



**División de Ciencias Básicas e Ingeniería Departamento de
Química**

**“Síntesis de estructuras porosas (ZrO_2/SiO_2) mediante el uso
de biomoléculas como plantillas”**

Tesis que presenta:

Q. Jaqueline González Gracida

Parar obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Dirigida por:

Dra. Liliana Irais Vera Robles

Dr. Antonio Campero Celis

Sinodales:

Dr. Francisco J. Tzompantzi Morales

DR. Juan Marcos Esparza Schulz

Dr. Heriberto Pfeiffer Perea

Ciudad de México, abril de 2018.

Agradecimientos

A mis asesores.

Dra. Irais Vera y Dr. Antonio Campero por su gran apoyo, tiempo y motivación para la culminación de esta tesis.

A los miembros del jurado.

Dr. Francisco J. Tzompantzi, DR. Juan Marcos Esparza y Dr. Heriberto Pfeiffer, por la observación y supervisión de esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de la tesis de maestría (Becario: 592523)

A mi madre por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

A mis hermanos por su apoyo incondicional, y sus consejos en la vida.

Sobre todo, a mi esposo e hijo, por ser la motivación para cada día ser mejor mujer y profesional.

A mis amigas que al paso del tiempo me han acompañado en buenos y malos momentos para culminar este proyecto.

Gracias



SÍNTESIS DE ESTRUCTURAS
POROSAS (ZrO₂/SiO₂)
MEDIANTE EL USO DE
BIOMOLÉCULAS COMO
PLANTILLAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 27 del mes de abril del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. FRANCISCO JAVIER TZOMPANTZI MORALES
DR. HERIBERTO PFEIFFER PEREA
DR. JUAN MARCOS ESPARZA SCHULZ



JAQUELINE GONZALEZ GRACIDA
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (QUIMICA)
DE: JAQUELINE GONZALEZ GRACIDA

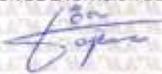
y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

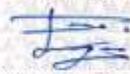
APROBAR

REVISO

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

DR. JESUS ALBERTO OCHOA TAPIA

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER TZOMPANTZI MORALES

VOCAL

DR. HERIBERTO PFEIFFER PEREA

SECRETARIO

DR. JUAN MARCOS ESPARZA SCHULZ

Índice

Resumen	1
Capítulo 1	3
1. Introducción	3
1.1. Materiales porosos ordenados	3
1.2 Materiales microporosos.....	3
1.3 Materiales mesoporosos	4
1.4 Antecedentes del uso de plantillas Biológicas	10
1.4 Estructura y características del Bacteriófago M13	14
1.5 Antecedentes de estructuras porosas empleando virus y bacteriófagos	18
1.6 Oxido de Zirconio	20
Capítulo 2	24
Hipótesis y Objetivos	24
2.1 Planteamiento del problema	24
2.2 Hipótesis.....	24
2.3 Objetivos	25
Capítulo 3	26
Materiales y Metodología	26
3.1 Estructuras porosas	26
3.2 Técnicas de caracterización	28
Capítulo 4	30
Resultados.....	30
4.1 Espectroscopia infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)	31
4.2 Difracción de Rayos X (DRX)	33
4.3 Microscopia de transmisión eléctrica (TEM)	38
4.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	41
4.5 Isotermas de adsorción-desorción de N ₂	45
Capítulo 5	47
5.1 Discusión	47
5.2 Conclusiones y perspectivas	51
Anexo A	53
Crecimiento y purificación del bacteriófago.....	53
Anexo B	55

Síntesis vía sol-gel	55
Anexo C	57
Carta cristalográfica de ZrO ₂	57
5.3 Referencias.....	61

Resumen

Actualmente existen numerosas plantillas para la síntesis de estructuras porosas, las cuales controlan la morfología y el tamaño de poro del material final. Además de la plantilla, diversos parámetros controlan la formación de la red inorgánica que forma las paredes de las estructuras porosas, tales como el medio (acuoso, mezcla de solventes), alcalinidad, reactividad de los precursores, relación molar del tensoactivo (plantilla)/precursor en el que se realiza la síntesis.

Por otro lado, el bacteriófago M13 ha sido ampliamente utilizado como plataforma en la síntesis y organización de nanomateriales. Gracias a sus características fisicoquímicas: monodispersidad, carga superficial, tamaño, forma, estabilidad térmica y química, así como a la diversidad de grupos funcionales que posee en la superficie. Otra característica importante es su capacidad de auto-organizarse y ensamblarse en cristales líquidos, convirtiéndolo en una molécula biológica idónea para ser empleada como plantilla o bloque de construcción. En particular el virus M13 ha sido probado como una plantilla eficiente en la síntesis de estructuras mesoporosas de SiO_2 , el cual se empleó en su forma nativa, y dirigió la forma y tamaño de la red porosa. Incluso este fago fue modificado químicamente en la superficie con grupos tiol para que estos sirvieran como sitios de nucleación en la formación de nanopartículas de oro y simultáneamente en la síntesis de estructuras mesoporosas, dando lugar a mesoporos de SiO_2 decorados con nanopartículas de oro.

Debido a que el bacteriófago M13 ha servido de plantilla en la síntesis de estructuras mesoporosas, en este trabajo se exploró la posibilidad de emplearlo en la síntesis de estructuras porosas de óxido de zirconio, con el objetivo principal de probar su capacidad como plantilla general en la producción de estructuras porosas. Si bien el alcóxido de zirconio tiene una mayor reactividad en medio acuoso que el alcóxido de silicio, este puede formar estructuras porosas en presencia de fago bajo ciertas condiciones.

En este trabajo se presenta una serie de experimentos realizados en la síntesis de óxidos porosos puros y mixtos (ZrO_2 y ZrO_2/SiO_2), en los cuales se optimizó la concentración de fago y se estableció su influencia en la formación de cavidades. Así mismo se estudió el efecto de la relación molar de los precursores (Zr:Si) en la morfología y cristalinidad del sólido final. Los materiales obtenidos se caracterizaron por diferentes técnicas: difracción de rayos X, espectroscopia UV-vis e infrarroja, microscopia electrónica y adsorción-desorción de Nitrógeno.

Se observó que la concentración de fago (6 y 8 mg/mL) no es determinante en la obtención de estructuras porosas ordenadas alrededor del fago, pero su ordenamiento hexagonal y la formación de cúmulos (ramilletes) si influye en la formación de estructuras porosas (>30 nm). Se propone que esto es efecto de la cantidad del alcóxido de zirconio empleado en la síntesis, debido a su alta reactividad e instantánea formación de oligómeros.

Capítulo 1

1. Introducción

1.1. Materiales porosos ordenados

Los materiales porosos se caracterizan por tener poros de tamaño bien definido, distribuidos de manera uniforme y periódica, poseen una elevada área superficial, volumen de poro grande, estabilidad química y son susceptibles a la modificación química de su superficie. Actualmente son objeto de estudio debido al gran número de aplicaciones industriales y tecnológicas, que van desde adsorción, catálisis, separación química, celdas solares, componentes de baterías y aplicaciones biomédicas como acarreadores de fármacos, entre otras. [1]

Una de las características más importantes es el tamaño de poro y en función de este se clasifican (de acuerdo con la IUPAC) [2]en:

- Microporos: materiales con un diámetro de poro menor a 2 nm.
- Mesoporos: materiales con un diámetro de poro que comprende de 2 a 50 nm.
- Macroporos: materiales con un diámetro de poro superior a los 50 nm.

