. En el carril 1, marcador 1 kpb; carril 2-5 clones 1-4 después de digerir con PstI; carril 6, clon 3 sin digerir.

La limitante al modificar genéticamente la cápside del fago recae, por lo tanto, en la secuencia a insertar, pues no hay una manera de asegurar que la mutación propuesta será viable. Así, es importante considerar el número de cargas positivas en los residuos a insertar sin olvidar que deben ser capaces de biomineralizar  $\text{TiO}_2$ .

## 4.2 *Biopanning*

Hasta ahora, todas las secuencias reportadas afines a  $\text{TiO}_2$  y/o con actividad biomineralizante tienen al menos un residuo básico (R, H, K) y su carga está íntimamente relacionada con el rendimiento de biomineralización de  $\text{TiO}_2$ .<sup>80-85</sup> Si se quisiera utilizar el fago M13 modificado genéticamente para que exprese esas secuencias, es necesario tener en cuenta que los residuos con carga positiva en el extremo N-terminal de la proteína p8 del fago impiden su viabilidad biológica. Además, existe una alta probabilidad de que en la identificación de nuevas secuencias afines a  $\text{TiO}_2$  los péptidos estén constituidos de residuos básicos debido a la gran densidad electrónica de los átomos de oxígeno sobre la superficie del óxido. Esto reduce la posibilidad de adaptar genéticamente la cápside del fago M13 para su uso como plantilla en la síntesis de  $\text{TiO}_2$ .

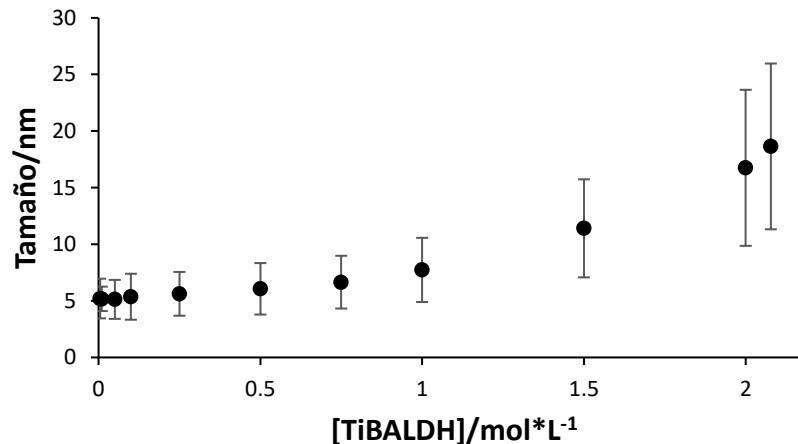
Por lo tanto, es necesario buscar métodos que ayuden a identificar secuencias peptídicas con pocos o ningún residuo básico, lo que permitiría insertarlo genéticamente en el fago M13 para su uso en biomineralización. Para esto se utilizó una metodología alterna para identificar secuencias peptídicas biomineralizantes a partir de un *biopanning*. En vez de utilizar  $\text{TiO}_2$  como material objetivo (blanco), usamos el precursor TiBALDH para promover la formación de nanopartículas de óxido de titanio. El uso de este precursor como blanco, permite identificar secuencias que tengan actividad de biomineralización además de ser afines al material final. Así, si se forman partículas de  $\text{TiO}_2$ , será un indicativo de que existen fagos con secuencias que catalizan la reacción, las cuales podrán interaccionar también con las partículas formadas. Dichos fagos se podrán recuperar de la solución acuosa por centrifugación para posteriormente secuenciar su ADN y conocer las secuencias peptídicas expresadas sobre el fago. Con esta metodología se puede asegurar que las secuencias obtenidas del *biopanning* tienen actividad de biomineralización con TiBALDH además de tener una gran probabilidad de ser viables biológicamente cuando se expresen en la proteína p8, pues se restringe el problema de las cargas positivas al no emplear el óxido de titanio como material de partida.

### 4.2.1 Estudio de estabilidad del TiBALDH

Antes de realizar el *biopanning*, fue necesario estudiar el comportamiento del TiBALDH bajo diversas condiciones y así elegir las más adecuadas para el sistema. En primer lugar, se estudió su comportamiento en agua utilizando dispersión dinámica de luz (DLS).

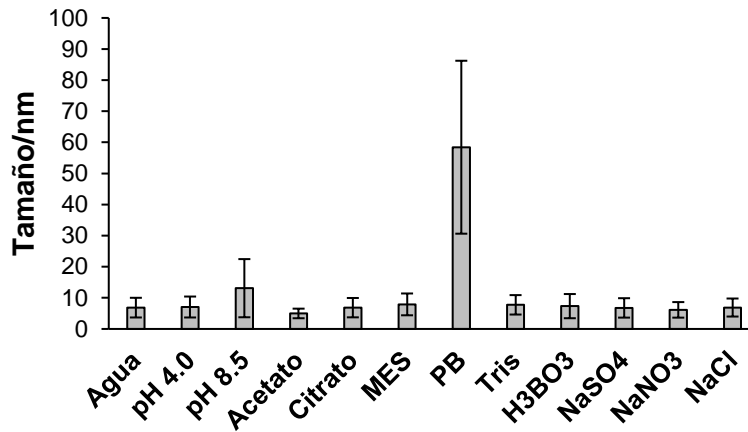


Al medir el tamaño de partícula de soluciones acuosas de TiBALDH a diferentes concentraciones se observa una disminución del tamaño de partícula a medida que se diluye el reactivo. El TiBALDH al 50 % (2.078 M) contiene partículas con tamaño promedio de 18.6 nm y cuando se diluye, el tamaño de partícula decrece hasta llegar a un mínimo de 5.1 nm, Figura 4.2. Una posible explicación a esta variación de tamaño de partícula es que se forman distintos complejos de lactato-titanio dependiendo de su concentración (polimerización). Esto también podría explicar el por qué a partir del reactivo comercial, al 50 % en agua, no se puede obtener un sólido por evaporación, pues a medida que se concentra, se polimeriza para generar complejos cada vez más grandes (su viscosidad intrínseca aumenta), formando una red macroscópica del complejo que impide la evaporación total del solvente. La concentración, por lo tanto, es un factor muy importante para la reactividad del TiBALDH. De la Figura 4.2, se puede notar que a concentraciones  $\leq 100$  mM ya no hay variación en el tamaño de la partícula, por lo que se eligió como concentración estándar 50 mM.



**Figura 4.2.** Variación del tamaño de partícula de TiBALDH respecto a su concentración en agua.

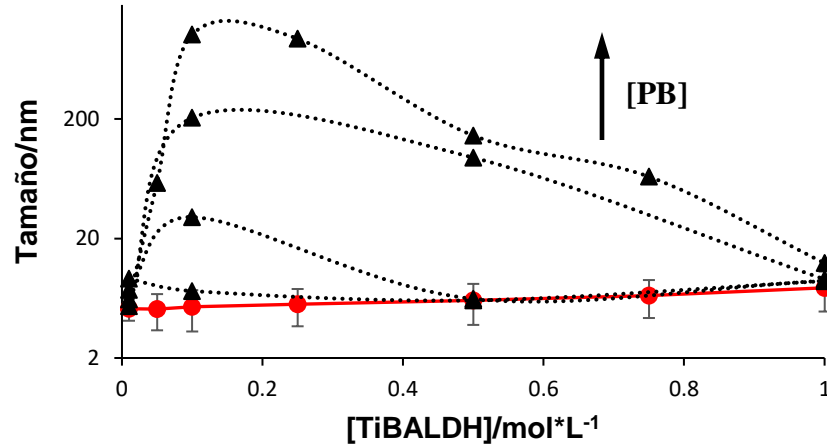
Con el fin de asegurar que el medio de reacción fuera óptimo para los experimentos de *biopanning* y evitar falsos positivos, se procedió a estudiar la estabilidad del TiBALDH en presencia de diversos sistemas amortiguadores, aniones inorgánicos y pH. La estabilidad se estudió también a partir de la variación del tamaño de partícula por DLS. Los resultados de reactividad con los diferentes sistemas amortiguadores se muestran en la Figura 4.3, donde los únicos sistemas que presentaron una variación en el tamaño de partícula del TiBALDH fueron fosfatos (PB) y pH 8.5, lo que sugiere que hubo alguna reacción química con el medio.



**Figura 4.3.** Tamaño de partícula en soluciones de TiBALDH en diferentes medios. La concentración de TiBALDH fue de 50 mM, la de los sistemas amortiguadores e inorgánicos fue de 0.1 M.

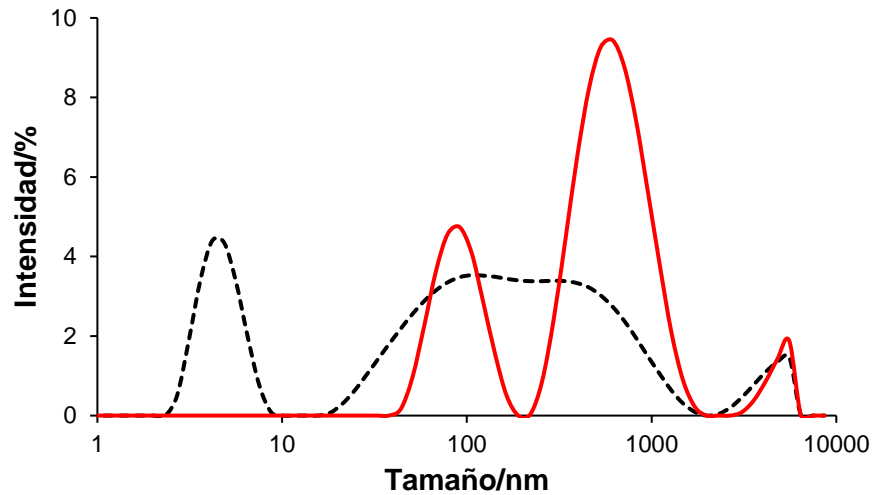
Existen reportes donde los fosfatos y Tris promueven la reacción del TiBALDH para la formación de  $\text{TiO}_2$ ,<sup>61, 85</sup> sin embargo, en los resultados anteriores sólo se observó cambios en el sistema PB. Debido a esto, fue necesario estudiar más detalladamente las condiciones que aseguraran la selección de fagos con actividad catalítica y descartar la precipitación debida a los iones del sistema amortiguador. Así, se realizaron nuevos experimentos de estabilidad del TiBALDH con PB y Tris.

En la Figura 4.4 se muestra el tamaño de partícula de las soluciones de TiBALDH en PB a diferentes concentraciones. Se observa que a concentración de 0.1 M de TiBALDH, la concentración de fosfatos 0.01 M es suficiente para comenzar a reaccionar. Incluso, cuando se eleva la concentración de fosfatos los precipitados son tan grandes que hace inviable medir su tamaño por DLS. En contraste, cuando el TiBALDH tiene una concentración de 1.0 M no hay formación de precipitados aun usando PB 0.1 M. Esta es una peculiaridad del TiBALDH, a mayor concentración su reactividad decrece, lo cual está ligado con la polimerización del complejo en las soluciones concentradas. Todas las soluciones en PB tuvieron casi nula variación del pH (7.0-7.4) incluso a concentración 0.01 M de la solución amortiguadora, por lo que no hay influencia del pH en estos sistemas de reacción.

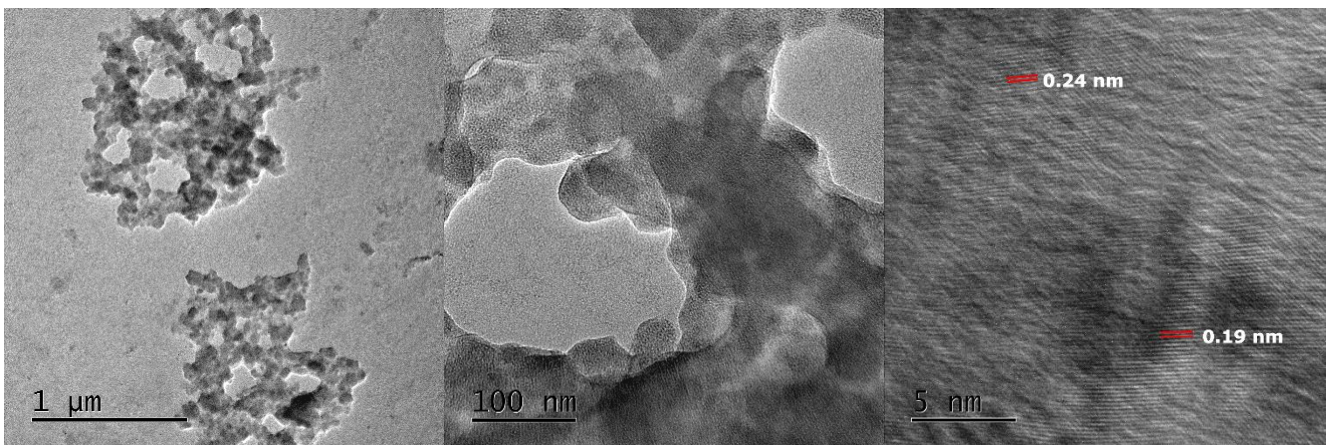


**Figura 4.4.** Tamaño de partícula del producto de TiBALDH a diferentes concentraciones en agua sola (círculos) y en presencia de PB (triángulos), concentraciones de PB: 0.1, 0.05, 0.02 y 0.01 M.

Para estudiar la dependencia del estado de protonación de los grupos fosfato se empleó ácido fosfórico. Al mezclar TiBALDH 50 mM con 0.1 M de ácido fosfórico se obtuvo el mismo resultado que con PB, formación de precipitados. De esta forma se comprueba que la presencia de fosfatos, independiente de su estado de protonación, promueve la reacción de TiBALDH para formar óxidos de titanio. Otro experimento para comprobar que cualquier grupo fosfato reacciona con el TiBALDH fue usar ADN de doble cadena (vector M13mp18). Al añadir el ADN, las partículas pequeñas típicas del TiBALDH desaparecen para dar lugar a precipitados. Esto sucede siempre y cuando la concentración de TiBALDH sea lo suficientemente baja como para reaccionar totalmente con los fosfatos provenientes del ADN. Cuando la concentración de TiBALDH es 0.2 M aún se observa un pico correspondiente a las partículas del precursor (Figura 4.5). En la Figura 4.6 se muestran micrografías de TEM del producto formado usando el ADN y TiBALDH. Las estructuras del sólido formado se derivan de morfologías del tipo ADN enrollado, además se observan planos cristalinos del óxido de titanio en fase anatasa. Estos resultados confirman la alta afinidad del TiBALDH con los grupos fosfato que bajo condiciones adecuadas reaccionan rápidamente.



**Figura 4.5.** Distribución de los tamaños de las partículas formadas con el vector M13mp18 y TiBALDH 0.2 M (línea punteada) y 0.05 M (línea continua).



**Figura 4.6.** TiO<sub>2</sub> formado por la presencia de los grupos fosfato del vector M13mp18 (ADN doble cadena circular).

Existen varios reportes donde se emplea el sistema amortiguador de fosfatos para las reacciones de biomineralización con péptidos, sin embargo, como se observa en los experimentos realizados aquí, el TiBALDH reacciona en presencia de fosfatos incluso a concentraciones tan bajas como 0.01 M. Esto es importante ya que pocos trabajos donde biomineralizan TiO<sub>2</sub> usando TiBALDH mencionan su reactividad,<sup>85-87</sup> mientras que otros autores, a pesar de usar concentraciones de fosfatos suficientes para reaccionar con TiBALDH, no mencionan nada al respecto.<sup>61, 82-84, 88-90</sup>

Cuando se utilizó el sistema amortiguador Tris, según DLS, el tamaño de partícula del TiBALDH se mantuvo constante (Figura 4.2). Por lo que fue necesario encontrar otra manera de observar

cambios en el sistema. Se optó por cuantificar las especies de Ti(IV) solubles como recurso para relacionar la reactividad de Tris con TiBALDH. En la Tabla 4.1 se muestran los porcentajes relativos de Ti(IV) de soluciones de TiBALDH con PB, Tris y agua. En PB la cantidad de especies de titanio solubles es del 60%, debido a formación y precipitación de TiO<sub>2</sub>. Mientras que en Tris la cantidad de especies de titanio solubles se mantiene constante, asegurando que no existe reacción entre TiBALDH y el sistema amortiguador Tris. De estos resultados se puede considerar al sistema amortiguador Tris como un medio óptimo para realizar los experimentos de biomineralización con péptidos.

**Tabla 4.1.** Porcentaje relativo de Ti(IV) soluble en soluciones de TiBALDH en amortiguador Tris y PB. La concentración inicial de TiBALDH fue de 50 mM, la de los amortiguadores 0.1 M.

Sistema amortiguador	% relativo de Ti(IV) soluble
Agua	100.0 ± 4.8
PB	60.8 ± 10.0
Tris	100.4 ± 2.5

#### 4.2.2 *Biopanning* usando TiBALDH

Para los experimentos de *biopanning* se eligió una solución amortiguadora ácida, neutra y básica. Se seleccionó al acetato de sodio, el PB (como control positivo) y el Tris, además de agua desionizada como control negativo. Después de incubar la biblioteca de fagos en cada uno de los sistemas durante 5 días, centrifugar y lavar el precipitado (a simple vista fue imperceptible en todos los casos), se plantaron los fagos eluidos del primer ciclo del *biopanning*. En la Tabla 4.2 se muestra el resultado del primer ciclo del *biopanning* de cada sistema. El resultado después del primer ciclo tuvo el mismo comportamiento con la biblioteca de 12 y 7 residuos.

Era de esperarse que con PB se pudieran recuperar fagos, ya que por sí solo el sistema amortiguador reacciona con el TiBALDH para producir nanopartículas de TiO<sub>2</sub> con las cuales las secuencias de la biblioteca de fagos pueden interaccionar. Por el contrario, los demás sistemas requerían que alguna secuencia de la biblioteca de fagos catalizara la formación de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> para tener una superficie para interaccionar y recuperar fagos por centrifugación. De estos sistemas, el único donde se logró la recuperación de fagos fue en Tris.

**Tabla 4.2.** Sistemas empleados para el *biopanning* con TiBALDH 50 mM en 0.1 M de solución amortiguadora. Ambas bibliotecas de fagos (7 y 12 residuos) presentaron el mismo resultado en la obtención de placas.

<b>Sistema amortiguador</b>	<b>pH</b>	<b>Placas en el 1er ciclo de <i>biopanning</i></b>
Acetatos	4.5	No
Agua	7.0	No
PB	7.0	Sí
Tris	8.0	Sí

Al no obtener placas en los sistemas de acetatos y agua, no se prosiguió con el segundo ciclo en esos sistemas. Con PB y Tris después de los tres ciclos del *biopanning* se seleccionaron 20 clones de cada experimento para su secuenciación y determinación de el o los péptidos consenso. La biblioteca de 7 residuos no tuvo consenso en ninguna secuencia, mientras que en la de 12 residuos se obtuvieron 5 secuencias que se repitieron. La Tabla 4.3 contiene las secuencias con mayor frecuencia en los experimentos de la biblioteca de 12-mer. Es importante mencionar que en algunas secuencias ya no aparece la mutación en la proteína p3. Esto sucede cuando algunas mutantes son poco viables y se pierden al momento de replicarlas o por la mayor rapidez de replicación del fago silvestre.

**Tabla 4.3.** Secuencias con mayor frecuencia en los experimentos de *biopanning*.

<b>Clave</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Sistema</b>	
			<b>amortiguador</b>	<b>pI*</b>
DW	13	DWSSWVYRDPQT	PB y Tris	4.47
TN	3	TNWQALAYMQRH	PB y Tris	9.06
GL	3	GLHTSATNLYLH	PB y Tris	7.38
TW	2	TWYPNRPPILEL	PB	6.25
EN	2	ENHWSLSTLMSS	PB	5.50

\*El punto isoeléctrico (pI) fue calculado usando el programa Protein Calculator: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

La secuencia con mayor frecuencia fue DW (DWSSWVYRDPQT) y apareció en todos los

experimentos. A simple vista sería una secuencia capaz de promover la formación de  $\text{TiO}_2$  con TiBALDH, pero en técnicas combinatorias como ésta, es común hallar falsos positivos. Al hacer una búsqueda en la literatura se encontró que dicha secuencia ha sido reportada con afinidad a diversos sistemas, entre ellos el polipropileno (material de los tubos utilizados en el *biopanning*).<sup>91</sup> De esta manera se descartó la secuencia con mayor frecuencia DW además de la GLHTSATNLYLH que también ha sido hallada en algunos experimentos\* pero no presentan similitud con el sistema estudiado aquí.<sup>92-93</sup> Por lo tanto, de las tres restantes, las secuencias que se consideraron para experimentos de biomineralización fueron TN (TNWQALAYMQRH) y EN (ENHWSLSTLMSS).