1.2 Materiales microporosos

Entre los materiales microporosos representativos se encuentran las zeolitas, que fueron descubiertas en 1756 por el mineralogista Axel Fredrik Cronstedt, su nombre proviene del griego que significa “piedra que hierve”. Las zeolitas están constituidas por arreglos regulares de poros que forman canales de tamaño uniforme. Los tamaños de poro van de 2 a 11 Å, como se muestra en la Figura 1. Las zeolitas se pueden obtener de manera natural o sintética. En la síntesis de una zeolita se emplean aluminatos de sodio y silicatos de sodio como precursores e hidróxido de sodio, como activador. Durante la cristalización del gel,

los iones de sodio, los aluminatos y los silicatos se organizan y forman estructura ordenadas (cristal). [3]

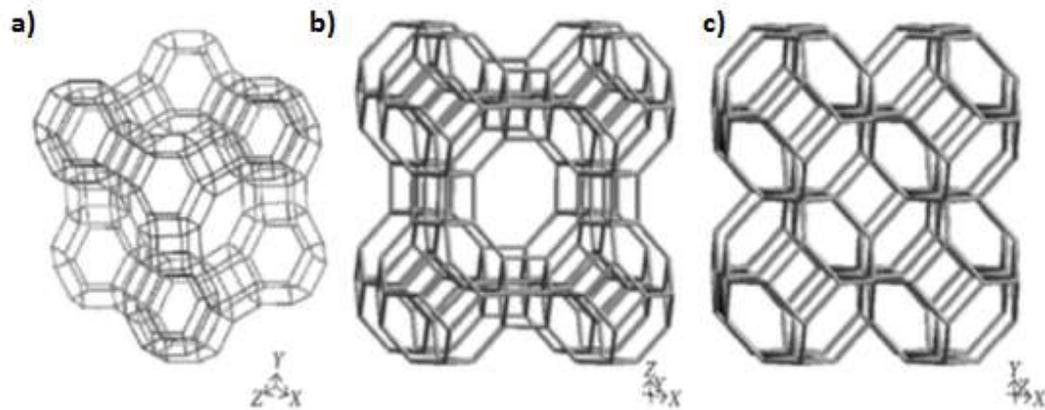


Figura 1. Representación estructural de Zeolitas (a) faujasita, (b) zeolita A y (c) sodalita. [3]

La importancia de las zeolitas en diferentes procesos catalíticos se atribuye a que poseen elevada área superficial, capacidad de adsorción, así como la posibilidad de controlar las propiedades de adsorción ajustando la hidrofobicidad de las paredes, entre otras.

Debido al gran número de aplicaciones en los años 80, se descubrió una nueva familia de zeolitas, la cual se denominó con el nombre de zeotipos. Estos materiales microporosos además de contener Si y Al en su estructura se encontraban otros metales, los primeros zeotipos fueron los aluminofosfatos (AIPO), posteriormente se sintetizaron los silicio-aluminofosfatos (SAPO) y aluminofosfatos metálicos (MeAPO). [4]

1.3 Materiales mesoporosos

Las primeras estructuras mesoporosas (de sílice) con cavidades regulares se descubrieron en los 90's por la *Mobil Oil Corporation*, las cuales se denominaron con el nombre de M41S. La síntesis de estos materiales requiere el empleo de precursores inorgánicos y tensoactivos (moléculas grandes que están formadas por regiones hidrofóbicas e hidrofílicas). Estas moléculas en condiciones apropiadas de solvente y concentración forman agregados micelares, los cuales sirven como moléculas directoras de la estructura (*structure-directing*

moleculas, SDM), ya que en su superficie suceden las reacciones de hidrólisis-condensación de los precursores.

En la síntesis de las estructuras mesoporosas de la familia M41S se utiliza como tensoactivo el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), que se comporta como cristal líquido y en función de la concentración puede ordenarse en fases micelares esféricas o tubulares. Estas micelas actúan como plantilla, al interactuar con los silicatos provenientes del tetraetil ortosilicato (TEOS), ya que en su superficie se llevan a cabo las reacciones de hidrólisis-condensación. Así, sobre las micelas se forma la red Si-O. Finalmente, el híbrido CTAB-SiO₂ se calcina a 540 °C, a esta temperatura el CTAB se descompone y los productos salen de la matriz inorgánica, formando así los poros, mientras que la red de SiO₂ (amorfa) forma las paredes de la mesoestructura. Este mecanismo se ilustra en la Figura 2a. Dependiendo de las condiciones de síntesis, tales como temperatura y relación molar del tensoactivo/precursor, las moléculas del tensoactivo pueden adoptar diferentes arreglos, generando estructuras hexagonales, cúbicas o laminares, como se muestra en la Figura 2b.

[5]

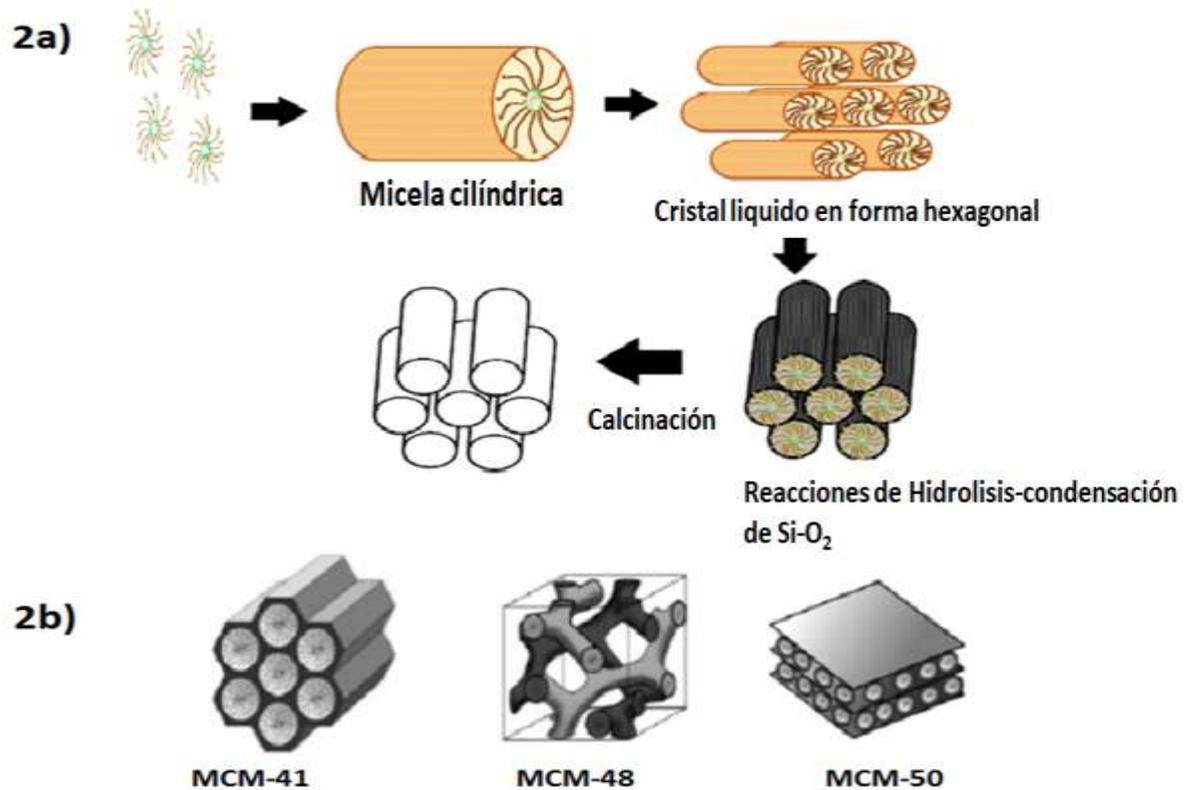


Figura 2. a) Mecanismo de formación de estructuras mesoporosas de tipo MCM-41. b) Materiales mesoporosos con estructura hexagonal (MCM-41), cúbica (MCM-48) y laminar (MCM-50).