#### **4.3 Biomineralización de $\text{TiO}_2$ usando péptidos**

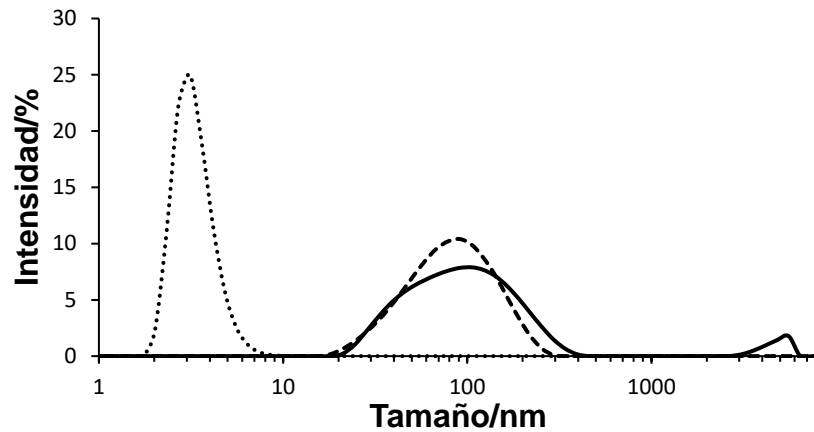
De los resultados del biopanning se eligieron dos péptidos para estudiar su actividad biomineralizante: TN y EN. Considerando los resultados antes mencionados, se realizaron los experimentos de biomineralización de  $\text{TiO}_2$  con los péptidos y el TiBALDH en medio amortiguado con Tris y para comparar el efecto del pH se usó el sistema amortiguador de acetatos.

En la solución amortiguadora de Tris, ambos péptidos EN y TN fueron capaces de biomineralizar TiBALDH a concentraciones  $\geq 2.0$  mg/mL. Recordando que el péptido EN no apareció en el biopanning realizado con Tris, se hubiera esperado una baja actividad para biomineralizar a estas condiciones. Sin embargo, en la Figura 4.7 se muestra cómo en presencia de Tris, ambos péptidos TN y EN a 2.0 mg/mL provocan un incremento similar en el tamaño de partícula que con el tiempo las partículas precipitan. Los productos de biomineralización fueron analizados por TEM, donde se puede observar resultados muy similares entre los dos péptidos. En ambos se observan nanopartículas con planos cristalinos que corresponden a la fase anatasa (Figuras 4.8a, b). Aunque a pH 8.0 el péptido TN tiene carga positiva y el EN carga negativa (Figura 4.9), no se observó diferencia en el producto de biomineralización, lo que podría sugerir que la reacción no depende del estado de protonación de los residuos básicos.

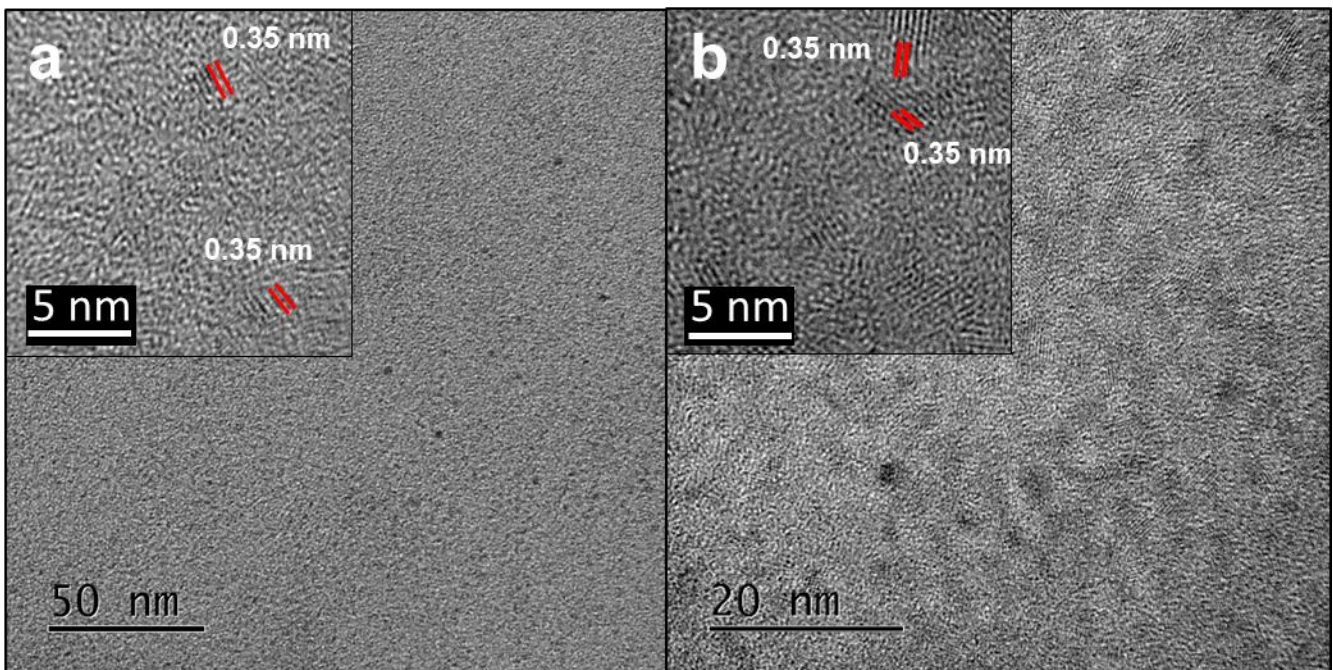
---

\* No obstante, en el transcurso de este trabajo, se publicó un artículo donde hallaron esta secuencia con afinidad a iones de tierras raras como el  $\text{Nd}^{3+}$  (ChemistrySelect 2016, 1 (11), 2712-2716) por lo que sí podría emplearse esa secuencia para la síntesis de  $\text{TiO}_2$ .





**Figura 4.7.** Distribución del tamaño del TiBALDH 50 mM en Tris (línea punteada), y en presencia del péptido TN (línea discontinua) y el péptido EN (línea continua).

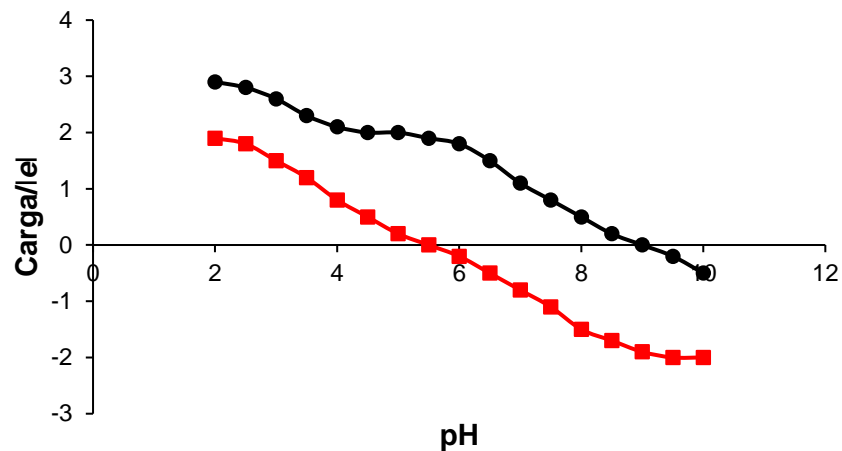


**Figura 4.8.** Imágenes de TEM de las muestras de  $\text{TiO}_2$  biomaterializado usando TiBALDH en solución amortiguadora de Tris y el péptido a) TN y b) EN.

La influencia del pH y los estados de protonación se estudiaron empleando el sistema amortiguador de acetatos. Cuando los péptidos en presencia de acetatos se mezclan con TiBALDH se observa un incremento evidente en el producto de biomaterialización. Ambos péptidos generan un precipitado cuyo tamaño hace imposible su caracterización por DLS. En



este sistema de acetatos el péptido TN pudo precipitar  $\text{TiO}_2$  incluso a concentraciones de 0.5 mg/mL mientras que el péptido EN precipitó el TiBALDH a concentraciones  $\geq 2.0$  mg/mL. La menor actividad de biomineralización del péptido EN podría explicarse con el punto isoeléctrico (pI). El péptido EN tiene un pI de 5.5, por lo que a pH 4.5 tiene menor carga positiva que el péptido TN, entonces su actividad en ambientes ácidos está relacionada al estado de protonación de los residuos más ácidos. Ver Figura 4.9.

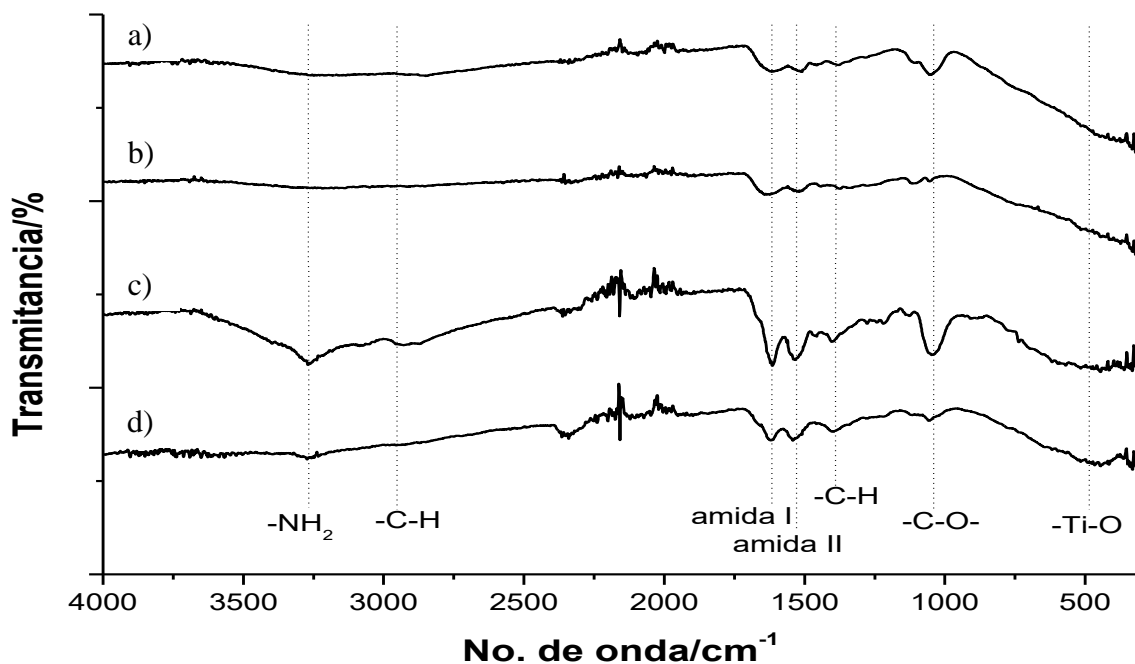


**Figura 4.9.** Distribución de la carga vs pH de los péptidos elegidos para biomineralizar  $\text{TiO}_2$ . En círculos, el péptido TN (TNWQALAYMQRH), en cuadros, el péptido EN (ENHWSLSTLMSS). Calculadas con el programa Protein Calculator.

Los residuos de los péptidos que cambian su estado de protonación cuando pasan de pH 8.0 (Tris) a 4.5 (acetatos) son el glutamato e histidina en el caso de EN y arginina e histidina para el TN. Ambos tienen histidina, así que el estado de protonación de la histidina es el mismo en ambos péptidos, por lo que la diferencia en la reactividad de los péptidos en acetatos puede atribuirse al glutamato en EN que a pH 4.5 se protona, lo que vincula su descenso de actividad de biomineralización. Un estudio de dinámica molecular de los péptidos podría ayudar a explicar también su reactividad en términos de flexibilidad y accesibilidad a sus grupos funcionales.

Finalmente, los espectros de infrarrojo de los óxidos obtenidos con los péptidos EN y TN se muestran en la Figura 4.10, donde se puede observar la banda característica de los enlaces Ti-O por debajo de los  $\tilde{\nu}$  800  $\text{cm}^{-1}$ . También se observa que las muestras preparadas en presencia de Tris presentan una banda en  $\tilde{\nu}$  1045  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a enlaces C-O en alcoholes debido posiblemente a las moléculas remanentes del sistema amortiguador. En

todas las muestras hay bandas asignadas al péptido, aunque la intensidad varía dependiendo la muestra, siendo los obtenidos con EN los más intensos lo que implicaría mayor afinidad al  $\text{TiO}_2$ . Las bandas a  $\tilde{\nu}$  1615 y  $1530\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las bandas amida I (tensión de  $\text{C}=\text{O}$ ) y amida II (flexión de  $\text{N-H}$  y tensión de  $\text{C-N}$ ) respectivamente. A  $\tilde{\nu}$  1400 y  $2930\text{ cm}^{-1}$  aparecen bandas correspondientes al enlace  $\text{C-H}$  y finalmente otra a  $\tilde{\nu}$   $3270\text{ cm}^{-1}$  originada por la tensión de enlaces  $\text{N-H}$  de los grupos amina y amida.<sup>94</sup> Todas las bandas de amida I aparecen en la región de estructuras beta intermolecular ( $\tilde{\nu}$   $1610\text{-}1625\text{ cm}^{-1}$ ), tal vez provocada por la interacción del péptido con la superficie del  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 4.10.** Espectros de infrarrojo del  $\text{TiO}_2$  biomineralizado usando el péptido TN en: a) Tris y b) acetatos; y usando el péptido EN en solución amortiguadora de: c) Tris y d) acetatos.

## **4.4 Síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso**

### **4.4.1 Precursores de TiO<sub>2</sub>**

El método sol-gel con alcóxidos de titanio permite una gran versatilidad en la elección de los parámetros de síntesis de TiO<sub>2</sub>. Sin embargo, las condiciones en las que se realiza la reacción deben ser minuciosamente seleccionadas para lograr un buen control en la síntesis debido a la alta reactividad de los alcóxidos. Utilizar moléculas que sirvan de ligantes para guiar la síntesis es una alternativa común en la obtención de óxido de titanio. Sin embargo, moléculas complejas como las proteínas, cuya diversidad de grupos químicos es grande, complica la selección de las condiciones de síntesis. De esta manera, la correcta delimitación de las variables del método sol-gel es crucial para obtener el material deseado.

En este trabajo se propuso emplear el fago M13 como plantilla biológica para la síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso. La primera opción para esta síntesis fue adaptar los grupos químicos de la cápside del fago a través de una modificación genética para que su reactividad con el titanio fuera controlada. Al no poder modificar la cápside del fago, se probó adaptar la solución de alcóxido para que las especies de titanio interaccionaran específicamente al ambiente químico del fago.

Así, la síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso se realizó a partir de dos precursores diferentes. En primer lugar, se usó el método sol-gel tradicional con isopropóxido de titanio, y como segunda opción se empleó el precursor estable en agua TiBALDH. Para esta síntesis se probaron diferentes rutas para su condensación.

#### **4.4.1.1 Isopropóxido de titanio**

El punto de partida para la reacción de sol-gel fue la selección del alcóxido. El etóxido y propóxido de titanio son precursores muy reactivos por lo que fueron descartados. El butóxido es menos reactivo que el isopropóxido, sin embargo, al hidrolizarse se genera butanol como producto de reacción, el cual a bajas concentraciones es capaz de desnaturalizar el fago. Por esta razón sólo se empleó el isopropóxido de titanio.

Siguiendo la metodología propuesta (Figura 3.3), se fijaron valores de las variables independientes y se comenzó proponiendo valores de las dependientes. El orden de dependencia de las variables fue el siguiente: Ti:p8<[M13mp18]<Ti:OH. A continuación, se detalla cada uno de los ciclos realizados para la optimización, para mejor claridad se resaltan en negritas los parámetros propuestos en cada ciclo:

- **Ciclo 1**

Parámetros teóricos iniciales:

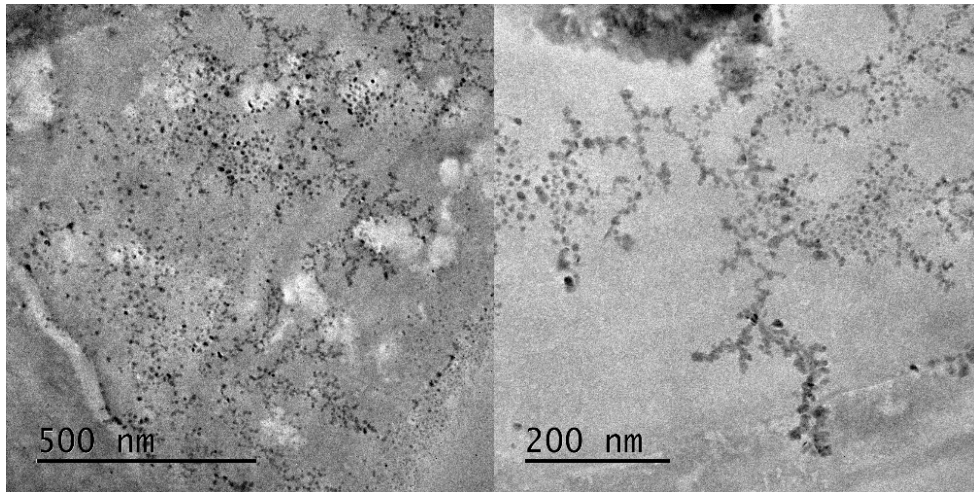
Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C1a	0.5	10 <sup>3</sup> :1	0.1	1:10 <sup>3</sup>
C1b	0.5	10 <sup>3</sup> :1	4.0	1:25

Resultados:

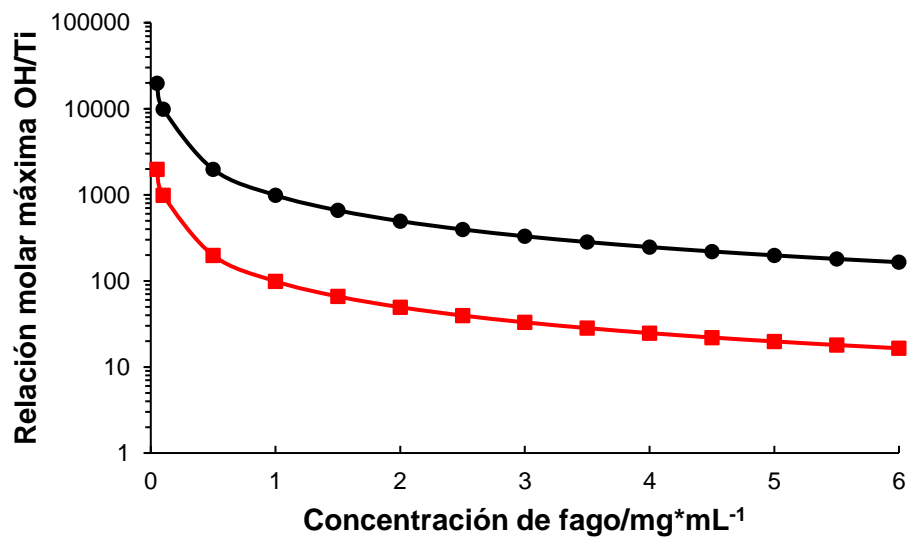
Se probó agregar la solución del fago a la solución del alcóxido, pero inmediatamente se forma un aglomerado debido a la lenta difusión del virus en la solución alcohólica. Por esta razón, se estableció que la solución del alcóxido fuera agregada a la solución del fago en agitación.

Con la concentración de 4.0 mg/mL la homogenización de la muestra C1b no fue posible, la reacción fue muy rápida a pesar de tener un pH de 0.5. Por otro lado, la solución de 0.1 mg/mL permitió un buen control en la condensación de las especies de titanio y el fago reaccionó sin aglomerarse. Sin embargo, el resultado fue la formación de microcristales de TiO<sub>2</sub> sin lograr cubrir los fagos completamente (Figura 4.11). Otro inconveniente fue que al usar un pH de 0.5 para la solución del alcóxido, el pH final de la solución de reacción de C1a y C1b fue alrededor de dos, el cual es un valor extremo para la estabilidad del fago. También hubo un exceso de especies de titanio en la solución de reacción por lo que es posible utilizar una relación molar Ti:p8 menor, lo que permitiría también ajustar la relación molar Ti:OH y el pH final.

Como ya se mencionó, los fagos pueden ordenarse en función de su concentración, mientras más concentrada la solución de fago mejor su ordenamiento tridimensional, lo cual es una ventaja para su uso en la síntesis de mesoporos ordenados. Sin embargo, emplear concentraciones altas de fago en esta síntesis tiene la desventaja de limitar la relación molar OH:Ti, por lo que el alcóxido no se puede diluir suficiente para evitar la reacción rápida y localizada. En la Figura 4.12 se muestra la relación máxima de OH:Ti considerando que el fago soporta hasta un 50% de etanol en agua. La opción más sencilla para emplear soluciones más diluidas de alcóxido y mejorar su difusión en la solución del fago es disminuir la relación molar Ti:p8.



**Figura 4.11.** Micrografías por TEM del producto de la síntesis C1a. La concentración del fago fue de 0.1 mg/mL.



**Figura 4.12.** Relación molar máxima de OH/Ti para la síntesis de TiO<sub>2</sub> mesoporoso en función de la concentración del fago. En cuadros la correspondiente al emplear la relación molar Ti:p8 10<sup>3</sup>:1 y en círculos si se emplea la relación Ti:p8 100:1.

- **Ciclo 2**

Parámetros experimentales optimizados:

Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C2a	<b>2.0</b>	<b>100:1</b>	0.1	1:10 <sup>3</sup>
C2b	<b>2.0</b>	<b>100:1</b>	<b>1.0</b>	1:10 <sup>3</sup>

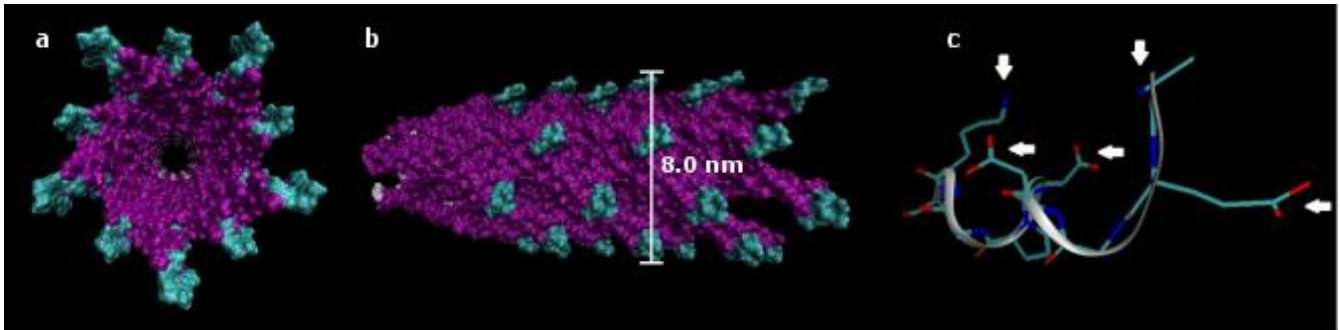
Resultados:

Usando concentraciones de fago 0.1 y 1.0 mg/mL permitió homogenizar la solución. En las soluciones de C2a y C2b no se observaron especies de titanio en el sobrenadante después de la reacción, por lo que se evita un exceso de titanio asegurando que todo el alcóxido reacciona con el fago. Sin embargo, el pH final fue de 3.1 que es menor al pI del fago y provoca su aglomeración. Cuando se realizó la reacción sin alcóxido se pudo apreciar la aglomeración del fago durante la adición del alcohol acidificado, lo que impediría la buena distribución del tamaño de los poros. Una posibilidad para controlar la variación del pH es disminuir el volumen de la solución del alcóxido (relación molar Ti:OH).

Por otro lado, cuando se realiza la reacción sin usar el fago se forma un sol estable, lo que asegura que el fago interacciona específicamente con las especies de titanio para formar TiO<sub>2</sub>. Esto prueba que el alcóxido en condiciones ácidas sólo reacciona en presencia de fago, evitando la formación desperdigada de partículas. La reacción de condensación promovida por el fago puede ser provocada por los grupos laterales de los residuos expuestos al solvente. En las Figuras 4.13a y b se muestra la forma en que se ensamblan las proteínas p8 para formar la cápside del fago. En color cian se muestran los residuos que están más expuestos al solvente, incluso, estos residuos están tan libres que no tienen estructura alfa hélice lo que provoca que el diámetro del fago sea de hasta de 8.0 nm. En la Figura 4.13c se muestran los residuos 1-8 (AEGDDPAK-) con grupos amino (del N-terminal de alanina y grupo lateral de lisina) que al estar protonados, pueden interaccionar con las especies de titanio hidrolizadas cargadas negativamente, además de que, los grupos carboxilo (del glutamato y aspartato) pueden sustituir a un grupo alcoxi para coordinar al titanio provocando un incremento en su reactividad.<sup>56, 95</sup>

En los ciclos posteriores también se realizaron experimentos sin fago como control negativo. En todas las reacciones usando los nuevos parámetros optimizados, se obtuvo siempre un sol

similar y no se observó precipitación incluso después de una semana.



**Figura 4.13** a) y b) Representación del empaquetamiento de la proteína p8 formando la cápside del fago (PDB 2MJZ), en morado los residuos internos, en cian los residuos expuestos. c) Detalle de los ocho primeros residuos de la proteína p8 los cuales están expuestos al solvente. Las flechas horizontales indican los grupos carboxilo de las cadenas laterales, las flechas verticales indican los grupos amino. Los átomos de hidrógeno fueron omitidos para mayor claridad. Visualizaciones realizadas con VMD.<sup>96</sup>

- **Ciclo 3**

Parámetros experimentales optimizados:

Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C3a	1.0	100:1	0.1	1:100
C3b	2.0	100:1	0.1	1:100

### Resultados

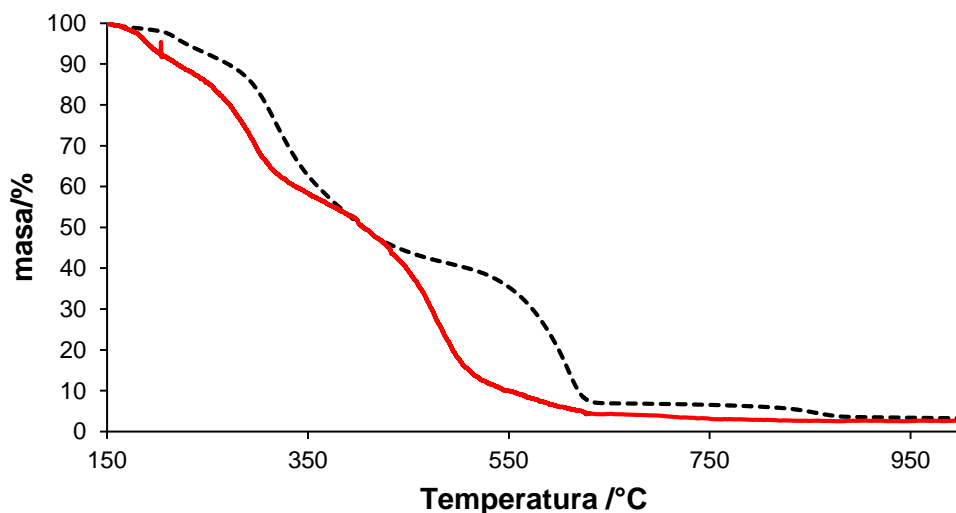
Al usar el pH de 2.0 para la solución de alcóxido en la muestra C3b dio como resultado un pH final de 6.5, un valor fuera del intervalo de ordenamiento del fago. Por otro lado, los parámetros usados para la reacción C3a permitieron que la solución final tuviera un pH de 5, que es un valor más adecuado para el control de la organización del fago. Con estas condiciones, el alcóxido de titanio reaccionó totalmente con el fago y permitió la homogenización de la reacción.

Después de obtener los sólidos en este ciclo fue necesaria la remoción del fago por medio de calcinación. Para asegurar la completa remoción del fago, se estudió la descomposición del fago por análisis térmico gravimétrico (TGA). En la Figura 4.14 se muestra los termogramas del fago derivado del vector M13mp18 donde se comparan dos velocidades de calentamiento,

5 °C/min (línea discontinua) y 1 °C/min (línea continua) cuya pérdida de masa orgánica fue del 97 % y 98 % respectivamente. La pérdida de masa no es completa pues el fago contiene grupos fosfato de la cadena de ADN, el cual representa alrededor del 3.8 % en masa.

En ambos experimentos se observan dos temperaturas donde se pierde la mayor parte de materia orgánica. La primera entre 250-350 °C donde se pierde entre 50-60 % de masa debido a la combustión parcial de la cápside del fago. La segunda caída de masa sucede a 450 °C y 600 °C cuando se calienta a 1 y 5 °C/min respectivamente, esta pérdida corresponde a la calcinación total de las proteínas de la cápside junto al ADN de cadena sencilla. Se puede observar que la calcinación total de ADN en la muestra calentada a 5 °C/min se logra hasta 900 °C debido a su alta estabilidad térmica, consecuencia de su efecto retardante de la combustión.<sup>97</sup>

Con base en los resultados anteriores, se probaron dos temperaturas de calcinación, 450 °C y 500 °C a una velocidad de calentamiento de 1.0 °C/min. El TiO<sub>2</sub> calcinado a 450 °C por 4 h aún conservaba materia orgánica, mientras que el de 500 °C quedó libre de materia orgánica incluso manteniéndolo sólo por 2 h. Estas últimas condiciones fueron las que se consideraron óptimas para la remoción del fago en las reacciones posteriores.



**Figura 4.14.** Termograma de la descomposición del fago derivado del vector M13mp18 a una velocidad de calentamiento de 1.0 °C/min (línea continua) y 5.0 °C/min (línea punteada).

Después de su calcinación, la muestra C3a fue analizada por adsorción isotérmica de nitrógeno. El área superficial específica de la muestra fue de 131.5 m<sup>2</sup>/g, lo que sugiere una

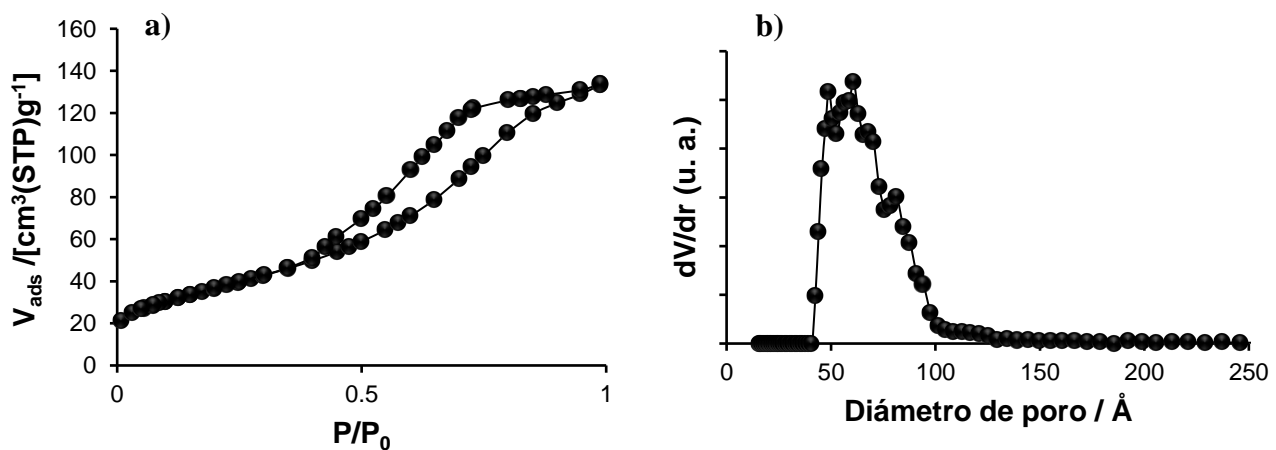


óptima encapsulación del fago en todo el material. En la isoterma de adsorción correspondiente al tipo IVa (Figura 4.15a) se observa un ciclo de histéresis del tipo H2b debido a la mesoporosidad, donde el proceso de desorción está afectado por efectos de bloqueo a lo largo del poro. La muestra C3a presentó una distribución del tamaño de poro estrecha (Figura 4.15b), con un diámetro medio de poro de 6.1 nm que concuerda con el diámetro del fago (Figuras 4.13 b y d).

Una característica singular de este material es que a baja presión relativa prácticamente no hay adsorción. Esto implica que el material presenta nula microporosidad y el área superficial específica es exclusivamente correspondida a los mesoporos. Esta característica es importante, pues en la mayoría de las síntesis de  $\text{TiO}_2$  por plantilla suave, la microporosidad representa un porcentaje considerable del área superficial del material, pero no es útil en cuestiones de difusión de moléculas (área muerta).

Así, al utilizar fagos como plantilla semirrígida se evita la formación de microporos, a diferencia de cuando se emplean tensoactivos, donde algunas moléculas sin arreglo micelar quedan atrapadas en la red del óxido provocando cavidades microporosas. El fago, por tener un arreglo muy estable, no se desensambla permitiendo que se formen únicamente mesoporos como se observa en las distribuciones de poro.

La opción generalmente utilizada hoy por hoy para evitar la microporosidad es la síntesis por plantilla rígida. Sin embargo, el método de plantilla rígida exige tener un material mesoporoso de partida, lo cual complica el proceso de síntesis, por lo que el fago podría ser una mejor alternativa como plantilla semi-rígida para evitar microporosidad indeseada.



**Figura 4.15.** a) Isotherma de adsorción de nitrógeno y b) distribución del tamaño de poro de la muestra C3a. El área superficial específica de la muestra fue de  $131.5 \text{ m}^2/\text{g}$ .

- **Ciclo 4**

Parámetros experimentales optimizados:

Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C4a	1.0	<b>250:1</b>	0.1	1:100
C4b	1.0	<b>500:1</b>	0.1	1:100

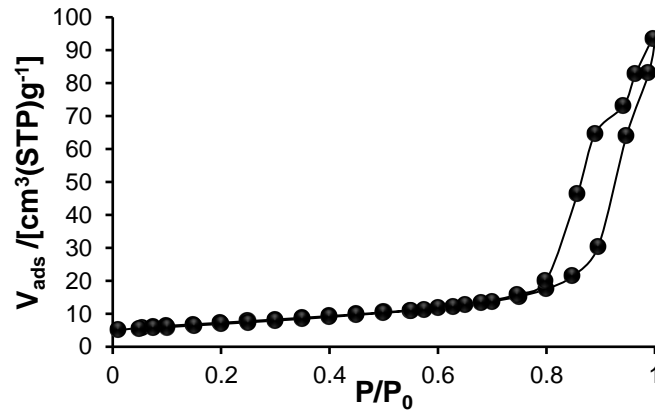
Resultados:

En el ciclo anterior no hubo exceso de alcóxido de titanio, por lo que se probó aumentar la relación molar Ti:p8 para asegurar que los fagos estuvieran totalmente cubiertos de óxido de titanio.

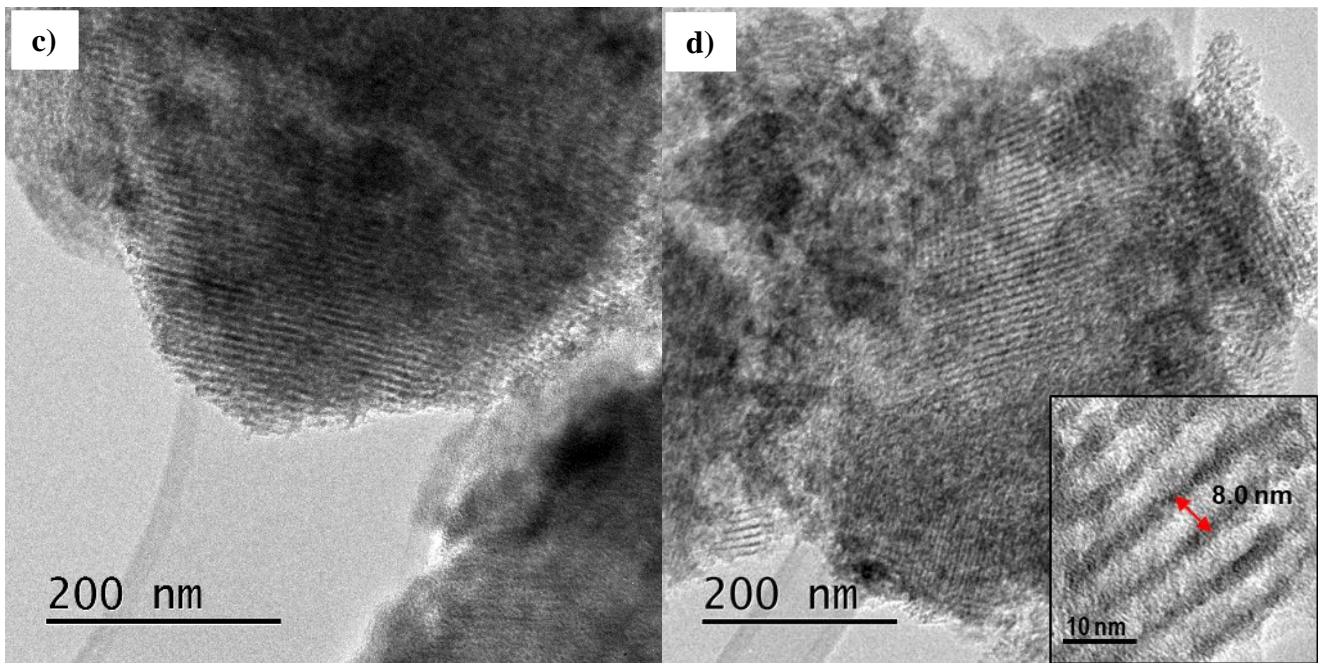
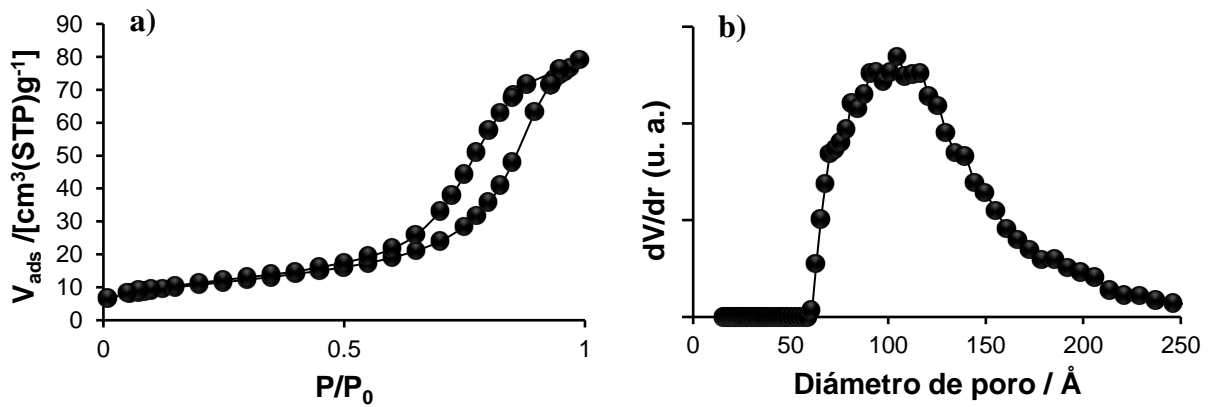
Cuando se realizó la reacción C4b, la condensación del titanio sucedió rápidamente al contacto con el fago, sin embargo, en la solución aun quedaron especies de titanio sin reaccionar. La pérdida de masa orgánica determinada por TGA fue sólo del 16.5 %, indicando que muy pocos fagos quedaron atrapados en el óxido. Esto se confirma con la isoterma de adsorción de nitrógeno de la que se calculó un área superficial de 26.0 m<sup>2</sup>/g, menor a la que se obtuvo en el ciclo anterior con la misma concentración de fago (Figura 4.16).