Adaptado de la ref. [5]

Otra familia de estructuras mesoporosas es la formada por los materiales tipo SBA, que fueron sintetizada 1998 en la Universidad de California (Santa Bárbara) por los profesores Zhao y Stucky. Estos materiales están constituidos por un arreglo hexagonal de poros cilíndricos con tamaños de poro de 4.5 a 50 nm. Entre los materiales de esta familia se encuentran SBA-2, 3, 11, 12, 15 y 16 entre otros. En la síntesis de estos se emplean como plantilla copolímeros tribloque no iónicos (*Pluronic*), los cuales están formados por monómeros de óxido de etileno y óxido de propileno, en donde la cadena central es hidrofóbica, mientras que los extremos son hidrofílicos. [6]

En la Figura 3 se representa la estructura de un copolímero, en la cual se representa con color azul la parte hidrofílica y de amarillo la cadena hidrofóbica.

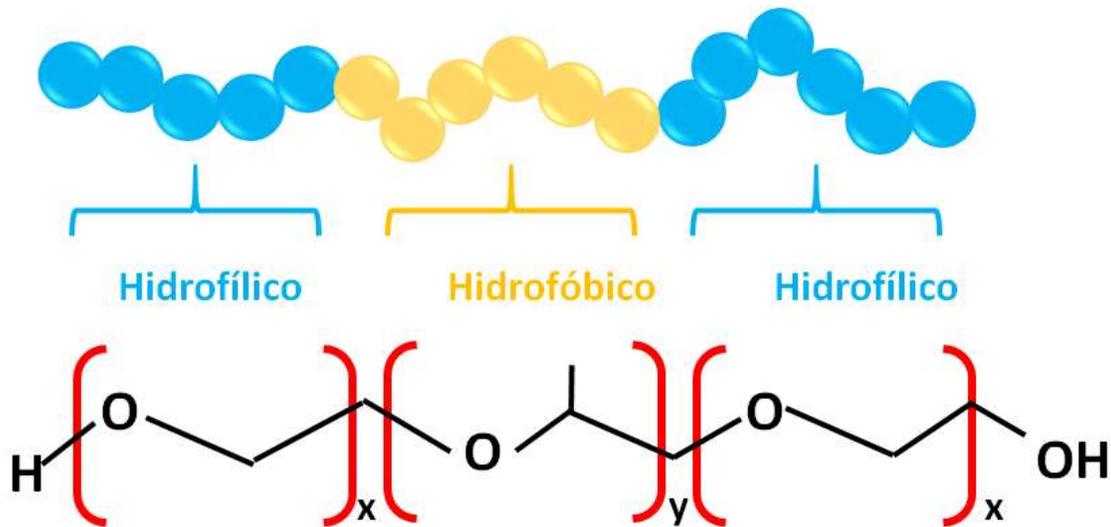


Figura 3. Estructura de los *Pluronics*, en donde x toma valores de 5 a 200 y y de 5 a 100.

Dentro de esta familia el material más estudiado es el SBA-15, el cual presenta una estructura hexagonal, de acuerdo con estudios de difracción de rayos X (DRX), equivalente al MCM-41. La síntesis de este material se lleva a cabo en condiciones ácidas, usando como plantilla el copolímero comercial P123 (poli (óxido de etileno)₂₀-poli (óxido de polipropileno)₇₀-poli (óxido de etileno)₂₀), el cual se organiza en estructuras tipo rodillo, que en presencia de TEOS e incubado a 54 °C por varios días forma una red mesoporosa hexagonal. Finalmente, las cavidades se forman después de calcinar la muestra a 550 °C. [7]

En las siguientes imágenes de microscopia se ilustra la estructura hexagonal de los materiales MCM-41 y SBA-15.

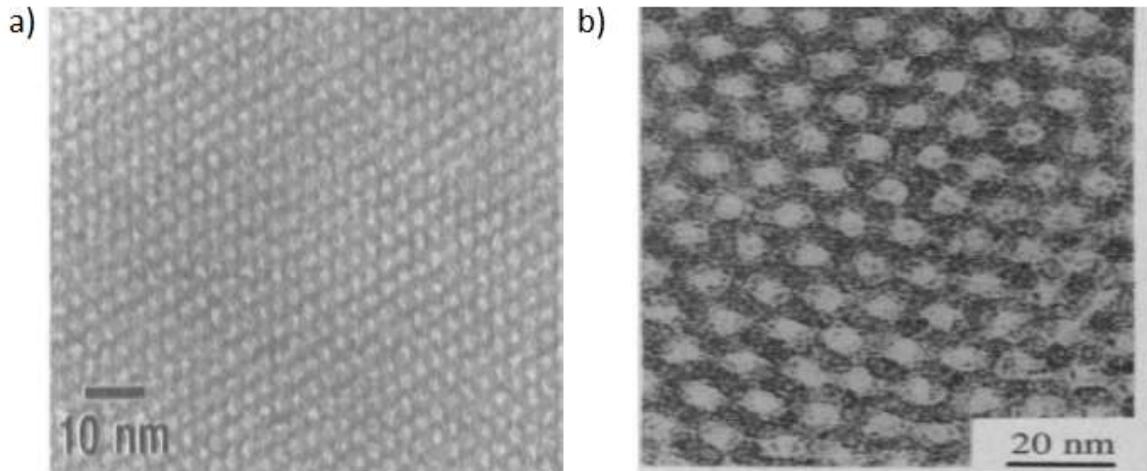


Figura 4. Imágenes de microscopía, a) MCM-41 diámetro de poro de 2 nm, b) SBA-15 diámetro de 6 nm. [7, 8]

Se ha diversificado ampliamente la síntesis de materiales mesoporos. Algunos ejemplos de estos son las mesoestructuras HMS (*Hexagonal Mesoporous Silica*, en inglés), FDU (*Farleigh Dickinson University*), y AMS (sílice mesoporosa templada con surfactante aniónico) [9], entre otros. Además de las estructuras de SiO_2 , el cual es muy estable y posee excelentes propiedades mecánicas, pero es bastante inerte lo que limita su aplicación como catalizador o soporte catalítico. Por esta razón se han sintetizado mesoestructuras de matrices tales como, ZrO_2 , TiO_2 , carbono, Al_2O_3 , Fe_2O_3 , y ZnO . La síntesis de estructuras mesoporosas se basan en el uso de moléculas directoras de la estructura (*structure-directing molecules*, SDM) que pueden ser moléculas orgánicas, polímeros, tensoactivos, etc. o SDM inorgánicas sobre las cuales condensan los precursores, formando las paredes de la matriz $\text{M}_y\text{-O}_x$. Posteriormente, la SDM o la plantilla es eliminada por calcinación o extracción. La eliminación de la plantilla da como resultado la generación de estructuras porosas. El tamaño de poro y la estructura depende esencialmente de la plantilla. La síntesis general de materiales porosos se representa en el esquema de la Figura 5, en el cual se pueden observar los diferentes parámetros empleados en la síntesis de estas: SDM, plantillas inorgánicas, el medio en el que se realiza la síntesis (acuoso, mezcla de solventes), pH y los precursores que van a formar la pared de la red. [10]

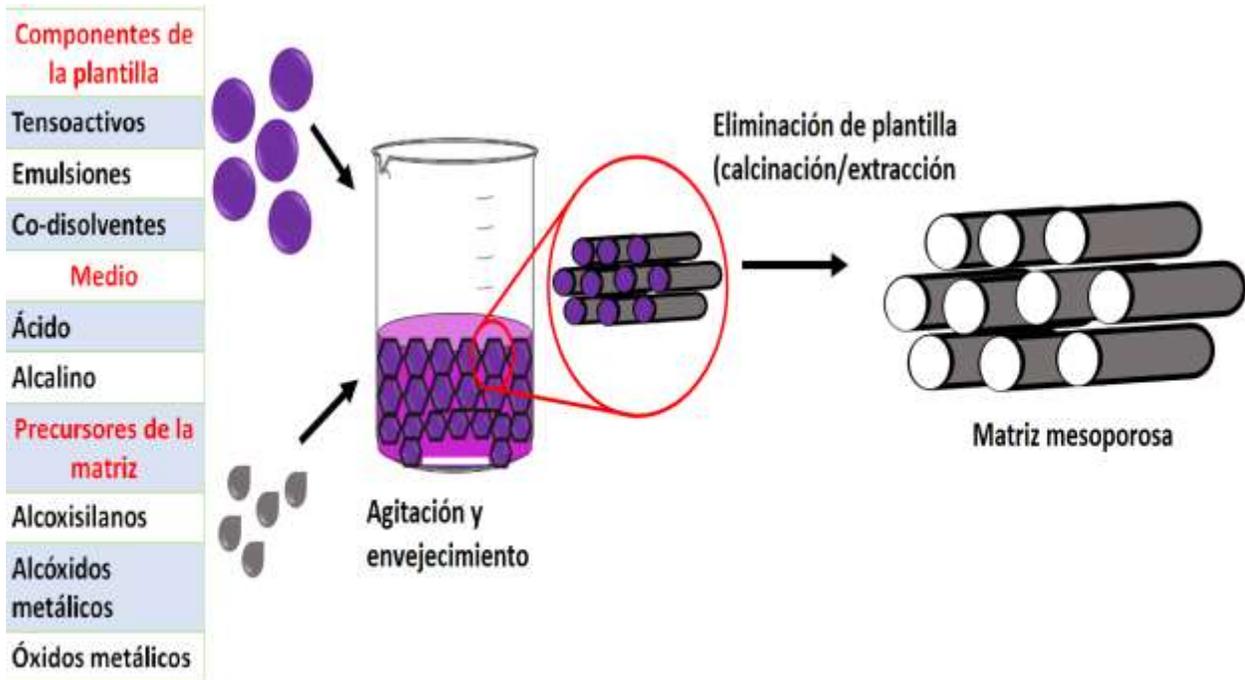


Figura 5. Representación esquemática del crecimiento de estructuras mesoporosas, empleando diversos parámetros de síntesis, las bolitas moradas representan las plantillas que se pueden emplear y las figuras grises los diversos precursores. [10]

Como ya se ha mencionado se han creado estructuras mesoporosas de sílice empleando como plantillas, tensoactivos catiónicos de amonio cuaternario (familia M41S), tensoactivos no iónicos (familia SBA) y tensoactivos aniónicos. A pesar de los avances en la síntesis de estructuras mesoporosas, los científicos tienen como objetivo sintetizar materiales con un tamaño de poro, forma, uniformidad y periodicidad controlada. Sin embargo, aún faltan por explorar “nuevas” moléculas que actúen como plantilla. Estas moléculas deben cumplir con características tales como ser monodispersas, capaces de organizarse en fases de cristal líquido y de auto-ensamblarse jerárquicamente, funcionar como puntos de nucleación, entre otras.

Recientemente, ha existido un gran interés en emplear biomoléculas como plantillas en la síntesis de matrices porosas, que van desde aminoácidos hasta virus pasando por proteínas (colágeno). [11]

A estas moléculas biológicas las podemos encontrar en una gran cantidad de tamaños, y formas con propiedades superficiales (carga) y químicas (grupos funcionales) bajo control genético. Sin embargo, estas características pueden ser modificadas relativamente fácil por técnicas de bioconjugación (acoplamiento químico) o de biología molecular (mutaciones en el ácido desoxirribonucleico, ADN). Además, estas biomoléculas pueden adoptar diferentes estructuras espaciales en función de las condiciones de reacción, por ejemplo, en condiciones ácidas los grupos amino pueden protonarse y cambiar la estructura secundaria de la proteína. Por todas estas razones, su empleo como plantillas para la síntesis de materiales ha generado un gran interés. [12]

1.4 Antecedentes del uso de plantillas Biológicas

Se han sintetizado estructuras porosas de óxido de titanio (TiO_2) empleando como plantilla diversos aminoácidos, se encontró que los aminoácidos con alto punto isoeléctrico (lisina y arginina) son mejores plantillas para formar estructuras jerárquicas mesoporosas. Mientras que el tamaño de poro fue función de la longitud del aminoácido empleado en la síntesis, por ejemplo, los aminoácidos, aminobutírico y ácido glutámico generan estructuras mesoporosas de 3.4 y 5.2 nm, respectivamente. Por otro lado, la morfología y el tamaño de poro son función de la cantidad de precursor de titanio. Estos materiales fueron empleados en el diseño de ánodos para baterías de litio. [13]

Se han empleado biomoléculas más complejas para la fabricación de nanomateriales, como el ADN. Aprovechando las características que poseen las hebras de ADN, se han funcionalizado cadenas complementarias de tal suerte que sobre ellas se organizan nanopartículas de oro. Así en presencia de iones de plomo (Pb^{2+}), la ribozima (ADNzyme) es capaz de hidrolizar el ADN, provocando que las nanopartículas se desensamblen, lo cual puede verse fácilmente por colorimetría (violeta a rojo). Este estudio demostró la capacidad

de las biomoléculas para organizarse en estructuras más complejas, ya que presento cambios de color en función de su ensamble. [14]

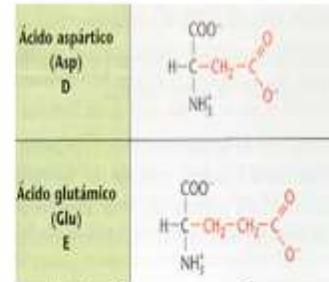
En la síntesis de estructuras porosas de alúmina se ha empleado la fibra de colágeno como plantilla. Las fibras de colágeno se funcionalizaron con taninos vegetales, los cuales interaccionan con especies de aluminio (Al^{3+}) de forma débil en comparación con la interacción que existe entre el ion Al^{3+} y el colágeno, lo que permite remover por calcinación el colágeno sin destruir la estructura porosa. En este trabajo se obtuvieron poros de 8 nm de diámetro. [15]

Los virus han sido usados como plantillas para la síntesis de materiales, ya que los iones inorgánicos pueden interaccionar específicamente sobre la superficie del virus o en el interior de las estructuras víricas. Un ejemplo de este tipo de virus es el *Tobacco mosaic virus* (TMV) que tiene forma de rodillo (tubo), el cual posee una superficie externa e interna que han sido empleadas para crear materiales inorgánicos. El TMV (*nativo*) se ha decorado externamente con nanopartículas de oro y platino. En condiciones ácidas los complejos $[PtCl_6]_2^-$ y $[AuCl_4]^-$ interactúan con los residuos ácidos (aspártico y glutámico), sirviendo como puntos de nucleación, que al ser reducidos con borohidruro de sodio ($NaBH_4$) producen las nanopartículas (ver Figura 7a). La decoración con nanopartículas en el canal interior se ha logrado modificando genéticamente el TMV. La modificación consistió en cambiar los residuos de ácido glutámico y aspártico en las posiciones 95 y 109 por glutamina y asparagina (E95Q/D109N), respectivamente.



Modificación química (E95Q/D109N)

Sobre la secuencia de aminoácidos del virus TMV se cambiaron los aminoácidos:



En las posiciones 95 y 109 por un glutamina y asparagina:



Figura 6. Representación esquemática de la modificación genética de la cápside del virus TMV.