En el caso de C4a, la reacción es más lenta y la cantidad de masa orgánica en el sólido fue del 86.3 % lo que indicaría un mejor atrapamiento de fagos en el material y una mayor área superficial específica. Sin embargo, el área superficial específica obtenida por adsorción de nitrógeno fue de 38.42 m<sup>2</sup>/g (Figura 4.17a), similar a la de C4b, aunque en C4a la histéresis está mejor definida y se puede clasificar como del tipo H1 típico de poros cilíndricos abiertos por ambos extremos, que se corresponde con la geometría del fago. La mesoporosidad de la muestra C4a se observó por TEM (Figuras 4.17c, d), donde se distinguen arreglos mesoporosos de 8.0 nm. Esto prueba que los arreglos tridimensionales del fago pueden servir para obtener mesoporos ordenados. No obstante, la microscopía electrónica da un resultado muy local de la muestra. Si observamos la distribución del tamaño de poro por adsorción de nitrógeno, a pesar de dar un tamaño medio de poro de 10.5 nm, la distribución del tamaño de poro se extiende hasta tamaños de 25 nm (Figura 4.17b) por lo que los mesoporos ordenados de las Figuras 4.17c y d son sólo una parte de la muestra mesoporosa heterogénea.

Para mejorar la distribución del tamaño de poro, se podría regular la reactividad incrementando un poco la cantidad de alcohol sin que afecte el pH final.



**Figura 4.16.** Isotherma de adsorción de nitrógeno de la muestra C4b.



**Figura 4.17.** a) Isotherma de adsorción de nitrógeno y b) distribución del tamaño de poro de la muestra C4a. c) y d) Micrografías por TEM de la muestra C4a, se observan patrones de mesoporos ordenados de 8.0 nm de diámetro.

- **Ciclo 5**

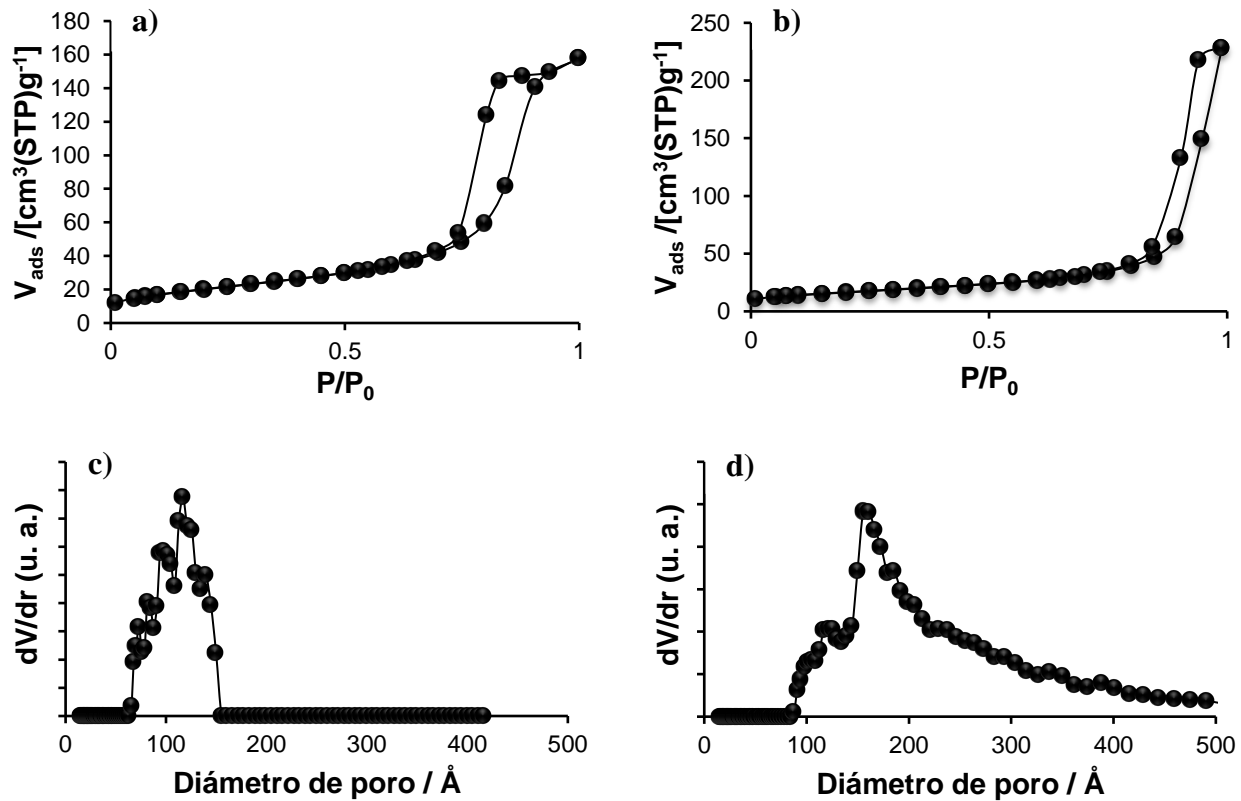
Parámetros experimentales optimizados:

Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C5a	<b>2.0</b>	250:1	0.1	<b>1:250</b>
C5b	<b>2.0</b>	250:1	<b>0.5</b>	<b>1:250</b>

Resultados:

Al aumentar la relación molar Ti:OH, a simple vista, mejoró la homogeneidad de las reacciones. El pH 2.0 en la solución de alcóxido permitió tener un valor final de pH en la reacción de 5.0 por lo que es un valor adecuado para la organización del fago. Al final de la reacción C5a, con la relación molar Ti:p8 250:1, existe un exceso de especies de titanio en solución. Es decir, a pesar de tener una relación molar alta, el exceso de titanio permanece en solución, sugiriendo que las reacciones de condensación del titanio están controladas por el fago, pues al cubrir totalmente su superficie, la reacción ya no puede ser catalizada.

En las Figuras 4.18a y b se muestran las isothermas de adsorción de nitrógeno del TiO<sub>2</sub> obtenido de C5a y C5b respectivamente. Aunque el área superficial de ambas muestras fue similar (72.3 y 59.0 m<sup>2</sup>/g), hay una clara diferencia en la distribución del tamaño de poro. Cuando la concentración fue de 0.5 mg/mL (muestra C5b) la distribución del tamaño de poro no es homogénea (Figura 4.18d), mientras que al usar la concentración más baja (C5a) se obtiene una distribución del tamaño de poro con tamaño medio de 11.7 nm (Figura 4.18c). Este diámetro es mayor al del fago, lo que podría indicar que aún existe aglomeración entre ellos. El ciclo de histéresis de esa muestra es del tipo H1, indicando que no hay obstrucción en los poros, siendo una buena característica para materiales porosos empleados en catálisis.



**Figura 4.18.** Isotherma de adsorción de nitrógeno y distribución del tamaño de poro de las muestras: a) y c) C5a; b) y d) C5b.

- **Ciclo 6**

Parámetros experimentales optimizados:

Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C6a	1.5	250:1	0.1	1:250
C6b	1.0	100:1	1.0	1:250
C6c	1.0	100:1	3.0	1:250
C6d	1.0	100:1	4.0	1:250
C6e	1.0	100:1	6.0	1:150

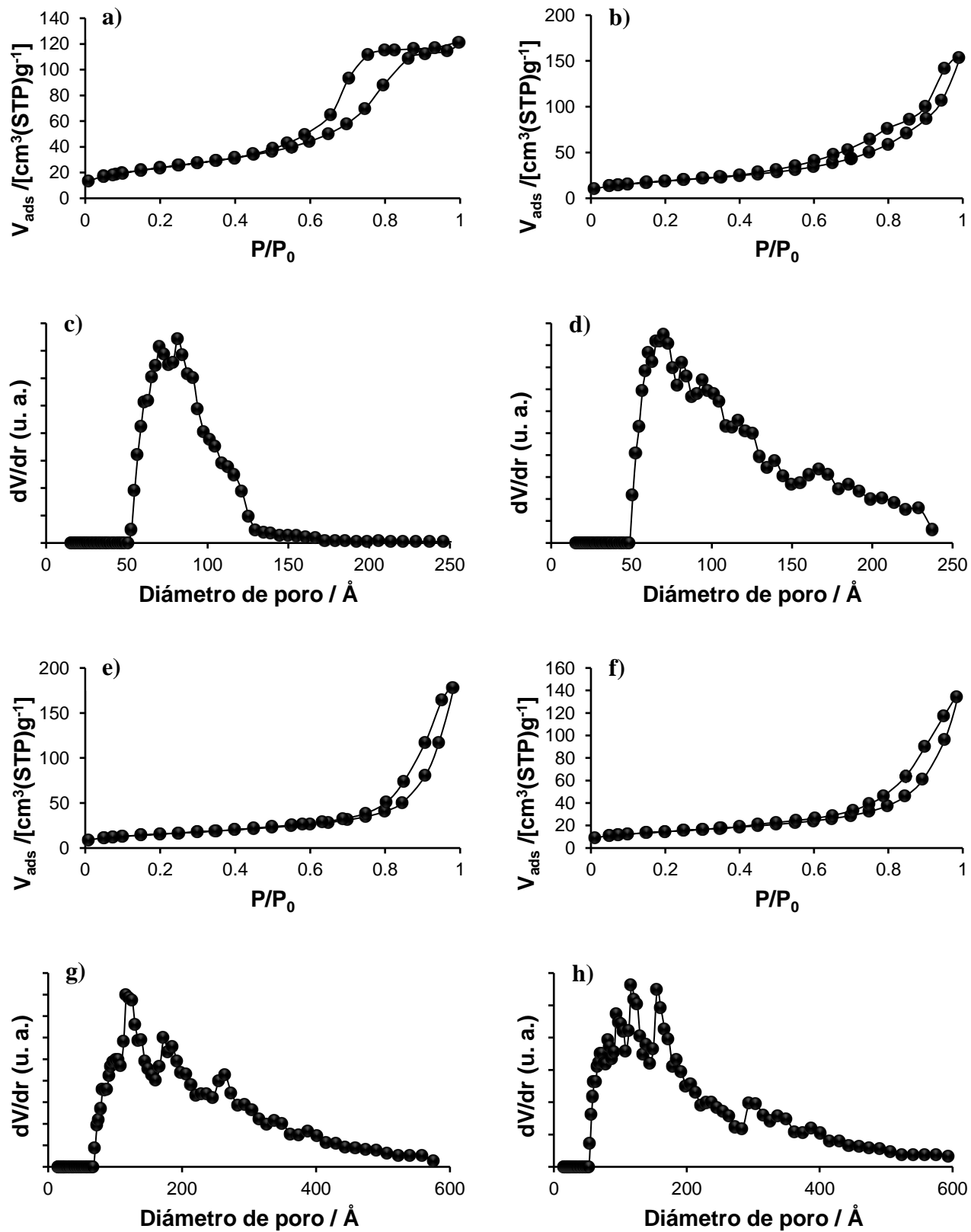
Resultados:

Se probaron concentraciones altas de fago para asegurar su arreglo tipo cristal líquido y así obtener mesoporos ordenados. Para ello, al usar la concentración de 6.0 mg/mL (muestra C6e) la relación molar de Ti:OH tuvo que disminuirse de acuerdo con la Figura 4.12.

Desafortunadamente, cuando las concentraciones de fago son mayores a 1.0 mg/mL la reacción sucede rápidamente provocando que el área superficial específica de los materiales obtenidos disminuya al incrementar la concentración de fago, de tal forma que se obtienen áreas de 55.4, 51.6 y 22.0 m<sup>2</sup>/g para las concentraciones 3.0, 4.0 y 6.0 mg/mL respectivamente. Por el contrario, el área superficial específica aumenta al usar menor concentración de fago, obteniendo áreas superficiales específicas de 67.0 y 85.0 m<sup>2</sup>/g para muestras C6b y C6a respectivamente.

Las isothermas de adsorción de nitrógeno de las muestras C6b, C6c y C6d tuvieron un comportamiento similar (Figuras 4.19b, e y f). Todas adsorben incluso a presión relativa de 1 indicando la existencia de macroporos, los cuales, por tener un ciclo de histéresis del tipo H3, podrían estar formando poros entre placas. Por lo contrario, la muestra C6a presenta un ciclo de histéresis del tipo H1, producida por mesoporos cilíndricos abiertos por ambos extremos (Figura 4.19a). De las isothermas de adsorción, a simple vista se puede suponer que la distribución del tamaño de poro en la muestra C6a es la más homogénea.

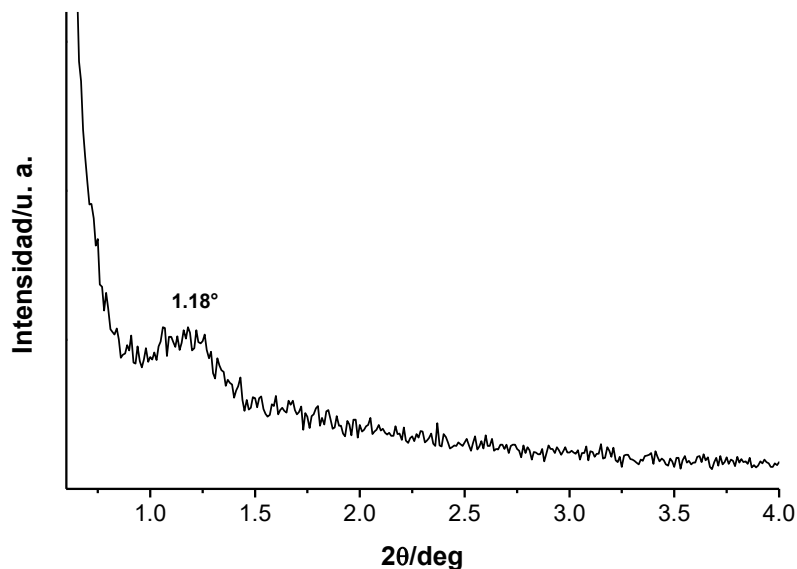
En la Figura 4.19c se muestra la distribución del tamaño de poro de la muestra C6a. Dicha distribución es bastante estrecha, dando un diámetro medio de poro de 8.2 nm que concuerda con el diámetro máximo del fago y con las imágenes de TEM del ciclo 4 (Figuras 4.17c y d). Con respecto a las muestras preparadas con solución de fago más concentradas (C6b-C6d), la distribución del tamaño de poro se vuelve más amplia (Figuras 4.19d, g y h). Esta dispersión en la distribución del diámetro de poro se genera por la alta reactividad de los fagos con el precursor. La velocidad en que suceden las reacciones de condensación es mucho más rápida que la difusión del precursor, impidiendo que las especies de titanio alcancen los sitios internos entre fagos y provocando la encapsulación de manojos de fagos en la red de óxido de titanio, generando la formación de macroporos. Cuando se usa una concentración muy alta del fago (C6e), la isoterma del sólido formado es tan irregular que ni siquiera es posible asignar una distribución del tamaño de poro (no mostrada).



**Figura 4.19.** Isothermas de adsorción y distribución del tamaño de poro de las muestras: a), c) C6a; b), d) C6b; e), g), C6c; f), h) C6d.

En el ciclo 4 se pudo observar regiones mesoporosas ordenadas, por lo que en este ciclo se utilizó la difracción de rayos X a ángulo bajo para caracterizar los materiales obtenidos. Esta técnica, a diferencia de la microscopía electrónica, permite saber si los arreglos porosos existen en la mayor parte del material. Se analizaron todas las muestras, sin embargo, ninguna presentó picos de difracción a ángulo bajo, indicando que no existe un ordenamiento de los poros en todo el material. Al aumentar la potencia del haz de rayos X en la muestra C6c se logró ver un pequeño pico a  $1.18^\circ$  en  $2\theta$  (Figura 4.20), quizás por la presencia de regiones dispersas de poros ordenados (como las vistas por TEM en Fig. 4.17), pero por la intensidad del pico de difracción, el arreglo mesoporoso no es definido.

Aunque la organización del fago mejora a concentraciones  $\geq 0.1$  mg/mL, con el método de síntesis empleado aquí no fue posible obtener mesoporos con tamaños homogéneos con esas condiciones. Por lo tanto, se puede concluir que la concentración máxima del fago para la síntesis de mesoporos homogéneos de  $\text{TiO}_2$  utilizando alcóxidos de titanio es 0.1 mg/mL.



**Figura 4.20.** Patrón de difracción de rayos X a bajo ángulo de la muestra preparada con solución de fago C6c.



- **Ciclo 7**

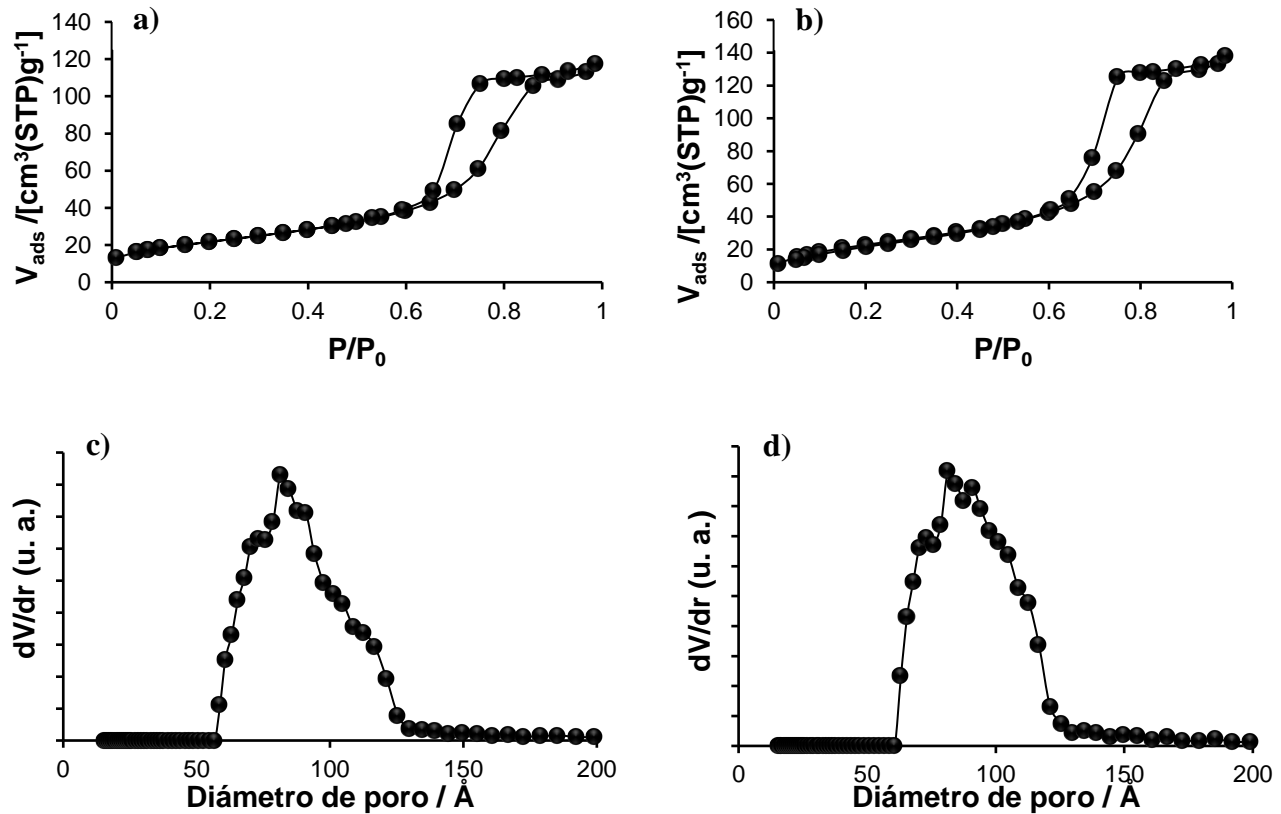
Parámetros experimentales optimizados:

Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C7a	<b>2.0</b>	100:1	0.1	<b>1:500</b>
C7b	1.5	250:1	<b>0.05</b>	1:250

Resultados:

Para corroborar que la distribución del tamaño de poro es producto del diámetro de fagos individuales se probó usar la concentración de solapamiento ( $C^*$ ), la cual asegura que las partículas del soluto no interaccionan entre ellas. Se realizó la síntesis con la concentración de solapamiento de los fagos Ff (0.05 mg/mL)<sup>98</sup> conservando la relación molar Ti:OH de 1:250 (muestra C7b). También se probó incrementar la relación molar Ti:OH a 1:500 manteniendo la concentración de 0.1 mg/mL para mejorar la difusión del alcóxido en la solución (muestra C7a). El resultado de adsorción de nitrógeno mostró que el tamaño medio de poro para ambas muestras fue de 8.2 nm (Figuras 4.21 c y d), igual al obtenido en la muestra C6a en el ciclo anterior. El área específica fue de 83.3 y 77.6 m<sup>2</sup>/g para la muestra C7b y C7a respectivamente. Este resultado demuestra que el fago incluso a 0.1 mg/mL está lo suficientemente diluido y el tamaño medio de poro de 8.2 nm proviene de un solo fago, descartando cualquier aglomeración.