Adaptado de la referencia [16]

La suspensión del virus (E95Q/D109N) se incubó con nitrato de plata y benzoato de plata, a un pH de 7 para reducir la carga positiva de la superficie externa y aumentar la carga negativa asociada con los aminoácidos que recubren la pared de la cavidad, durante 24 horas a 4 °C, posteriormente la sal de plata se redujo fotoquímicamente. De este modo se obtuvieron nanopartículas de plata esféricas con un diámetro de 5 nm espaciadas regularmente a lo largo del eje del virus, como se observa en la Figura 7b. Se observó que empleando nitrato de plata (AgNO_3) se formaban menos partículas (2–6) en el interior del TMV con respecto al benzoato de plata (4–10). [17]

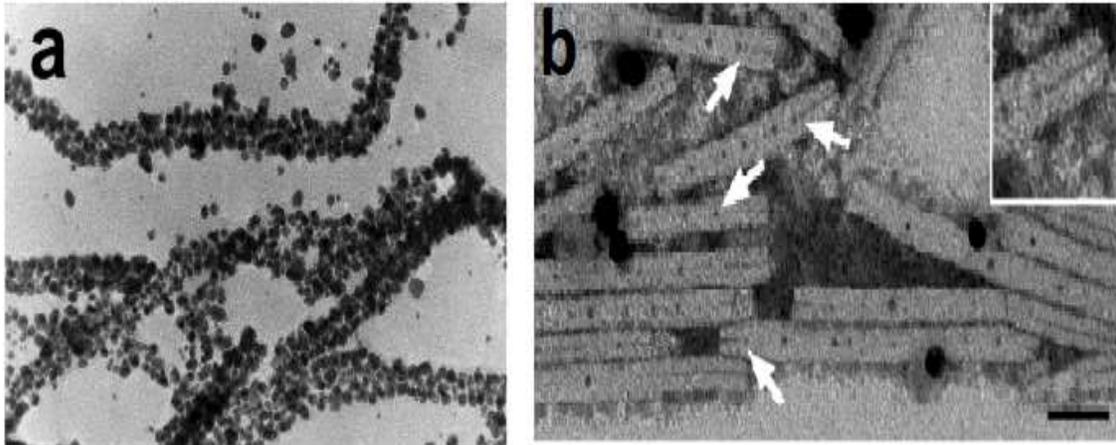


Figura 7. a) Nanopartículas de oro formadas sobre la superficie del TMV nativo, b) nanopartículas de plata producidas en el canal interno del virus modificado genéticamente (E95Q/D109N). [17]

El virus TMV ha sido empleado como plantilla para la fabricación de nanotubos de silicio. Para la síntesis de estos se modificó genéticamente la superficie del virus colocando cisteína (grupos $-SH$) en la superficie de la cápside (TMVcys). Los nanotubos se cubrieron primeramente de níquel por deposición química y enseguida de silicio (TMVcys/Si/Ni) como se muestra en la Figura 8. Estos materiales se probaron como electrodos mostrando altas capacidades, además de una excelente estabilidad en el ciclo de carga-descarga. Incluso exhibieron mayor capacidad (10 veces más) en comparación con los ánodos de grafito. [18]

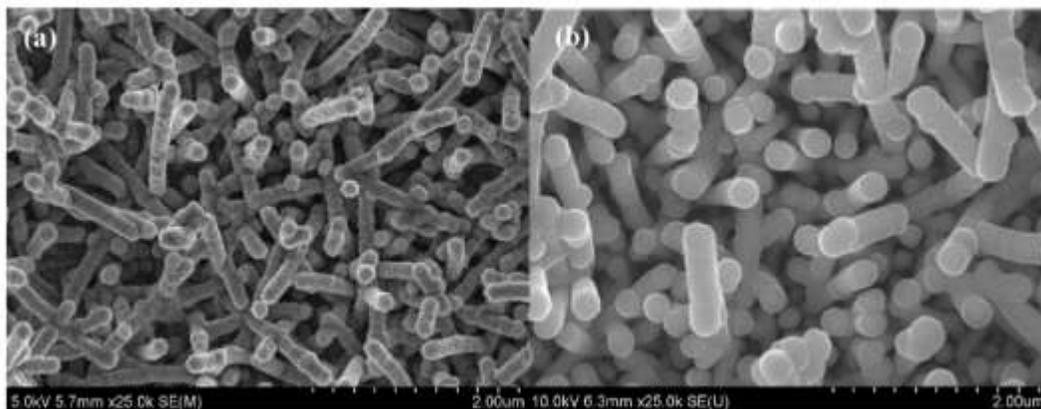


Figura 8. Imágenes de microscopia electrónica de barrido del virus TMV/Ni a) antes y b) después de la deposición de silicio. [18]

El virus *Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) de forma esférica, fue empleado para encapsular óxido de titanio (TiO_2). La reacción depende esencialmente del pH, debido a que a pH mayor de 6.5 el virus sufre una transición reversible que provoca un aumento (10%) en el tamaño de la cápside. Esta estructura abierta (“hinchada”) permite la penetración de los precursores de titanio, los cuales interactúan con las cargas internas de los residuos de la cápside. Este proceso es reversible al disminuir el pH, lo que provoca que el titanio se quede “atrapado” en el interior formando las nanopartículas de óxido de titanio TiO_2 .

La cápside del bacteriófago T7 al que previamente se removió el ADN el cual toma el nombre *de fantasma T7*, se “llenó” con un complejo fluorescente de europio. Una solución de fantasmas se incubó en presencia de iones de europio y ligantes adecuados. Al mismo tiempo que se formó el complejo de europio estos atravesaron la cápside y se almacenaron ahí. Estos fagos fluorescentes fueron empleados como sondas y se propone que en un futuro tengan aplicaciones en bioensayos, liberación controlada de sustancias e imagenología. [19]

1.4 Estructura y características del Bacteriófago M13

Los bacteriófagos, también conocidos como fagos, son virus que infectan específicamente a bacterias. Fueron descritos por primera vez por Frederick Twort en 1915 y posteriormente, en 1917, por Félix d’Herelle, quien les dio el nombre de bacteriófagos por su capacidad de penetrar la pared bacteriana (del griego *phage*: “comer”). [20]

El fago M13 tiene una longitud de 880 nm y un diámetro de 6.5 nm, en su interior se encuentra una molécula de cadena sencilla de ácido desoxirribonucleico (ss-ADN) y protegiendo esta cadena se encuentran la cápside formada por cinco tipos de proteínas (Ver Figura 9). La proteína pVIII es la más abundante, aproximadamente 2700 copias, y cubre todo el cuerpo del fago. Esta proteína en su forma madura tiene 50 aminoácidos. Las proteínas pVII y pIX se encuentran en uno de los extremos del fago, hay alrededor de cinco

copias de cada una, y se conforman de 33 y 32 aminoácidos respectivamente. En el otro extremo del fago hay cinco copias de cada una de las proteínas pVI y pIII que poseen 112 y 406 aminoácidos, respectivamente.