De estos resultados también se comprueba la reproducibilidad del método de síntesis incluso al usar diferentes condiciones. El ciclo de histéresis de las isothermas de ambos materiales es del tipo H1, indicando que los poros tienen buena difusión, sugiriendo que las paredes de los poros evitan su colapso (Figuras 4.21 a y b).



**Figura 4.21.** Isotermas de adsorción y distribución del tamaño de poro de las muestras: a) y c) C7a; b) y d) C7b.

- **Ciclo 8**

Parámetros experimentales optimizados:

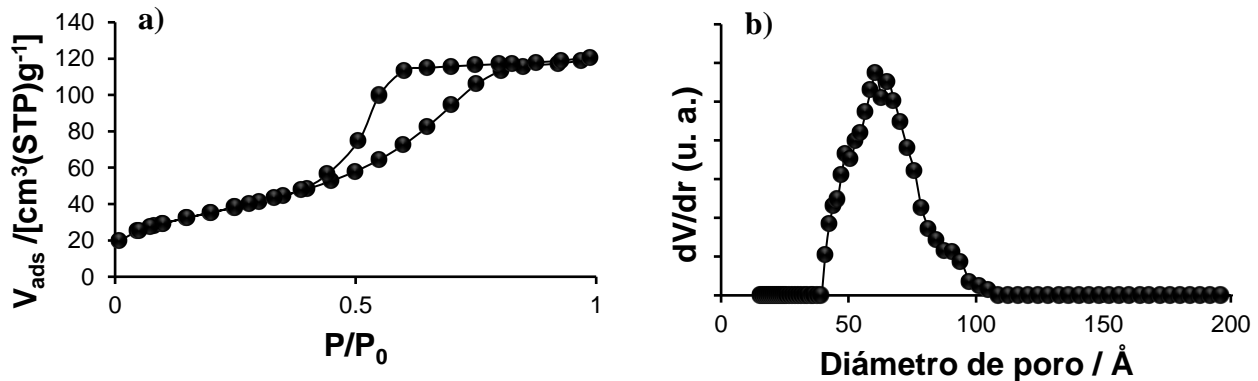
Clave	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
C8a	1.2	100:1	0.1	1:250

### Resultados

Al no haber diferencia al usar la concentración de fago de 0.1 y 0.05 mg/mL se probó realizar la reacción con las condiciones de síntesis del ciclo anterior donde se usó la concentración de solapamiento, pero ahora con una solución de fago 0.1 mg/mL.

El material obtenido tuvo un área superficial específica de  $130 \text{ m}^2/\text{g}$  y un diámetro medio de poro de 6.1 nm, resultados prácticamente iguales a los obtenidos en el ciclo 3 (muestra C3a). Esto evidencia también la reproducibilidad en la síntesis de poros de diámetro de 6.1 nm incluso usando diferentes relaciones molares de Ti:OH.

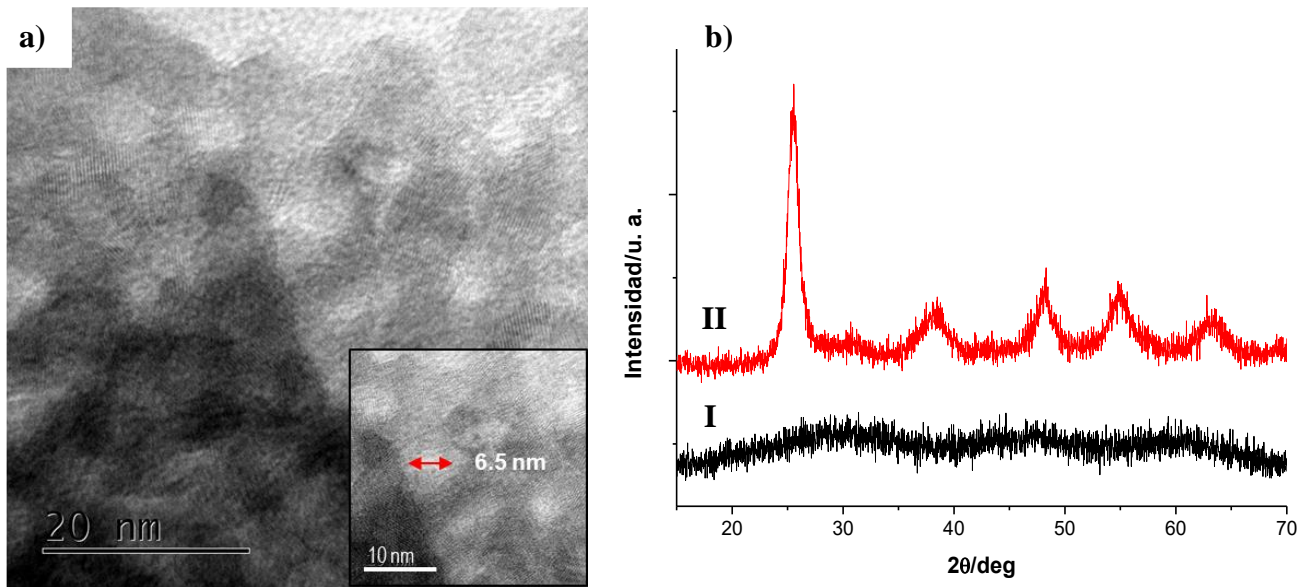
La isoterma del material C8a tuvo un ciclo de histéresis del tipo H2a, distinto a los que presentan las muestras con poro de 8.2 nm (Figuras 4.22 a y b). Este comportamiento indica que existe obstrucción entre los poros, retrasando la desorción y formando una meseta en la isoterma de desorción a presiones relativas altas. Las obstrucciones de los poros pueden ser provocadas por el colapso y/o contracción de algunos poros provocando cavitación.



**Figura 4.22.** a) Isotermas de adsorción y b) distribución del tamaño de poro de la muestra C8a.

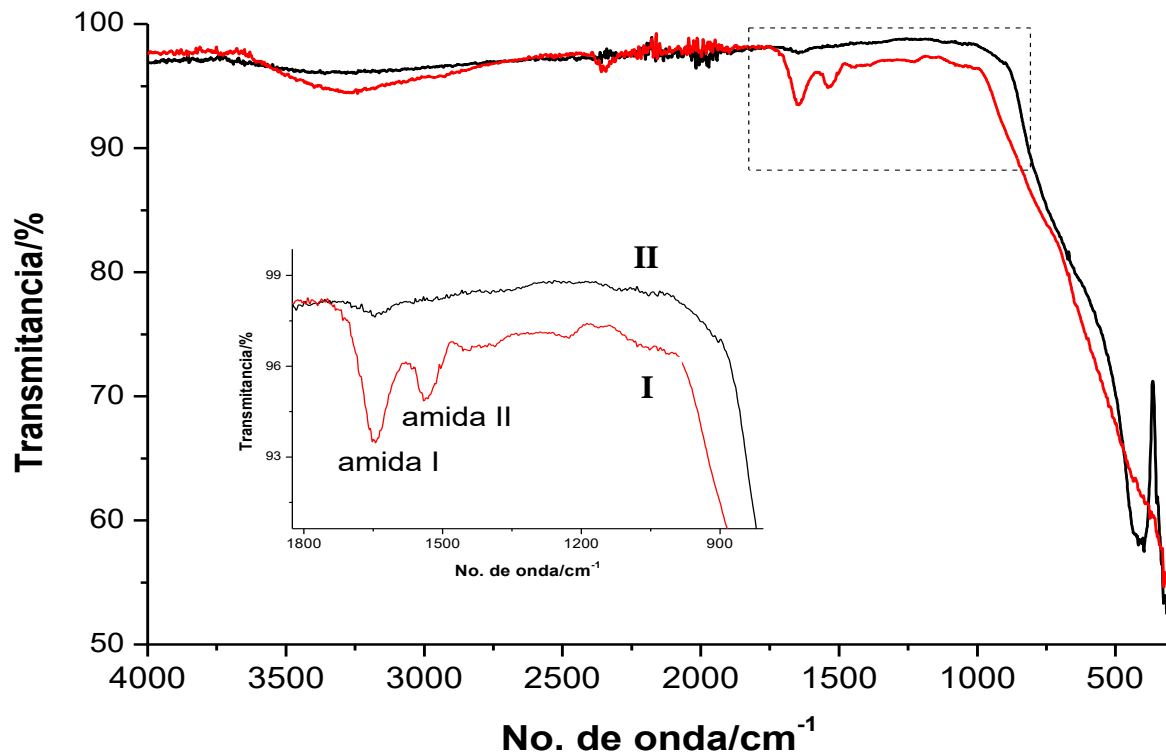
Como ya se comentó con los resultados del ciclo 6, la concentración del fago 0.1 mg/mL es insuficiente para obtener poros ordenados. En la Figura 4.23a se muestra una micrografía de la muestra mesoporosa C8a, aunque no se observa el ordenamiento de poros como en la Figura 4.17c, se observan poros de 6.5 nm de diámetro que es muy cercano al calculado de la isoterma de adsorción con NLDFT.

Una de las razones por las cuales se proponía modificar la cápside del fago era que, al tener grupos funcionales adecuados, la reacción podría dar productos cristalinos a temperatura ambiente. Al no poder adaptar el fago para la síntesis de anatasa, la muestra sin tratamiento térmico no muestra fases cristalinas, pero al calcinar para remover el fago se obtiene un patrón de difracción correspondiente a la fase anatasa (Figura 23b).



**Figura 4.23.** a) Imagen de TEM de TiO<sub>2</sub> mesoporoso de la muestra C8a, b) difractograma de rayos X del TiO<sub>2</sub> mesoporoso de la muestra C8a I) sin calcinar y II) calcinado a 500 °C.

La presencia del fago en el sólido formado se pudo confirmar por espectroscopía infrarroja. En la Figura 4.24 se muestran los espectros de infrarrojo de la muestra sin calcinar y calcinada. La banda asociada a los enlaces Ti-O ( $< \tilde{\nu} 800 \text{ cm}^{-1}$ ) es la más intensa y la división de dicha banda en la muestra calcinada se genera por el cambio de TiO<sub>2</sub> amorfo a cristalino (en este caso anatasa). A diferencia de los espectros de infrarrojo en los materiales biomineralizados con los péptidos, en las reacciones con el fago sin calcinar únicamente aparecen dos bandas asociadas a proteína, la banda amida I en  $\tilde{\nu} 1648 \text{ cm}^{-1}$  y la banda amida II en  $\tilde{\nu} 1540 \text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas son las más intensas, por lo que incluso estando el fago dentro de la estructura de óxido de titanio pueden observarse, mientras que las más débiles son opacadas por la pared del mesoporo. La frecuencia a la que aparece la banda amida I es típica de una estructura de hélice alfa, que corresponde a la estructura de la proteína p8, corroborando que el ensamble filamentoso del fago se mantiene.



**Figura 4.24.** Espectro de infrarrojo de la muestra mesoporosa C8a, I) sin calcinar y II) calcinada a 500 °C.

#### Final de la optimización:

Después de 8 ciclos de síntesis se puede terminar la optimización, considerando que se obtuvieron dos tipos de materiales mesoporosos, ambos con tamaño de poro homogéneo. Los parámetros para su síntesis fueron los siguientes:

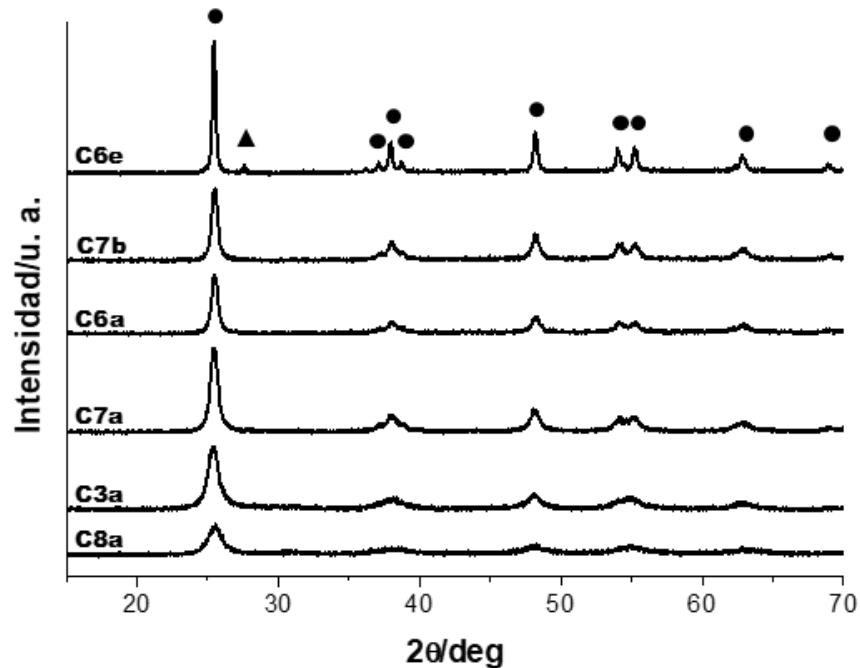
Tamaño medio del poro/nm	Área BET promedio/(m <sup>2</sup> /g)	pH de la solución del alcóxido de titanio	Relación molar Ti:p8	Concentración de la solución del fago M13/(mg/mL)	Relación molar Ti:OH
6.1	≈ 130	1.0-1.2	100:1	0.1	1:100-250
8.2	≈ 80	1.5-2.0	100-250:1	≤ 0.1	1:100-500

Las muestras mesoporosas preparadas con estos parámetros presentan dos distribuciones de tamaño de poro, una de tamaño medio 8.2 nm y la otra de 6.1 nm. Considerando que el fago

usado como plantilla tiene un diámetro fijo, es importante explicar por qué se obtienen dos distribuciones de poro. En primer lugar, ya se descartó la posibilidad de aglomeración al momento de formar el  $\text{TiO}_2$ , pues al usar la concentración de solapamiento también se obtienen poros de 8.2 nm. Una posible explicación de este comportamiento es el hecho de que, a pesar de realizar la calcinación a condiciones similares, el ancho de la pared del poro influye en la estabilidad térmica. Por ello, se hizo un análisis de tamaño de cristal utilizando los difractogramas de rayos X de polvos de las muestras. Todas las muestras de  $\text{TiO}_2$  presentan picos de difracción correspondientes a la fase de anatasa, sin embargo, la anchura de los picos de difracción es diferente (Figura 4.25), lo cual se relaciona con el tamaño de cristal por la ecuación de Scherrer.

En la Tabla 4.3 se muestra un resumen de las reacciones con las características más relevantes. Se observa que los mesoporos obtenidos en las reacciones C8a y C3a tienen tamaño de poro de 6.1 nm y tamaño de cristal menor a 10 nm, mientras que aquellos provenientes de las reacciones C6a, C7a y C7b tienen tamaño de poro de 8.2 nm y el tamaño de cristal es mayor (13-16 nm). Así, los poros con una pared más gruesa presentan mejor estabilidad térmica lo que permite conservar poros con el diámetro máximo del fago (8.0 nm), mientras que los poros conformados por cristales más pequeños se contraen para dar poros más estrechos. Finalmente, el sólido no poroso de la reacción C6e tiene un tamaño del cristal de 31.3 nm, mucho mayor a las muestras mesoporosas, resultado de la condensación rápida de las especies de titanio. Esto confirma que el tamaño de cristal está relacionado con el grosor de la pared del poro y su estabilidad térmica.

Por otro lado, el área específica es mayor cuando el tamaño de poro es menor. Por una parte, podría ser producto de la presencia de mayor porosidad (número de poros o poros de mayor longitud) en la muestra con diámetros de poro de 6.1 nm. Sin embargo, tomando en cuenta que el volumen de poro de las muestras de 8.2 nm y las de 6.1 nm sólo varía entre 18-20  $\text{cm}^3/\text{g}$  y como la relación molar  $\text{Ti}:\text{p8}$  se conserva, la mesoporosidad es prácticamente igual en ambos materiales, por lo que no explica el aumento de área superficial específica. Por otro lado, considerando los resultados de tamaño de cristal, las muestras de 6.1 nm tienen una pared de poro más delgada, lo que implica que la misma cantidad de poros está formada por menos  $\text{TiO}_2$  dando un incremento en el área superficial específica. Esta discusión tomó en cuenta que la microporosidad es inexistente, por lo que el área específica corresponde totalmente a los mesoporos.



**Figura 4.25.** Patrones de difracción de algunas muestras de  $\text{TiO}_2$  sintetizado usando el fago M13, los círculos indican los picos correspondientes a la fase anatasa y en triángulos a la de rutilo. Los detalles de la síntesis son mostrados en la Tabla 4.4.

**Tabla 4.4.** Comparación de las reacciones de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso.

Clave	[fago]/ (mg/mL)	Relación molar		$D_{\text{cristal}}/$ nm	$A_{\text{BET}}/$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	$D_{\text{NLDFT}}/$ nm	$V_{\text{T}}/$ ( $\text{cm}^3/\text{g}$ )
		Ti:p8	Ti:OH				
C8a	0.1	1:100	1:250	8	130	6.1	0.19
C3a	0.1	1:100	1:100	9	132	6.1	0.21
C7a	0.1	1:100	1:500	13	78	8.2	0.18
C6a	0.1	1:250	1:250	16	85	8.2	0.19
C7b	0.05	1:100	1:250	16	83	8.2	0.21
C6e	6.0	1:100	1:100	31	22	-	-

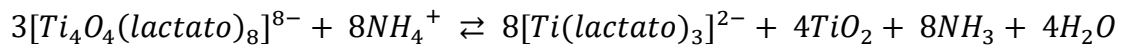
[fago] concentración de la solución del fago,  $D_{\text{cristal}}$  diámetro medio del cristal de anatasa por la ecuación de Scherrer,  $A_{\text{BET}}$  área superficial específica BET,  $D_{\text{NLDFT}}$  diámetro medio de poro,  $V_{\text{T}}$  volumen total de poro.

Finalmente, el área superficial específica de los materiales con una distribución del tamaño de poro más estrecha fue de alrededor de 80 y 130  $\text{m}^2/\text{g}$  para los poros de 8.2 y 6.1 nm respectivamente. Si los comparamos con los mesoporos de dióxido de titanio reportados en la

literatura (Tabla 1.2), existen materiales sintetizados con áreas de hasta  $1200 \text{ m}^2/\text{g}$ ,<sup>28</sup> un orden de magnitud de diferencia con respecto a los sintetizados con el fago. Sin embargo, en ningún reporte de síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso se hace distinción entre el volumen de poro debido a los mesoporos y el de los microporos. Esto complica la comparación en nuestro caso, pues a pesar de tener un área específica pequeña en comparación a las obtenidas por otras rutas de síntesis, el  $\text{TiO}_2$  sintetizado con el fago tiene un área exclusivamente debida a mesoporos. Mientras que en trabajos donde reportan alta área superficial se observa en las isothermas de adsorción de nitrógeno un gran volumen adsorbido a baja presión relativa, indicando que los microporos son los responsables de una gran parte del área específica.<sup>29</sup>

#### 4.4.1.2 Dihidroxilactatotitanato(IV) de bis-amonio (TiBALDH)

Contrastando con la reactividad de los alcóxidos de titanio, el TiBALDH es muy estable en agua. No obstante, presenta un equilibrio de formación de  $\text{TiO}_2$  dependiente de iones amonio:<sup>99</sup>



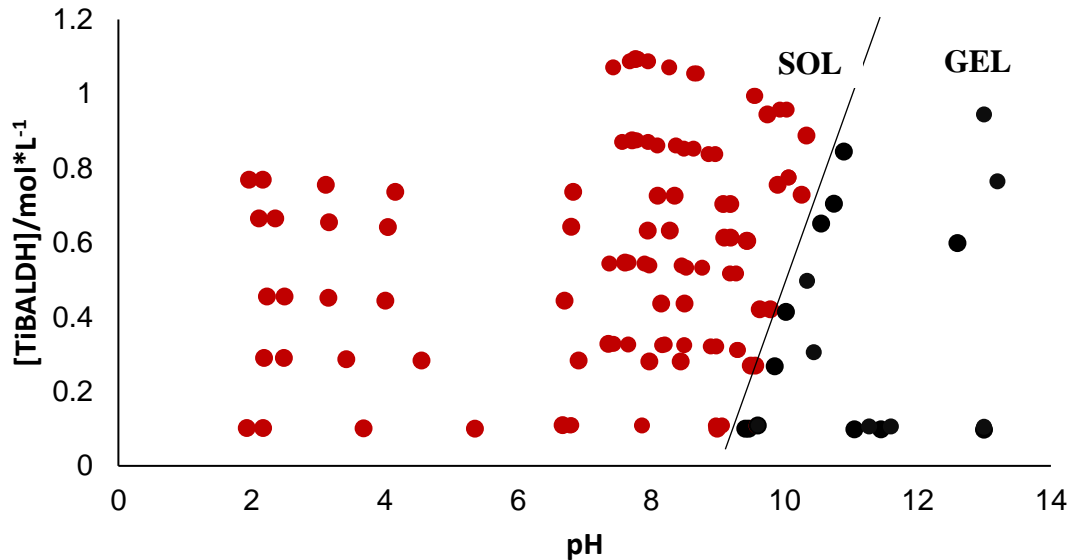
Si consideramos la regla de Ostwald,<sup>14</sup> las fases metaestables son las que inicialmente se forman en un proceso de nucleación. En nuestro caso, la fase cristalina que se busca es la fase metaestable de anatasa. Por lo tanto, si se utiliza TiBALDH como precursor de  $\text{TiO}_2$ , se puede alcanzar la cristalinidad a temperatura ambiente si la nucleación es adecuada a partir del equilibrio químico.

Las variables consideradas para la reacción con TiBALDH fueron las mismas que las usadas para el isopropóxido de titanio, no obstante, debido a su naturaleza química tan distinta, los valores de cada variable fueron diferentes.

Para elegir el pH al cual se llevaría a cabo la reacción de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso usando TiBALDH fue importante evaluar la reactividad del TiBALDH respecto al pH. Para ello se prepararon soluciones acuosas de TiBALDH a diferentes concentraciones y valores de pH desde 2 a 13. A pH alrededor de 10 las soluciones de TiBALDH tienden a formar un gel, sugiriendo que se llevan a cabo reacciones de condensación. En la Figura 4.26 se muestra un diagrama de fases del TiBALDH respecto al pH. La formación de un gel es similar a los observados en procesos de fracturación hidráulica (fracking) cuando se usan complejos de lactato con Ti o Zr<sup>100</sup>. Lamentablemente, no existen estudios sobre cómo es el proceso de reacción del TiBALDH o las condiciones específicas a las que se forma el gel (la mayoría de estos procesos están protegidos por patentes). Una posible explicación de la reactividad del TiBALDH en ambientes



alcalinos es que al contener iones amonio para estabilizar la carga del anión de oxolactatotitanato  $[Ti_4O_4(lactato)_8]^{8-}$ , se desestabilice por la adición de hidroxilos y posterior formación del amoniaco gaseoso. El olor a amoniaco desprendido al agregar hidróxido de sodio al TiBALDH es evidente en soluciones concentradas. También existe la posibilidad de que los lactatos se autoesterifiquen bajo condiciones básicas y haya un entrecruzamiento formando una red de cadenas de lactato coordinando átomos de titanio o interaccionando por puentes de hidrógeno sobre las nanopartículas de óxido de titanio formadas.<sup>101</sup>



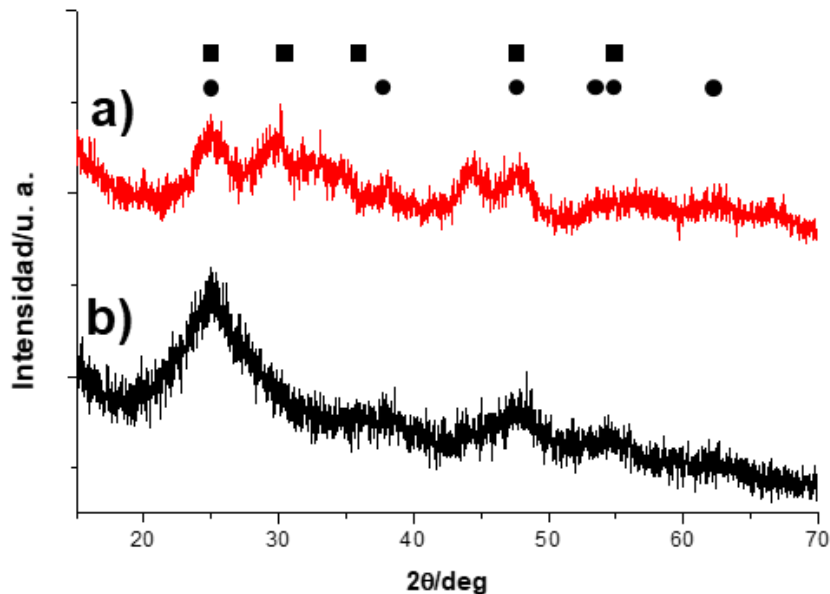
**Figura 4.26.** Diagrama de fases del TiBALDH respecto al pH.

Retomando lo anterior, la formación de un gel de  $TiO_2$  en agua es de suma utilidad para trabajar con el M13. Por ello se empleó el TiBALDH para formar un gel en presencia del fago y así atraparlo en la red formada de  $TiO_2$  para posteriormente calcinarlo para dejar cavidades mesoporosas. En la Figura 4.27 se muestran difractogramas de rayos X de una muestra preparada con TiBALDH al ajustar el pH 11 con hidróxido de sodio. En la muestra sin calcinar se observan patrones de difracción correspondientes a anatasa (Figura 4.27a), que se modifica a una estructura de brookita posterior a su calcinación (Figura 4.27b). Estos resultados muestran que es posible la síntesis de  $TiO_2$  en su fase de anatasa a temperatura ambiente usando TiBALDH, lo que permitiría usar el virus como agente de sacrificio para la formación de estructuras porosas cristalinas.

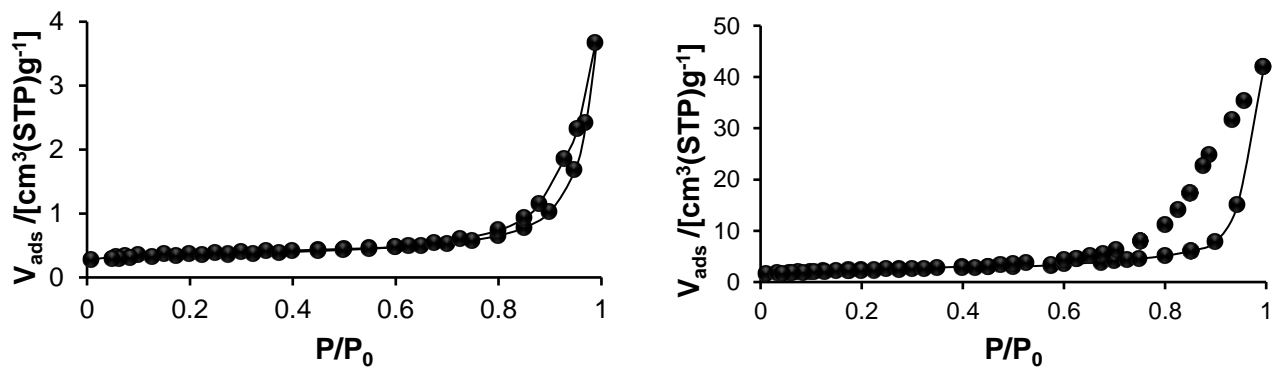
No obstante, los resultados de adsorción de nitrógeno muestran prácticamente nula porosidad, y un área superficial específica máxima de  $8.4 \text{ m}^2/\text{g}$  (Figuras 4.28a, b), por lo que el método empleado para la síntesis de  $TiO_2$  mesoporoso no fue eficiente. Como un intento para mejorar

la porosidad se probaron concentraciones de hasta 10 mg/mL de fago, pero la adsorción de nitrógeno no mostró mesoporosidad.

El TiBALDH, a pesar de poder formar fases cristalinas de  $\text{TiO}_2$ , no se logró adaptar a la síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso con el fago M13. Resulta necesario una mejor comprensión de su reactividad para poder emplearlo en síntesis suaves guiadas por biomoléculas tales como el fago o los péptidos. Sería deseable poder sintetizar  $\text{TiO}_2$  con este precursor pues además de poder usar únicamente agua como solvente, los grupos lactato le permitirían su empleo para materiales biológicamente compatibles.



**Figura 4.27.** Difractograma de rayos X del gel formado ajustando el pH con hidróxido de sodio. a), secado a temperatura ambiente. b), calcinado a 500 °C. Los círculos indican la posición de los picos de difracción correspondientes a la fase anatasa y los cuadros a la de brookita.



**Figura 4.28.** Isothermas de adsorción de nitrógeno de  $\text{TiO}_2$  preparado con TiBALDH y el fago. a) Usando una solución de 4.0 mg/mL de fago. b) Usando una solución de 10 mg/mL de fago.

## 5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1 Conclusiones

Se logró la síntesis de  $\text{TiO}_2$  mesoporoso con isopropóxido de titanio y el fago derivado del vector M13mp18. El fago como plantilla semi-rígida permitió obtener materiales mesoporosos con nula microporosidad. La síntesis se controló con un pH ácido adecuado para evitar la aglomeración del fago, pudiendo obtener una distribución del tamaño de poro homogénea incluso a una concentración de 0.1 mg/mL, dos veces mayor a la concentración de solapamiento. Con esta metodología es posible obtener dos distribuciones de tamaño de poro (6.1 y 8.2 nm) con sólo ajustar la relación molar de Ti:p8 y el pH. El tamaño medio de poro y su área superficial específica está relacionado con el tamaño de los cristales de anatasa que forman la pared del poro. Mientras más delgada sea la pared del poro la estabilidad de las paredes del poro al calcinar es menor lo que provoca un tamaño de poro más pequeño, pero con mayor área superficial específica debido a la menor cantidad de masa de cada poro.

Se estudió la estabilidad de un posible precursor para la síntesis de  $\text{TiO}_2$ , el complejo de titanio TiBALDH, donde su reactividad está relacionada con su concentración. En soluciones concentradas su reactividad llega a inhibirse, por lo que es importante trabajar a concentraciones  $\leq 0.1$  M para asegurar que la reactividad no esté influida por su concentración. Este comportamiento se observó con iones fosfato, los cuales reaccionan con TiBALDH diluido sin importar su estado de protonación o si está enlazado a otros grupos. También el pH provoca la condensación del TiBALDH para formar  $\text{TiO}_2$ , a  $\text{pH} \geq 10$  el TiBALDH forma un gel blanco, compuesto de nanopartículas de anatasa, probablemente atrapadas en una red de lactados autoesterificados.

La síntesis de  $\text{TiO}_2$  con TiBALDH y el fago derivado del vector M13mp18 produjo materiales con baja área superficial específica, pero a diferencia del material mesoporoso preparado a partir del isopropóxido de titanio, los óxidos obtenidos con este precursor a temperatura ambiente son cristalinos, por lo que el TiBALDH podría servir para la síntesis de otro tipo de estructuras de  $\text{TiO}_2$  biocompatibles.

El *biopanning* utilizando el TiBALDH como precursor de  $\text{TiO}_2$  permitió hallar secuencias con probable actividad biomineralizante: TNWQALAYMQRH (TN), ENHWSLSTLMSS (EN), GLHTSATNLYLH (GL), TWYPNRPPILEL (TW). Los péptidos TN y EN fueron usados para la biomineralización de  $\text{TiO}_2$  a partir del precursor TiBALDH, donde ambos presentaron actividad en el medio amortiguado con Tris 0.1 M pH 8.0 produciendo nanopartículas cristalinas de  $\text{TiO}_2$

de ~ 5 nm a temperatura ambiente. A pH 4.5 en medio de acetatos la secuencia EN es menos activa que la TN, requiriendo una concentración mayor para iniciar la biomineralización. Estos cambios de reactividad dependientes del pH se pueden atribuir a los diferentes estados de protonación de los péptidos principalmente al ácido glutámico en EN.

La modificación genética del fago M13 para insertar las secuencias peptídicas H1 (HKKPSKS) y H3 (HHHSPSHS) no fue posible debido a la gran cantidad de residuos básicos de las secuencias (exceso de cargas positivas), lo cual impide el ensamblaje del fago dentro de la bacteria. Para asegurar la viabilidad en la replicación del fago es importante que el balance de cargas en la proteína p8 se conserve, además de tomar en cuenta las limitaciones de la bacteria para codificar y replicar ciertos residuos.

## 5.2 Perspectivas

- Sintetizar TiO<sub>2</sub> mesoporoso usando el fago modificado químicamente con el péptido H1 y compararlo con el obtenido al usar el fago prístino.
- Estudiar a detalle las propiedades fisicoquímicas del TiBALDH para poder controlar la formación de estructuras cristalinas de TiO<sub>2</sub> a temperatura ambiente incluso sin la necesidad de una plantilla biológica.
- Modificar genéticamente la proteína p8 del fago M13 insertando las secuencias halladas en el *biopanning*. Una vez lograda la mutación genética, biomineralizar TiO<sub>2</sub> usando el fago modificado y TiBALDH. Comparar los resultados con la síntesis con alcóxidos y el fago prístino.
- Usar las secuencias restantes (DW, GL, TW) halladas en el *biopanning* para biomineralizar TiO<sub>2</sub>, compararlas con las secuencias TN y EN usadas en este trabajo.
- Probar la eficiencia de los materiales mesoporosos en aplicaciones tales como fotocatalisis (degradación de compuestos) y almacenamiento de energía (celdas).

## 6 REFERENCIAS

1. Chen, X.; Mao, S. S., Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (7), 2891-959.
2. Mital, G. S.; Manoj, T., A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chinese. Sci. Bull.* **2011**, *56* (16), 1639–1657.
3. Selloni, A., Crystal growth: Anatase shows its reactive side. *Nat. Mater.* **2008**, *7* (8), 613-614.
4. Dickerson, M. B.; Sandhage, K. H.; Naik, R. R., Protein- and peptide-directed syntheses of inorganic materials. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (11), 4935-4978.
5. Reyes-Coronado, D.; Rodríguez-Gattorno, G.; Espinosa-Pesqueira, M. E.; Cab, C.; de Coss, R.; Oskam, G., Phase-pure TiO<sub>2</sub> nanoparticles: anatase, brookite and rutile. *Nanotechnology* **2008**, *19* (14), 145605.
6. Diebold, U., The surface science of titanium dioxide. *Surf. Sci. Rep.* **2003**, *48* (5-8), 53-229.
7. Vinogradov, A. V.; Ermakova, A. e. V.; Butman, M. F.; Hey-Hawkins, E.; Vinogradov, V. V., A facile sol–gel synthesis of impurity-free nanocrystalline titania. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (22), 10614-10619.
8. Chase, M. W., *NIST-JANAF thermochemical tables*. 4th ed.; American Chemical Society & American Institute of Physics for the National Institute of Standards and Technology: Washington, DC. New York, 1998.
9. Ranade, M. R.; Navrotsky, A.; Zhang, H. Z.; Banfield, J. F.; Elder, S. H.; Zaban, A.; Borse, P. H.; Kulkarni, S. K.; Doran, G. S.; Whitfield, H. J., Energetics of nanocrystalline TiO<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2002**, *99* (Suppl. 2), 6476-6481.
10. Kumar, S. G.; Rao, K. S. R. K., Polymorphic phase transition among the titania crystal structures using a solution-based approach: from precursor chemistry to nucleation process. *Nanoscale* **2014**, *6* (20), 11574-11632.
11. Sarikaya, M.; Tamerler, C.; Jen, A. K.-Y.; Schulten, K.; Baneyx, F., Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. *Nat. Mater.* **2003**, *2* (9), 577-585.
12. Avnir, D.; Coradin, T.; Lev, O.; Livage, J., Recent bio-applications of sol–gel materials. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16* (11), 1013-1030.
13. Dong, Q.; Su, H.; Cao, W.; Zhang, D.; Guo, Q.; Zhang, F., Assembly and Formation of Biomimetic Tin Dioxide by a Biomimetic Sol–Gel Approach Involving Glycoprotein. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 2265-2273.

14. Navrotsky, A., Energetic clues to pathways to biomineralization: Precursors, clusters, and nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2004**, *101* (33), 12096-12101.
15. Vinogradov, A. V.; Vinogradov, V. V., Low-temperature sol-gel synthesis of crystalline materials. *RSC Adv.* **2014**, *4* (86), 45903-45919.
16. Rajendra Prasad, M. B.; Pathan, H. M., Room temperature synthesis of rutile titania nanoparticles: a thermodynamic perspective. *Eur. Phys. J. D* **2014**, *68*:25.
17. Seisenbaeva, G. A.; Daniel, G.; Nedelec, J.-M.; Kessler, V. G., Solution equilibrium behind the room-temperature synthesis of nanocrystalline titanium dioxide. *Nanoscale* **2013**, *5* (8), 3330-3336.
18. Tamerler, C.; Sarikaya, M., Genetically Designed Peptide-Based Molecular Materials. *ACS Nano* **2009**, *3* (7), 1606-1615.
19. Dickerson, M. B.; Sandhage, K. H.; Naik, R. R., Protein- and peptide-directed syntheses of inorganic materials. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (11), 4935-4978.
20. Lee, Y. J.; Yi, H.; Kim, W. J.; Kang, K.; Yun, D. S.; Strano, M. S.; Ceder, G.; Belcher, A. M., Fabricating Genetically Engineered High-Power Lithium Ion Batteries Using Multiple Virus Genes. *Science* **2009**, *324*, 1051-1055.
21. Neltner, B.; Peddie, B.; Xu, A.; Doenlen, W.; Durand, K.; Yun, D. S.; Speakman, S.; Peterson, A.; Belcher, A., Production of Hydrogen Using Nanocrystalline Protein-Templated Catalysts on M13 Phage. *ACS Nano* **2010**, *4* (6), 3227-3235.
22. Li, W.; Wu, Z.; Wang, J.; Elzatahry, A. A.; Zhao, D., A Perspective on Mesoporous TiO<sub>2</sub> Materials. *Chem. Mater.* **2014**, *26* (1), 287-298.
23. Shi, Y.; Wan, Y.; Zhao, D., Ordered mesoporous non-oxide materials. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (7), 3854-3878.
24. Zaman, M. S.; Haberer, E. D., M13 Bacteriophage-Assisted Biomineralization of Copper Sulfide. *Mater. Res. Soc. symp. proc.* **2013**, *1445*, 1445.
25. Miyazawa, K.; Inagaki, S., Control of the microporosity within the pore walls of ordered mesoporous silica SBA-15. *Chem. Commun.* **2000**, (21), 2121-2122.
26. Zhang, R.; Elzatahry, A. A.; Al-Deyab, S. S.; Zhao, D., Mesoporous titania: From synthesis to application. *Nano Today* **2012**, *7* (4), 344-366.
27. Crossland, E. J. W.; Noel, N.; Sivaram, V.; Leijtens, T.; Alexander-Webber, J. A.; Snaith, H. J., Mesoporous TiO<sub>2</sub> single crystals delivering enhanced mobility and optoelectronic device performance. *Nature* **2013**, *495* (7440), 215-219.