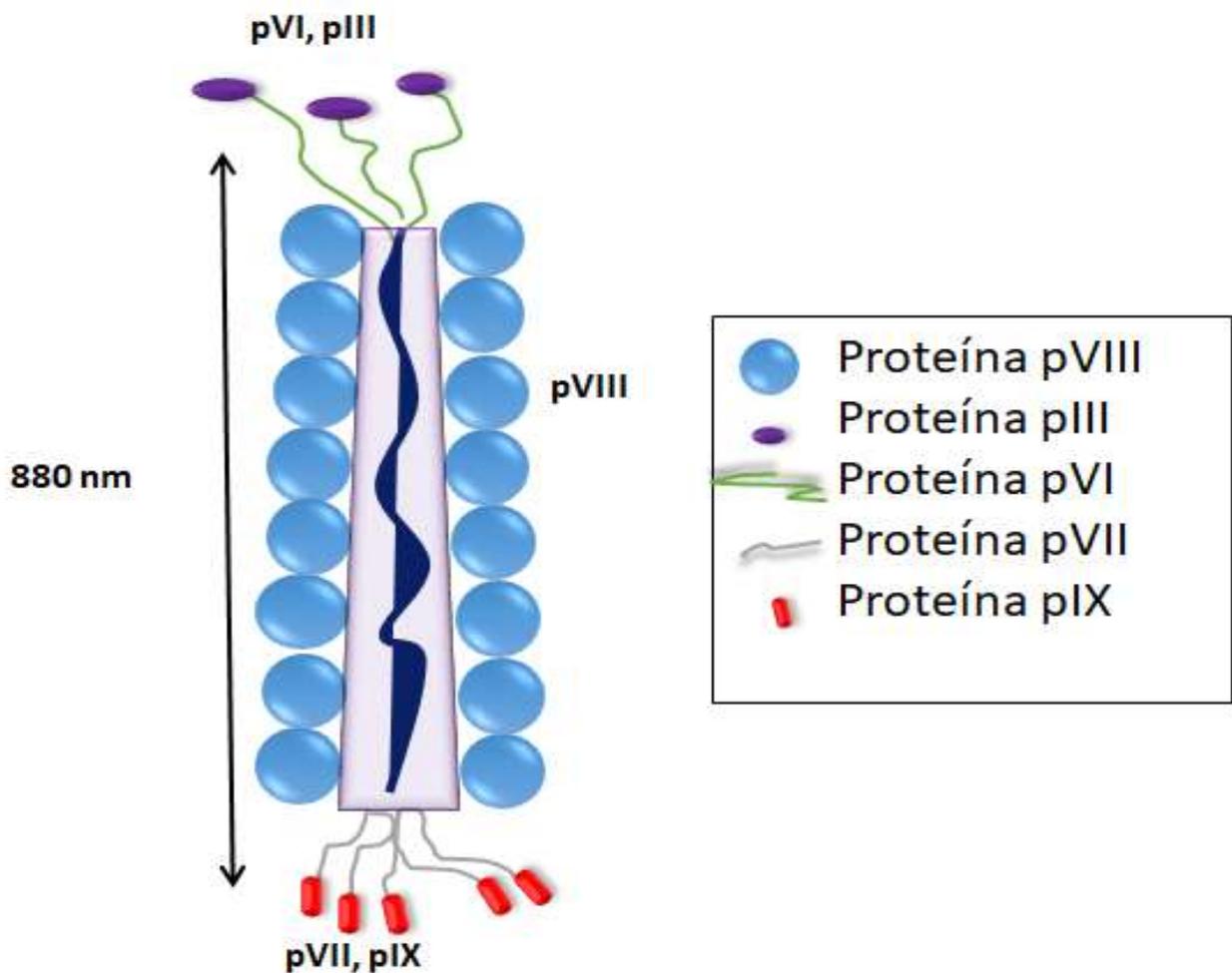


Figura 9. Representación esquemática de la morfología del fago M13.

El fago M13 es un virus filamentosos que se caracteriza por tener propiedades de cristal líquido, es estable a temperaturas de hasta 90 °C, a pH extremos (3–11), debido a las proteínas de la cápside poseen unión específica y reconocimiento molecular a ciertos blancos. Además, es una partícula no tóxica para los seres humanos y puede auto

ensamblarse en estructuras más complicadas. [21] Estas propiedades han permitido su uso como una plataforma para la síntesis y organización de nanomateriales funcionales para diversas aplicaciones eléctricas, químicas y ópticas, en componentes de baterías, celdas fotovoltaicas y sensores. [22]

Algunas moléculas adquieren fases en las cuales tienen más orden que los líquidos, pero menos que los cristales. Estas fases se agrupan entre sí y reciben el nombre de cristales líquidos, ya que presentan simultáneamente propiedades de líquidos y cristales. Las moléculas en cristales líquidos son libres de fluir como en los líquidos, sin embargo, al hacerlo, tienden a permanecer orientados en cierta dirección. Las moléculas en una fase de cristal líquido pueden cambiar su orientación en función de parámetros internos y externos (concentración, pH, temperatura, etc.). Los cristales líquidos generalmente se dividen en dos categorías: los termotrópicos y los liotrópicos. Las fases de cristal líquido termotrópico se forman por un cambio de temperatura, y las fases de cristal líquido liotrópico están influenciadas por la concentración del mesogeno. Los liotrópicos (por ejemplo, virus filamentosos M13 o fd) que muestran diferentes fases según su concentración son de gran interés en estudios biológicos. [23]

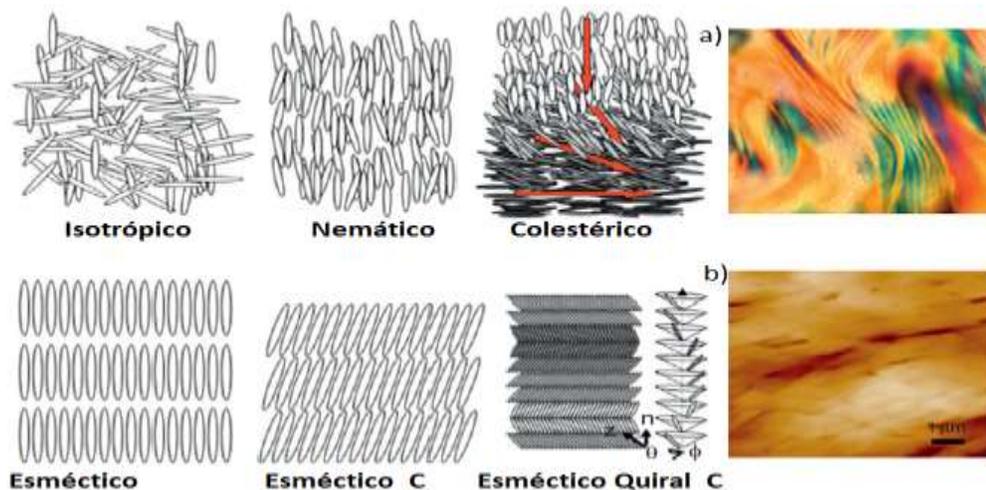


Figura 10. Organización del fago M13 en cristal líquido, a) se muestra por medio de microscopía óptica polarizada cómo se organiza el fago en su forma colestérica, b) fago organizado en esmético C visto por microscopía de fuerza atómica. [23]

El fago M13 es una estructura molecular sumamente versátil ya que los grupos químicos que posee en su superficie pueden ser modificados genéticamente por técnicas de mutagénesis. Incluso es posible introducir grupos químicos no existentes en las proteínas mediante modificación química, por ejemplo, han unido covalentemente colorantes [24]. Estudios previos han mostrado la eficacia del fago M13 para la producción de nanomateriales, ya que este se ha utilizado en su forma nativa para crear nanohilos metálicos, por medio de las interacciones electrostáticas entre los complejos metálicos (RhCl_3 , K_3RhCl_6 , PdCl_2 , K_2PdCl_4 , RuCl_3 , K_3RuCl_6) y los grupos carboxílicos que se encuentran expuestos en la proteína pVIII, seguidos por la reducción con borohidruro de sodio. Estos grupos sirven como centro de nucleación, obteniendo de esta forma nanopartículas de rodio, paladio y rutenio, sin la necesidad de modificar genéticamente la superficie del fago. Estos nanohilos se probaron en la reducción de estireno a etilbenceno. El ensayo consistió en añadir fago recubierto con rodio a una solución de estireno (20 mM) en metanol, la mezcla se agitó bajo una atmósfera de hidrógeno y se observó una conversión completa de estireno a etilbenceno después de 1 h. También se estudió la reducción de rojo de metilo, la cual se llevó a cabo agregando fagos revestidos con rodio a una solución del colorante (46 μM), la mezcla se agitó en atmósfera de hidrógeno durante 10 min, y mediante espectroscopia UV-vis se observó la disminución de la absorbancia de la solución de rojo de metilo, lo que indica la ruptura del enlace azo. [25]

El fago se ha modificado genéticamente para insertar un trímero de glutamatos (E) en el extremo N-terminal de la proteína pVIII. Esta mutante posee cargas negativas extra en la superficie, que en presencia de glicolatos de bario y titanio permiten la formación de complejos virus-metal. De este modo se forma un compuesto amorfo de BaTiO_3 que cristaliza a perovskita después de calcinar. Estas estructuras se probaron como nanogeneradores para impulsar dispositivos electrónicos comerciales. [26]

1.5 Antecedentes de estructuras porosas empleando virus y bacteriófagos

En la naturaleza podemos encontrar virus filamentosos como el bacteriófago M13 y el virus TMV, los cuales son morfológicamente similares a las micelas, pero son partículas más monodispersas, debido a que la longitud y el diámetro de cada fago siempre es igual.