28. Yoshitake, H.; Sugihara, T.; Tatsumi, T., Preparation of Wormhole-like Mesoporous TiO<sub>2</sub> with an Extremely Large Surface Area and Stabilization of Its Surface by Chemical Vapor Deposition. *Chem. Mater.* **2002**, *14* (3), 1023-1029.
29. Stone, V. F.; Davis, R. J., Synthesis, Characterization, and Photocatalytic Activity of Titania and Niobia Mesoporous Molecular Sieves. *Chem. Mater.* **1998**, *10* (5), 1468-1474.
30. Tian, B.; Yang, H.; Liu, X.; Xie, S.; Yu, C.; Fan, J.; Tu, B.; Zhao, D., Fast preparation of highly ordered nonsiliceous mesoporous materials via mixed inorganic precursors. *Chem. Commun.* **2002**, (17), 1824-1825.
31. Casino, S.; Di Lupo, F.; Francia, C.; Tuel, A.; Bodoardo, S.; Gerbaldi, C., Surfactant-assisted sol gel preparation of high-surface area mesoporous TiO<sub>2</sub> nanocrystalline Li-ion battery anodes. *J. Alloys Compd.* **2014**, *594*, 114-121.
32. Kim, S. S.; Lee, H. I.; Shon, J. K.; Hur, J. Y.; Kang, M. S.; Park, S. S.; Kong, S. S.; Yu, J. A.; Seo, M.; Li, D.; Thakur, S. S.; Kim, J. M., Preparation of Highly Ordered Mesoporous TiO<sub>2</sub> Materials with Crystalline Framework from Different Mesostructured Silica Templates via Nanoreplication. *Chem. Lett.* **2008**, *37* (2), 140-141.
33. Zhang, Z.; Zuo, F.; Feng, P., Hard template synthesis of crystalline mesoporous anatase TiO<sub>2</sub> for photocatalytic hydrogen evolution. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (11), 2206-22012.
34. Yue, W.; Random, C.; Attidekou, P. S.; Su, Z.; Irvine, J. T. S.; Zhou, W., Syntheses, Li Insertion, and Photoactivity of Mesoporous Crystalline TiO<sub>2</sub>. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (17), 2826-2833.
35. Groenke, N.; Seisenbaeva, G. A.; Kaminsky, V.; Zhivotovsky, B.; Kost, B.; Kessler, V. G., Structural characterization, solution stability, and potential health and environmental effects of the Nano-TiO<sub>2</sub> bioencapsulation matrix and the model product of its biodegradation TiBALDH. *RSC Adv.* **2012**, *2* (10), 4228-4235.
36. Day, L. A.; Marzee, C. J.; Reisberg, S. A.; Casadevall, A., ADN Packing in Filamentous Bacteriophages. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1988**, *17* (1), 509-539.
37. Marvin, D. A.; Hohn, B., Filamentous bacterial viruses. *Bacteriol. Rev.* **1969**, *33* (2), 172-209.
38. Sidhu, S. S., Engineering M13 for phage display. *Biomol. Eng.* **2001**, *18* (2), 57-63.
39. Overman, S. A.; Thomas, G. J., Filamentous ssADN Bacterial Viruses. In *Encyclopedia of Virology*, 3rd. ed.; Mahy, B.; van Regenmortel, M., Eds. Elsevier: Oxford, U.K., 2008; pp 190-198.

40. Gagic, D.; Ciric, M.; Wen, W. X.; Ng, F.; Rakonjac, J., Exploring the Secretomes of Microbes and Microbial Communities Using Filamentous Phage Display. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 429.
41. Dogic, Z.; Fraden, S., Ordered phases of filamentous viruses. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2006**, *11* (1), 47-55.
42. Vera-Robles, L. I.; González-Gracida, J.; Hernández-Gordillo, A.; Campero, A., Using the M13 Phage as a Biotemplate to Create Mesoporous Structures Decorated with Gold and Platinum Nanoparticles. *Langmuir* **2015**, *31* (33), 9188-9197.
43. Streips, U. N.; Yasbin, R. E., *Modern Microbial Genetics*. Wiley-Liss Imprint; John Wiley & Sons, Incorporated: Hoboken, 2002.
44. Messing, J., Cloning in M13 phage or how to use biology at its best. *Gene* **1991**, *100*, 3-12.
45. Nickels, P. C.; Ke, Y.; Jungmann, R.; Smith, D. M.; Leichsenring, M.; Shih, W. M.; Liedl, T.; Högberg, B., ADN Origami Structures Directly Assembled from Intact Bacteriophages. *Small* **2014**, *10* (9), 1765-1769.
46. Nasir, S. F.; Jaworski, J., Assessing the stability of assembled filamentous phage coat protein P8. *Supramol. Chem.* **2013**, *26* (5-6), 329-337.
47. Zimmermann, K.; Hagedorn, H.; Heuck, C. C.; Hinrichsen, M.; Ludwig, H., The ionic properties of the filamentous bacteriophages Pf1 and fd. *J. Biol. Chem.* **1986**, *261* (4), 1653-1655.
48. Yoo, P. J.; Nam, K. T.; Qi, J.; Lee, S.-K.; Park, J.; Belcher, A. M.; Hammond, P. T., Spontaneous assembly of viruses on multilayered polymer surfaces. *Nat. Mater.* **2006**, *5* (3), 234-240.
49. Branston, S. D.; Stanley, E. C.; Ward, J. M.; Keshavarz-Moore, E., Determination of the survival of bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2013**, *18* (3), 560-566.
50. Olofsson, L.; Ankarloo, J.; Andersson, P. O.; Nicholls, I. A., Filamentous bacteriophage stability in non-aqueous media. *Chem. Biol.* **2001**, *8* (7), 661-71.
51. Branston, S.; Stanley, E.; Keshavarz-Moore, E.; Ward, J., Precipitation of filamentous bacteriophages for their selective recovery in primary purification. *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28* (1), 129-36.
52. Purdy, K. R.; Fraden, S., Isotropic-cholesteric phase transition of filamentous virus suspensions as a function of rod length and charge. *Phys. Rev. E* **2004**, *70* (6), 061703.



53. Lee, S.-W.; Wood, B. M.; Belcher, A. M., Chiral Smectic C Structures of Virus-Based Films. *Langmuir* **2003**, *19* (5), 1592-1598.
54. Chung, W.-J.; Oh, J.-W.; Kwak, K.; Lee, B. Y.; Meyer, J.; Wang, E.; Hexemer, A.; Lee, S.-W., Biomimetic self-templating supramolecular structures. *Nature* **2011**, *478* (7369), 364-368.
55. Georgiou, G.; Stathopoulos, C.; Daugherty, P. S.; Nayak, A. R.; Iverson, B. L.; Iii, R. C., Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: From the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15* (1), 29-34.
56. Hernández-Gordillo, A.; Hernández-Arana, A.; Campero, A.; Vera-Robles, L. I., Biomimetic Sol–Gel Synthesis of TiO<sub>2</sub> and SiO<sub>2</sub> Nanostructures. *Langmuir* **2014**, *30* (14), 4084-4093.
57. Wei, Z.; Maeda, Y.; Matsui, H., Discovery of Catalytic Peptides for Inorganic Nanocrystal Synthesis by a Combinatorial Phage Display Approach. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (45), 10585-10588.
58. Buettner, K. M.; Valentine, A. M., Bioinorganic chemistry of titanium. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (3), 1863-81.
59. Dickerson, M. B.; Jones, S. E.; Ye Cai, G. A.; Naik, R. R.; Kröger, N.; Sandhage, K. H., Identification and Design of Peptides for the Rapid, High-Yield Formation of Nanoparticulate TiO<sub>2</sub> from Aqueous Solutions at Room Temperature. *Chem. Mater.* **2008**, *20*, 1578–1584.
60. Chen, H.; Su, X.; Neoh, K.-G.; Choe, W.-S., QCM-D Analysis of Binding Mechanism of Phage Particles Displaying a Constrained Heptapeptide with Specific Affinity to SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub>. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (14), 4872-4879.
61. Choi, N.; Tan, L.; Jang, J.-r.; Um, Y. M.; Yoo, P. J.; Choe, W.-S., The interplay of peptide sequence and local structure in TiO<sub>2</sub> biomineralization. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *115*, 20-27.
62. Hernández-Gordillo, A.. Diseño de bioplantillas para la síntesis de TiO<sub>2</sub>. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México, D. F., 2013.
63. Liu, Z.; Qiao, J.; Niu, Z.; Wang, Q., Natural supramolecular building blocks: from virus coat proteins to viral nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (18), 6178-6194.
64. Sambrook, J.; Russell, D. W., Growing Bacteriophage M13 in Liquid Culture. *C. S. H. Protoc.* **2006** (1), 3994.
65. Berkowitz, S. A.; Day, L. A., Mass, length, composition and structure of the filamentous bacterial virus fd. *J. Mol. Biol.* **1976**, *102* (3), 531-547.
66. Biolabs, N. E., Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries Instruction Manual. <https://www.neb.com/~media/Catalog/All->

[Products/BDA9A6DB00DC42E8B93A8D8FBD08C49B/Datacards%20or%20Manuals/manual E8100.pdf](#) (consultado el 17/02/2016).

67. Kochkar, H.; Triki, M.; Ghorbel, A., Preparation of stable mesoporous titanium oxides nanomaterials using soluble starch. *Stud. Surf. Sci. Catal.* **2006**, *162*, 377-384.
68. Ravikovitch, P. I.; Neimark, A. V., Characterization of Micro- and Mesoporosity in SBA-15 Materials from Adsorption Data by the NLDFT Method. *J. Phys. Chem. B.* **2001**, *105* (29), 6817-6823.
69. Brunauer, S.; Emmett, P. H.; Teller, E., Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *J. Am. Chem. Soc.* **1938**, *60* (2), 309-319.
70. Roth, T. A.; Weiss, G. A.; Eigenbrot, C.; Sidhu, S. S., A Minimized M13 Coat Protein Defines the Requirements for Assembly into the Bacteriophage Particle. *J. Mol. Biol.* **2002**, *322* (2), 357-367.
71. Greenwood, J.; Hunter, G. J.; Perham, R. N., Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and ADN. *J. Mol. Biol.* **1991**, *217* (2), 223-227.
72. Symmons, M. F.; Welsh, L. C.; Nave, C.; Marvin, D. A.; Perham, R. N., Matching Electrostatic Charge between ADN and Coat Protein in Filamentous Bacteriophage. Fibre Diffraction of Charge-deletion Mutants. *J. Mol. Biol.* **1995**, *245* (2), 86-91.
73. Iannolo, G.; Minenkova, O.; Petruzzelli, R.; Cesareni, G., Modifying Filamentous Phage Capsid: Limits in the Size of the Major Capsid Protein. *J. Mol. Biol.* **1995**, *248* (4), 835-844.
74. Li, Z.; Koch, H.; uuml; bel, S., Mutations in the N-Terminus of the Major Coat Protein (pVIII, gp8) of Filamentous Bacteriophage Affect Infectivity. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *6* (1), 57-66.
75. Weiss, G. A.; Wells, J. A.; Sidhu, S. S., Mutational analysis of the major coat protein of M13 identifies residues that control protein display. *Protein Sci.* **2008**, *9* (4), 647-654.
76. Kuzmicheva, G. A.; Jayanna, P. K.; Sorokulova, I. B.; Petrenko, V. A., Diversity and censoring of landscape phage libraries. *Protein Eng. Des. Sel.* **2008**, *22* (1), 9-18.
77. Merzlyak, A.; Lee, S.-W., Engineering Phage Materials with Desired Peptide Display: Rational Design Sustained through Natural Selection. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (12), 2300-2310.
78. Nakamura, Y., Codon usage tabulated from international ADN sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28* (1), 292-292.

79. Gu, T.; Tan, S.; Gou, X.; Araki, H.; Tian, D., Avoidance of Long Mononucleotide Repeats in Codon Pair Usage. *Genetics* **2010**, *186* (3), 1077-1084.
80. Park, S.; Lee, H.; Lee, S.-Y., Effect of peptide conformation on TiO<sub>2</sub> biomineralization. *Dalton Trans.* **2013**, *42* (38), 13817-13820.
81. Liu, C.; Jiang, Z.; Tong, Z.; Li, Y.; Yang, D., Biomimetic synthesis of inorganic nanocomposites by a de novo designed peptide. *RSC Adv.* **2014**, *4* (1), 434-441.
82. Zhao, C.-X.; Yu, L.; Middelberg, A. P. J., Design of low-charge peptide sequences for high-yield formation of titania nanoparticles. *RSC Adv.* **2012**, *2* (4), 1292-1295.
83. Sewell, S. L.; Wright, D. W., Biomimetic Synthesis of Titanium Dioxide Utilizing the R5 Peptide Derived from *Cylindrothecafusiformis*. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (13), 3108-3113.
84. Dickerson, M. B.; Jones, S. E.; Cai, Y.; Ahmad, G.; Naik, R. R.; Kröger, N.; Sandhage, K. H., Identification and Design of Peptides for the Rapid, High-Yield Formation of Nanoparticulate TiO<sub>2</sub> from Aqueous Solutions at Room Temperature. *Chem. Mater.* **2008**, *20* (4), 1578-1584.
85. Puddu, V.; Slocik, J. M.; Naik, R. R.; Perry, C. C., Titania Binding Peptides as Templates in the Biomimetic Synthesis of Stable Titania Nanosols: Insight into the Role of Buffers in Peptide-Mediated Mineralization. *Langmuir* **2013**, *29* (30), 9464-9472.
86. Cole, K. E.; Ortiz, A. N.; Schoonen, M. A.; Valentine, A. M., Peptide- and Long-Chain Polyamine-Induced Synthesis of Micro- and Nanostructured Titanium Phosphate and Protein Encapsulation. *Chem. Mater.* **2006**, *18* (19), 4592-4599.
87. Stote, R. E.; Filocamo, S. F.; Lum, J. S., Silaffin primary structure and its effects on the precipitation morphology of titanium dioxide. *J. Mater. Res.* **2016**, *31* (10), 1373-1382.
88. Cole, K. E.; Valentine, A. M., Spermidine and Spermine Catalyze the Formation of Nanostructured Titanium Oxide. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (5), 1641-1647.
89. Kharlampieva, E.; Jung, C. M.; Kozlovskaya, V.; Tsukruk, V. V., Secondary structure of silaffin at interfaces and titania formation. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (25), 5242-5250.
90. Kharlampieva, E.; Slocik, J. M.; Singamaneni, S.; Poulsen, N.; Kröger, N.; Naik, R. R.; Tsukruk, V. V., Protein-Enabled Synthesis of Monodisperse Titania Nanoparticles On and Within Polyelectrolyte Matrices. *Adv. Funct. Mater.* **2009**, *19* (14), 2303-2311.
91. Vodnik, M.; Zager, U.; Strukelj, B.; Lunder, M., Phage Display: Selecting Straws Instead of a Needle from a Haystack. *Molecules* **2011**, *16* (12), 790-817.
92. Kyle, H. F.; Wickson, K. F.; Stott, J.; Burslem, G. M.; Breeze, A. L.; Tiede, C.; Tomlinson, D. C.; Warriner, S. L.; Nelson, A.; Wilson, A. J.; Edwards, T. A., Exploration of the HIF-1 $\alpha$ /p300

- interface using peptide and Adhiron phage display technologies. *Mol. BioSyst.* **2015**, *11* (10), 2738-2749.
93. Richter, V. A.; Vaskova, A. A., Antitumor Potential of Lactaplin. *Biol. Med.* **2015**, s2:004.
94. Stuart, B. H., *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons Ltd: England, 2004.
95. Kessler, V. G.; Spijksma, G. I.; Seisenbaeva, G. A.; Håkansson, S.; Blank, D. H. A.; Bouwmeester, H. J. M., New insight in the role of modifying ligands in the sol-gel processing of metal alkoxide precursors: A possibility to approach new classes of materials. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2006**, *40* (2-3), 163-179.
96. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K., VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33-38.
97. Alongi, J.; Di Blasio, A.; Milnes, J.; Malucelli, G.; Bourbigot, S.; Kandola, B.; Camino, G., Thermal degradation of ADN, an all-in-one natural intumescent flame retardant. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *113*, 110-118.
98. Zhang, Z.; Buitenhuis, J.; Cukkemane, A.; Brocker, M.; Bott, M.; Dhont, J. K. G., Charge Reversal of the Rodlike Colloidal fd Virus through Surface Chemical Modification. *Langmuir* **2010**, *26* (13), 10593-10599.
99. Kessler, V. G., Aqueous route to TiO<sub>2</sub>-based nanomaterials using pH-neutral carboxylate precursors. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2013**, *68* (3), 464-470.
100. Barati, R.; Liang, J.-T., A review of fracturing fluid systems used for hydraulic fracturing of oil and gas wells. *J. Appl. Polym. Sci.* **2014**, *131* (16), 40735.
101. Hurnaas, T.; Plank, J., Behavior of Titania Nanoparticles in Cross-linking Hydroxypropyl Guar Used in Hydraulic Fracturing Fluids for Oil Recovery. *Energy Fuels* **2015**, *29* (6), 3601-3608.

## Apéndices

**Apéndice 1: Tabla de aminoácidos, estructura, abreviaciones y características**

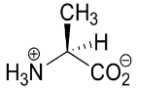
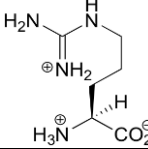
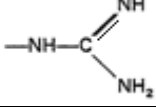
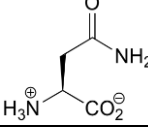
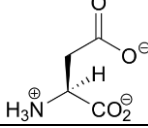
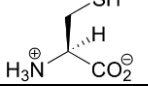
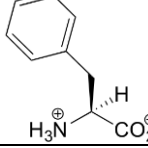
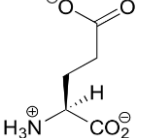
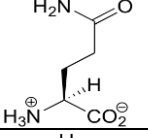
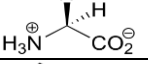
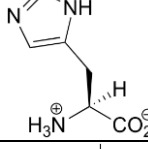
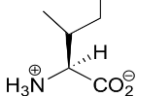
Nombre	Estructura	Abreviación		pI	Acidez/ basicidad <sup>a</sup>	Cadena lateral
		3 letras	1 letra			
Alanina		Ala	A	6.02	N	Alquilo -R
Arginina		Arg	R	10.76	B	Guanidino 
Asparagina		Asn	N	5.41	N	Amida -CONH2
Aspartato		Asp	D	2.98	A	Carboxilato -COO <sup>-</sup>
Cisteína		Cys	C	5.02	N <sup>b</sup>	Tiol -SH
Fenilalanina		Phe	F	5.48	N	Aromático -Ar
Glutamato		Glu	E	3.22	A	Carboxilato -COO <sup>-</sup>
Glutamina		Gln	Q	5.70	N	Amida -CONH2
Glicina		Gly	G	5.97	N	-H
Histidina		His	H	7.59	N <sup>c</sup>	Aromático -Ar
Isoleucina		Ile	I	6.02	N	Alquilo -R

Tabla de aminoácidos, estructura, abreviaciones y características (continuación).

Nombre	Estructura	Abreviación		pI	Acidez/ basicidad <sup>a</sup>	Cadena lateral
		3 letras	1 letra			
Leucina		Leu	L	5.98	N	Alquilo -R
Lisina		Lys	K	9.74	B	Amina -NH <sub>2</sub>
Metionina		Met	M	5.06	N	Tioéter -SMe
Prolina		Pro	P	6.30	N	Anillo N <sup>α</sup> 
Serina		Ser	S	5.68	N	Alcohol -OH
Treonina		Thr	T	5.60	N	Alcohol -OH
Triptófano		Trp	W	5.88	N	Aromático -Ar
Tirosina		Tyr	Y	5.67	N	Aromático -Ar
Valina		Val	V	5.97	N	Alquilo -R

<sup>a</sup>Cadenas laterales ácidas (A), básicas (B) o neutras (N); <sup>b</sup>La cisteína es ligeramente ácida debido al grupo tiol de la cadena lateral. <sup>c</sup>La histidina es ligeramente básica debido al imidazol de la cadena lateral.

## **Apéndice 2: Preparación de medios de cultivo y soluciones amortiguadoras**

- Luria Broth (LB)\*

Pesar 20 g por litro de medio. Agregar agua destilada y mezclar hasta disolver completamente.

Esterilizar a 121 °C por 15 min.

La composición por litro de este medio es: 10 g de peptona 140, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl.

- Luria Broth Agar (LB agar)\*

Pesar 32 g por litro de medio. Agregar agua destilada y mezclar vigorosamente. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

Composición por litro: 10 g de peptona 140, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 12 g de agar.

- Top agar\*

Pesar 16 g de LB agar y 10 g de LB por litro de medio. Agregar agua destilada y mezclar vigorosamente. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

- 2xYT\*

Pesar 31 g por litro de medio. Agregar agua destilada y mezclar hasta disolver completamente. Esterilizar a 121 °C por 15 min.

Composición por litro: 16 g de peptona 140, 10 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl.

- Gel de agarosa

Dependiendo del tamaño de la cadena de ADN será la concentración de agarosa.