Entre los trabajos en los que se han empleado virus como plantillas se encuentra el del grupo del profesor Stephen Mann. Ellos reportaron la síntesis de estructuras mesoporosas de sílice usando el TMV. El TMV tiene una longitud de 300 nm y un diámetro de 18 nm, que a concentraciones altas puede organizarse en fase nemática. Para la síntesis emplearon TEOS y aminopropil trietoxisilano (APTES) como precursores de silicio en presencia de TMV (16 mg/mL). La mezcla se dejó envejecer a temperatura ambiente (4 días) y posteriormente se incubó a 45 °C, de este modo finalizan las reacciones de hidrólisis-condensación. Finalmente, se calcinaron a 540°C. Así obtuvieron estructuras mesoporosas tipo hexagonal con poros de 11 nm, los cuales son 7 nm menores que el diámetro del TMV, lo cual indica que las paredes formadas por la red Si-O se comprimieron durante la calcinación, a pesar de la eliminación de la plantilla no se observaron efectos sobre la estructura de cristal líquido de los virus, por lo tanto, la red Si-O conservó la organización hexagonal. De este modo las paredes de sílice (amorfa) presentaron un espesor de 9 a 10 nm. [27]

Otras estructuras mesoporosas en las que se han usado como plantillas moléculas biológicas son descritas por Chuanbin Mao et al. Ellos usaron el bacteriófago M13 como plantilla, y como precursores TEOS y APTES para sintetizar estructuras mesoporosas de SiO₂. La síntesis se llevó a cabo usando una suspensión de fago (20 mg/mL), a la que se agregó APTES y TEOS prehidrolizado. En suspensión acuosa el fago se encuentra cargado negativamente, mientras que el APTES tiene cargas positivas por lo tanto los aminoácidos que se encuentran en la proteína p8 con grupos terminales -COO⁻ interactúan mediante puentes de hidrógeno con los grupos amino (-NH₃⁺) del APTES, permitiendo que en la superficie se produzca la hidrólisis-condensación que da origen a la red inorgánica. Después de calcinar se obtuvieron fibras hexagonales con poros alineados y de tamaño uniforme de

aproximadamente 5.8 nm, con un espesor de pared de aproximadamente 2 nm, y longitudes de aproximadamente 1 μm . El área superficial obtenida fue de 341.57 m^2/g . [28]

Por otro lado, Vera-Robles *et al.* emplearon el fago M13 en su forma nativa para crear estructuras mesoporosas de SiO_2 , obteniendo poros de 4.6 nm y área superficial de alrededor de 169 m^2/g . En una síntesis posterior el fago M13 se funcionalizó con grupos tiol ($-\text{SH}$) en la superficie de la proteína p8, a través de los grupos amino. De esta manera se obtuvieron estructuras mesoporosas decoradas con nanopartículas de Au y Pt. Cabe mencionar que la reacción se realizó en un solo paso, es decir las reacciones de hidrólisis-condensación de los precursores sobre el fago, ocurrieron de manera simultánea con la nucleación de los iones Au^{3+} en los grupos $-\text{SH}$. Mediante este procedimiento se obtuvieron estructuras mesoporosas decoradas con nanopartículas de Au, como se muestra en la figura 11b, en la cual podemos observar los canales en los cuales se encuentran impregnadas las nanopartículas de Au, que como se puede ver son de un mismo tamaño. Este compuesto (mesoporos SiO_2 -NPs de Au) se probó como catalizador en la reducción de 4-nitrofenol y azul de metileno obteniendo eficiencias similares a otros catalizadores. [29]

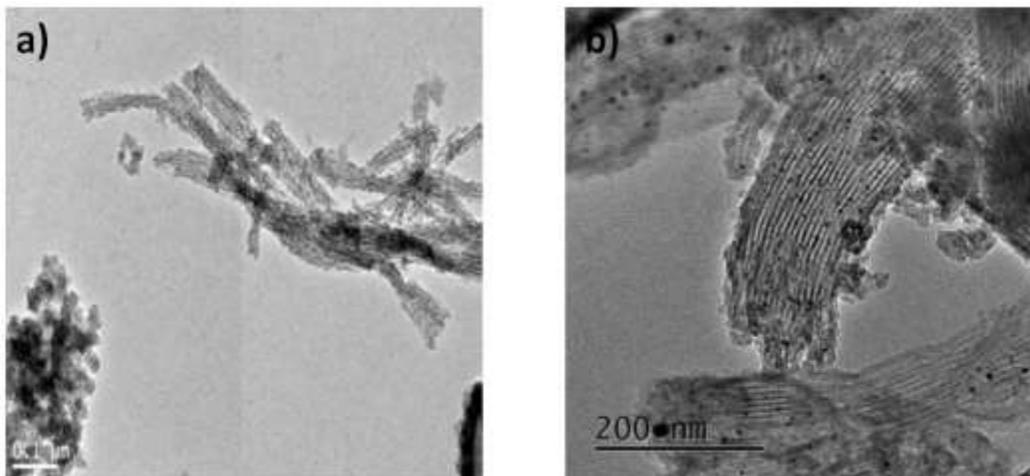


Figura 11. Mesoporos de SiO_2 (a) M13 sin modificación química, (b) M13 modificado químicamente y decorado con nanopartículas de Au. [29]

Si bien el SiO_2 , ha sido empleado en un gran número de aplicaciones aún presenta varias dificultades, como su aplicación en la catálisis que involucra procesos redox. Debido a que el fago M13 ha sido una plantilla idónea para crear estructuras porosas de SiO_2 , se propone estudiar su aplicación como plantilla en la síntesis de estructuras porosas de otros óxidos con distintas aplicaciones, tales como el ZrO_2 , TiO_2 y ZnO entre otros.

1.6 Oxido de Zirconio

Los materiales porosos de óxido de zirconio son de gran importancia debido a su alta estabilidad térmica, resistencia contra la corrosión y actividad bifuncional ácido-base. Estos materiales son potencialmente aplicables en reacciones redox y procesos fotocatalíticos, así como en catálisis convencional. Así mismo presenta muchas ventajas prácticas ya que es un material no tóxico, fácil de manejar, reutilizable (reciclable), y poco costoso. [30]

El óxido de zirconio (ZrO_2) posee tres formas cristalinas: monoclinica (M), tetragonal (T) y cúbica (C). La estructura monoclinica es estable a temperatura ambiente, mientras que entre 1170 y 2370 °C existe en la fase tetragonal, y por encima de 2370 °C se forma la fase cúbica. En la estructura cúbica de óxido de zirconio está coordinado a 8 oxígenos, mientras que la estructura monoclinica tiene un número de coordinación igual a 7 (ver Figura 12).