1 % para tamaños de 3-8 kpb.

2.5 % para tamaños de 0.5-3 kpb

Se diluye en la solución amortiguadora TBE 1x y se calienta en un horno de microondas a potencia media hasta disolver completamente.

El voltaje de corrida fue de 75-90 V por 80-100 min.

---

\* A todos los medios de cultivo, antes de usarlos, se les agregó tetraciclina, concentración final 10 mg/L. En el caso de las cajas Petri con LB Agar también se les agregó IPTG/X-gal para mejor control en la titulación de placas.



- Solución amortiguadora de corrida TBE 10x

108 g de Tris base, 55 g de ácido bórico, 40 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0. Mezclar y aforar a 1 L, el pH final debe ser alrededor de 8.3.

Para usarlo al correr geles de agarosa, diluir 1 parte en 9 de agua.

- Gel de poliacrilamida (0.75 mm)

Dependiendo del tamaño de la proteína es el porcentaje de acrilamida en el gel.

Generalmente se utilizan dos concentraciones, 16 y 20%.

Para gel de 16%

2.133 mL de acrilamida 30%, 1 mL de Tris 1.5 M pH 8.8, 40 mL de SDS 10%, 0.82 mL de agua desionizada.

Para polimerizar el gel se le agrega 0.02 mL de persulfato de amonio 10% y 0.007 mL de TEMED.

Siempre se usó un gel bifásico, las concentraciones fueron para el gel concentrador 4%

0.2 mL de acrilamida 30%, 0.375 mL de Tris 0.5 M pH 6.8, 0.015 mL de SDS 10%, 0.9 mL de agua desionizada. Para polimerizar el gel se le agrega 0.007 mL de persulfato de amonio 10% y 0.003 mL de TEMED.

El uso de guantes en la preparación de este gel es requerido.

- Solución amortiguadora de corrida SDS

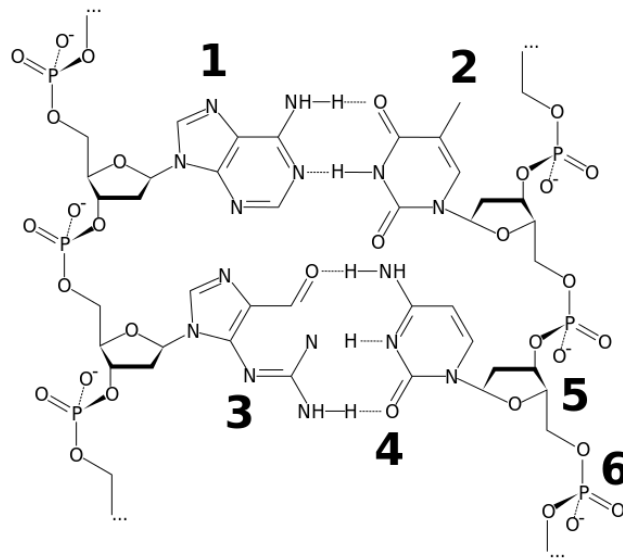
Como solución amortiguadora de corrida para la electroforesis en poliacrilamida se utilizó un sistema amortiguador de Tris 25 mM, glicina 190 mM y SDS 1%.

### Apéndice 3: Conceptos de biología molecular

#### ADN y proteínas

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es un polímero compuesto de nucleótidos. Un nucleótido se constituye de tres componentes, una base derivada de la purina o pirimidina que se enlaza a un azúcar cíclico y que a su vez se enlaza a un grupo fosfato. Existen cuatro nucleótidos principales, los cuales se distinguen por el tipo de base púrica o pirimidínica: adenina (A), citosina (C), timina (T) y guanidina (G). En la Figura A3.1 se muestra la estructura del ADN, donde los grupos púricos y pirimidínicos pueden formar puentes de hidrógeno para estabilizar la doble cadena de ADN. El ADN puede encontrarse como cadenas lineales o circulares compuestas por una sola hebra (cadena sencilla) o formando una doble cadena.

El ADN es el material genético de todos los organismos celulares y también de algunos virus. Su función principal es la de almacenar la información necesaria para su transcripción y posterior replicación de los organismos.



**Figura A3.1.** Estructura molecular del ADN. Se muestran los nucleótidos pirimidínicos adenina (1) y timina (2) y los púricos guanina (3) y citosina (4), los cuales pueden formar puentes de hidrógeno entre ellos y formar una doble cadena de ADN. La polimerización de los nucleótidos es posible por los grupos cíclicos de azúcar (5) que se enlazan a los grupos fosfato (6).

Las proteínas también son polímeros cuya unidad estructural son los aminoácidos. Si la cadena es pequeña (menos de cien aminoácidos) se denomina péptido. Existen veinte aminoácidos principales, todos ellos se componen de un grupo amino y un grupo carboxilo



bacteria utilizada con más frecuencia para este propósito es *Escherichia coli*.

Diversos descubrimientos científicos han sido de crucial importancia para el desarrollo de la tecnología de ADN recombinante. Los elementos participantes en la clonación molecular son: a) plásmidos, moléculas circulares de ADN capaces de replicarse dentro de una bacteria de manera independiente de su genoma; b) inserto, ADN de interés; c) enzimas de restricción, endonucleasas que cortan el ADN en secuencias específicas; d) ligasa de ADN, enzima capaz de unir por sus extremos dos fragmentos de ADN, lo que permite la formación de un ADN circular, y e) proceso de transformación, introducción del ADN recombinante manipulado in vitro en una célula hospedadora para su propagación, identificación y aislamiento.

El procedimiento de clonación de un gen o fragmento de ADN es una técnica en la que una secuencia de ADN es introducida en un virus o bacteria, los cuales son cultivados en condiciones que propicien su máximo crecimiento y tiene básicamente los siguientes pasos: 1) el aislamiento inicial o síntesis del fragmento de ADN de interés; 2) el acoplamiento de esta secuencia a un vehículo o vector portador, entendiéndose por vector a una molécula de ADN que es capaz de replicarse de modo independiente del genoma dentro de un sistema celular; 3) la incorporación del complejo vector-ADN en la célula hospedadora, procedimiento denominado transformación, y 4) la expresión del ADN en la célula hospedadora.

La secuencia de ADN introducida será entonces replicada junto con el ADN natural durante el crecimiento. Cuando se alcanza la cantidad necesaria, la secuencia de ADN puede ser extraída en cantidad equivalente al número de bacterias o virus producidos, logrando la amplificación de dicha secuencia. La técnica de clonación depende de un grupo de enzimas de restricción endonucleasas obtenidas de bacterias. Para clonar una secuencia, tanto el ADN de interés como el plásmido que se utilizará como vector son digeridos con una endonucleasa de restricción, generando fragmentos compatibles. En caso de la clonación de secuencias para inducir su expresión, cuando se introduce el vector con el inserto en las células donde se expresará, éstas mantendrán reprimida o inactiva la transcripción hasta que se añada al medio una sustancia inductora (por ejemplo, el IPTG) que active al promotor.

### **Referencias:**

- [1] A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA Replication*, University Science Books, USA. 2005.
- [2] C. Beas-Zárate, D. Ortuño-Sahagún, J. S. Armendáriz-Borunda, *Biología molecular: fundamentos y aplicaciones*, McGraw-Hill Interamericana, México, 2009.

#### **Apéndice 4: Clasificación IUPAC de isothermas de adsorción-desorción**

La adsorción ocurre cuando un fluido es expuesto a un sólido y se puede definir como un proceso donde hay un enriquecimiento de material o un aumento de la densidad de un fluido en la vecindad de una interfase.[1] La adsorción de gases es una técnica bien establecida para la caracterización textural de materiales porosos, donde se hace distinción entre microporos (tamaño de poro < 2 nm), mesoporos (tamaño de poro entre 2 y 50 nm) y macroporos (poros de tamaño > 50 nm).

##### **Tipos de isothermas de adsorción-desorción**

En general, la presentación de los resultados de isothermas de adsorción es mostrada gráficamente, donde la ordenada representa el volumen adsorbido y la abscisa la presión relativa en equilibrio ( $P/P^0$ ). Las curvas de adsorción se clasifican en ocho tipos según su forma (Figura A4.1).

Las isothermas del tipo I son reversibles y cóncavas a la abscisa. Están dadas por sólidos microporosos (carbón activado, zeolitas) donde la adsorción ocurre a muy baja presión relativa y se alcanza una meseta (plateau). Los microporos de dimensiones moleculares mejoran la interacción entre el adsorbente, por lo que la adsorción sucede a baja presión relativa e inmediatamente la formación del plateau debido a la poca área superficial externa. En isothermas de adsorción de nitrógeno y argón se distinguen las isothermas del tipo Ia que están dadas por materiales con microporosidad estrecha (< ~ 1 nm) y las del tipo Ib que están dadas por materiales con una distribución de tamaños más amplia de microporos e incluso con mesoporos estrechos (< ~ 2.5 nm).

Las isothermas del tipo II son reversibles, comienzan cóncavas a la abscisa, luego se mantienen lineales y finalmente convexas. Están dadas por la fisisorción sobre materiales macroporosos o no porosos que permiten adsorción multimolecular sin restricción a presiones relativas altas. Si la isoterma a baja presión relativa presenta una curvatura pronunciada, el punto B (isoterma II en la Figura A4.1) se considera como el punto donde se alcanza la adsorción de una monocapa (monomolecular) y comienza la formación de multicapas. El punto B da una estimación de la cantidad de moléculas del adsorbato necesarias para cubrir totalmente la superficie del sólido considerando una capa monomolecular. En algunos casos, estas isothermas pueden presentar un ciclo de histéresis debido a la condensación capilar entre

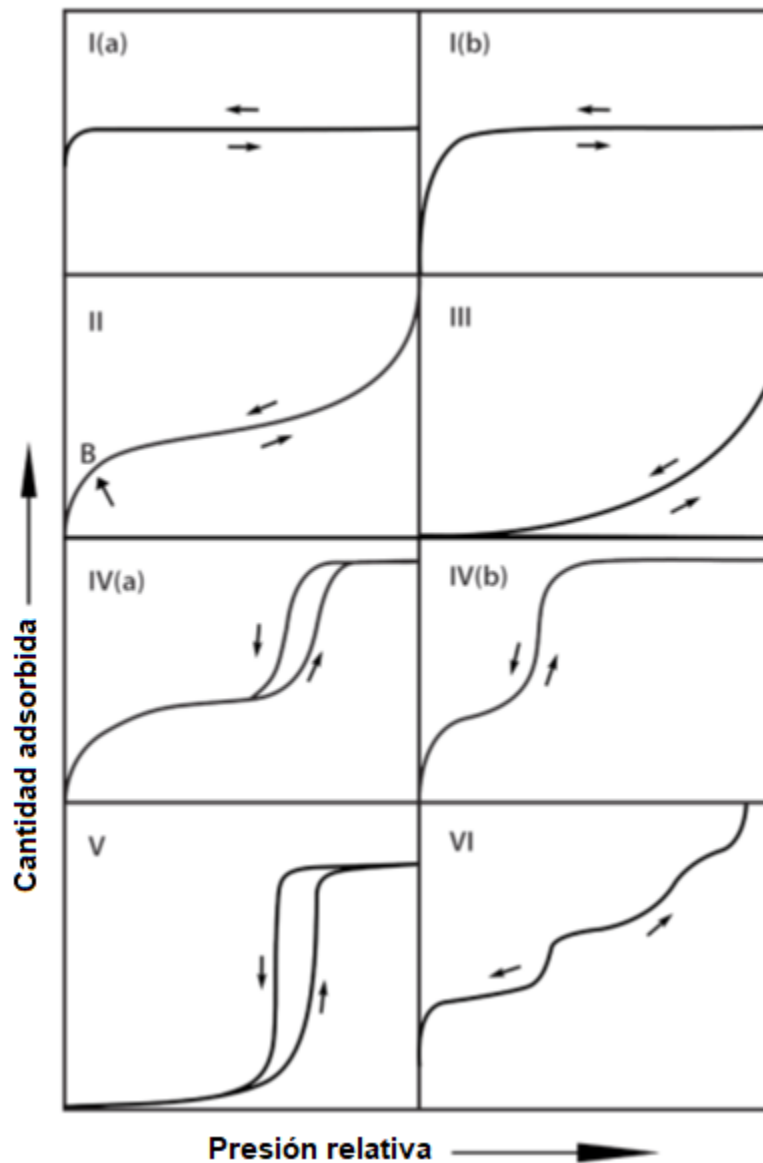
partículas (por ejemplo, en polvos o agregados).

Las isothermas del tipo III son convexas a la abscisa, por lo que no existe un punto B. Esta forma de isoterma indica una débil interacción entre el adsorbato y un adsorbente no poroso o macroporoso. Este tipo de isothermas son poco usuales.

Las isothermas del tipo IV presentan un comportamiento similar a las del tipo II a bajas presiones relativas y presentan un plateau a altas presiones relativas. Estas isothermas son características de materiales mesoporosos. Las isothermas del tipo IVa son más comunes que las del tipo IVb, presentan un ciclo de histéresis donde la curva inferior se debe a la progresiva adsorción del gas y la curva superior a su desorción. La histéresis está relacionada con el llenado y vaciado de los mesoporos por condensación capilar. Las isothermas del tipo IVb son reversibles y son dadas por materiales con mesoporos ordenados estrechos ( $< 4$  nm, por ejemplo, MCM-41) o mesoporos cónicos y cilíndricos cerrados por el extremo cónico.

Las isothermas del tipo V son inicialmente convexas a la abscisa y llega a un plateau a altas presiones relativas. Como en el caso de las isothermas del tipo III, estas son características de materiales con poca afinidad al adsorbato, pero con presencia de mesoporos o microporos, lo que provoca un ciclo de histéresis. Estas isothermas se presentan en la adsorción de agua sobre un material hidrofóbico micro o mesoporoso.

Las isothermas del tipo VI, o isothermas escalonadas, son poco usuales y se dan por procesos de adsorción capa por capa sobre una superficie no porosa altamente uniforme como el carbón grafitizado.



**Figura A4.1.** Clasificación de isothermas de fisorción.

### Tipos de ciclos de histéresis

Los ciclos de histéresis están relacionados con la condensación capilar, donde el proceso de adsorción ocurre de forma distinta al de desorción. En un poro cilíndrico abierto por los extremos (geometría cilíndrica), el retardo en la condensación es el resultado de la metaestabilidad de las multicapas adsorbidas. Esto implica que, en un arreglo de estos poros, la etapa de adsorción en el ciclo de histéresis no está en equilibrio termodinámico. Como la evaporación no implica nucleación, la etapa de desorción equivale a una transición reversible líquido-vapor.

Aunque se han reportado múltiples tipos de ciclos de histéresis, la IUPAC hace una distinción

de seis tipos principales (Figura A4.2). Estos ciclos de histéresis se relacionan con las características particulares de las estructuras porosas y su mecanismo de adsorción.

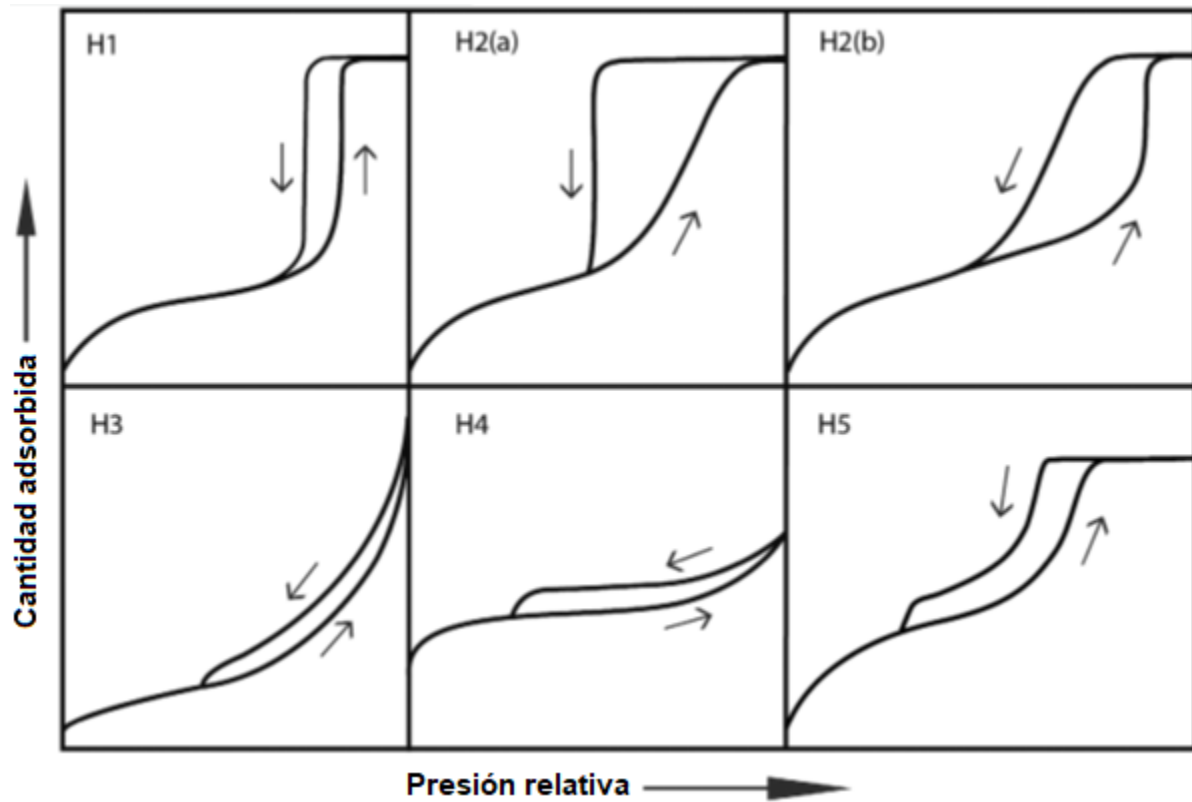
El ciclo de histéresis del tipo H1 es típico de materiales con una estrecha distribución de mesoporos uniformes (por ejemplo, MCM-41, SBA-15) y los efectos de red son mínimos. Se caracteriza por ser un ciclo estrecho con una pendiente muy pronunciada, resultando las curvas de adsorción y desorción casi paralelas.

El ciclo de histéresis del tipo H2 se presentan en materiales con estructuras mesoporosas más complejas, donde los efectos de red son importantes. Estos ciclos son anchos y se pueden diferenciar dos tipos de acuerdo con la curva de desorción. La histéresis del tipo H2a presenta una curva de desorción con una pendiente muy pronunciada debido a efectos de bloqueo de poro/percolación o evaporación inducida por cavitación (provocada por una distribución estrecha de cuellos en los poros). El ciclo de histéresis del tipo H2b también presenta bloqueo de poros, pero la distribución de los cuellos en los poros es más amplia lo que permite una evaporación menos abrupta (la curva de desorción no tiene una pendiente pronunciada).

El ciclo de histéresis del tipo H3 tiene una la curva de adsorción similar a la de la isoterma del tipo II, estos ciclos se dan en agregados de partículas formando placas (por ejemplo, las arcillas) donde la estructura es macroporosa. El ciclo de histéresis del tipo H4 es algo similar, pero la curva de adsorción es una combinación de las isotermas del tipo I y II, donde a presiones relativas bajas está asociado al llenado de poros. Este tipo de histéresis se presenta en agregados de partículas microporosas tales como zeolitas o carbones micro-mesoporosos. Finalmente, el ciclo de histéresis del tipo H5 es poco usual y su forma está asociada con ciertas estructuras porosas que tienen una combinación de mesoporos abiertos y parcialmente bloqueados (por ejemplo, sílices con arreglos hexagonales)

Como se puede observar en la Figura A4.2, los ciclos de histéresis del tipo H3, H4 y H5 presentan una característica general, la bajada abrupta de la curva de desorción que generalmente está localizada en un intervalo estrecho de presión relativa.





**Figura A4.2.** Clasificación de los ciclos de histéresis en isothermas de adsorción.

#### Referencias:

- [1] F. Rouquerol, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, P. Llewellyn & G. Maurin, *Adsorption by Powders and Porous: Solids Principles, Methodology and Applications*, 2nd ed., Academic Press, Poland, 2014.
- [2] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J. P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol & K. S.W. Sing, *Pure and Applied Chemistry*, 2015, 87(9-10), 1051-1069.