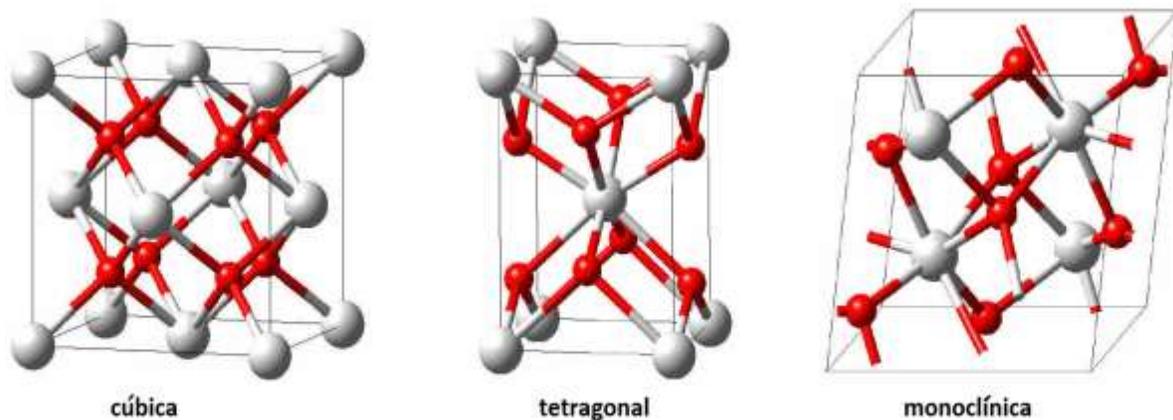


Figura 12. Estructuras cristalinas de ZrO_2 . [31]

Existen diferentes aplicaciones para el óxido de zirconio en función de la estructura cristalina en que este se encuentre. La estructura monoclinica se emplea para fabricar recubrimientos abrasivos, aditivos, pigmentos inorgánicos y componentes electrónicos. La estructura tetragonal se emplea a altas temperaturas para el manejo de metales fundidos, así como para la fabricación de troqueles de extrusión, debido a su elevada dureza y resistencia al desgaste; así como para la fabricación de prótesis de cadera, rodilla y pieza dentales, gracias a su biocompatibilidad. La estructura cúbica posee una excelente conductividad iónica que le permite ser empleado como sensor de oxígeno, capturador de gases en cámaras de vacío, cristales electrónicos y electrodos para celdas de combustible. [32]

Actualmente, se han obtenido estructuras porosas de óxido de zirconio usando como plantilla diversos tensoactivos de pequeño peso molecular (aminas, CTAB, sulfatos) y copolímeros comerciales, obteniendo materiales con alta estabilidad térmica y elevada área superficial. [33] En la síntesis de materiales porosos de óxido de zirconio se ha empleado como plantilla el *pluronic* P123, dicha síntesis consiste en disolver 1 gramo de éste *pluronic* en 10 gramos de etanol, posteriormente se añade 0.01 mol de tetracloruro de zirconio $ZrCl_4$ con agitación vigorosa durante media hora, la mezcla se deja secar a 40 °C en aire durante aproximadamente 7 días, en los cuales ocurren las reacciones de hidrólisis-polimerización. En la Figura 13 se muestran imágenes de microscopia electrónica, del material obtenido por este método, en las cuales se aprecian los canales porosos, así como la estructura hexagonal que adopta. El tamaño de poro obtenido es de 5.8 nm, el área superficial de 150 m²/g y la estructura de la pared de la matriz es tetragonal. [34]

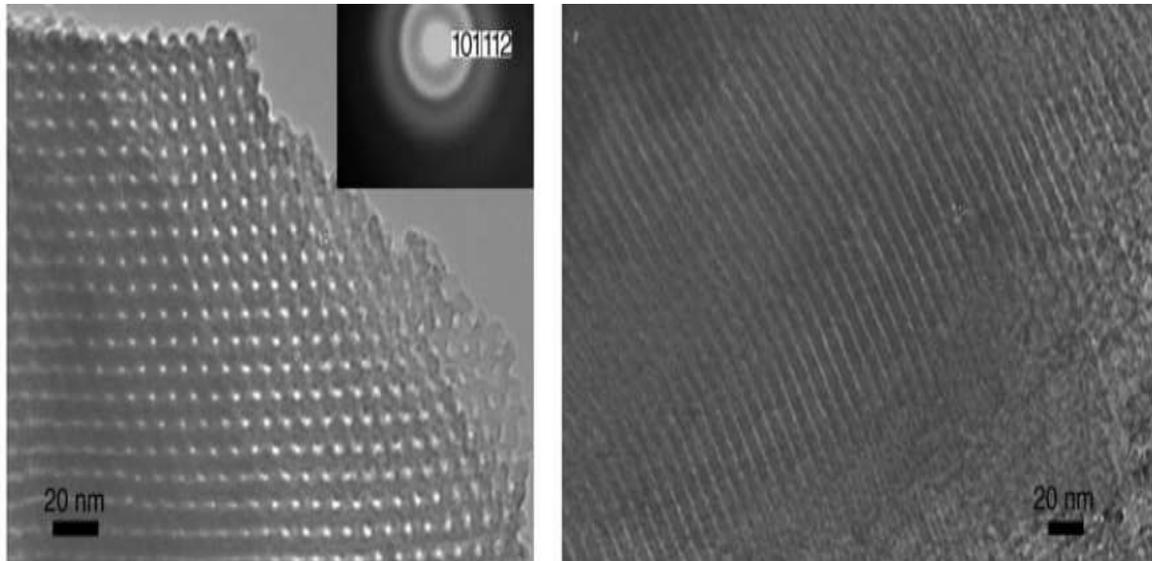


Figura 13. Micrografía de ZrO_2 mesoporoso. Vista a) transversal de la estructura porosa, en la cual se observa la organización hexagonal y b) longitudinal, en la cual se observan los canales porosos.

[34]

Por otro lado, debido a las limitaciones y ventajas del SiO_2 y ZrO_2 se ha estudiado su síntesis como óxidos mixtos (SiO_2/ZrO_2), debido a sus propiedades fisicoquímicas, tales como mayor estabilidad térmica y química, actividad catalítica y fuerte acidez superficial. Esto con el objetivo de aumentar las posibles aplicaciones tecnológicas de cada uno de ellos.

Debido a que la fase tetragonal del óxido de zirconio es metaestable, se ha recurrido al dopaje con otros elementos para aumentar su estabilidad. Los óxidos metálicos mixtos pueden ser CaO , MgO , Y_2O_3 , SiO_2 y CeO_2/ZrO_2 , incluso estos pueden estabilizar la fase tetragonal y cubica a temperatura ambiente. [35]

La síntesis de óxidos mixtos de diversos materiales tiene una amplia investigación debido a las propiedades que este le confiere al material, un ejemplo de ello es la síntesis de óxido de cerio dopado con SiO_2 , TiO_2 y ZrO_2 . En los cuales pudieron observar la estructura cristalina de los diferentes materiales, coexistiendo con material amorfo. Por ejemplo, cuando el material se dopó con óxido de silicio se observó que el cristal de óxido de cerio crecía sobre la superficie amorfa de SiO_2 . En las muestras que dopan con titanio obtuvieron tanto las fases cristalinas de CeO_2 como las de TiO_2 . Se ha observado que la estructura

crystalina del CeO_2 es principalmente cúbica tipo fluorita. Se demostró así que los materiales mixtos aumentan la capacidad de almacenamiento de oxígeno con respecto del material puro. [36]

Se han preparado aerogeles $\text{SiO}_2/\text{ZrO}_2$ mesoporosos con concentraciones de zirconio que van del 10 al 90% en peso a través de una mezcla de tetraetilortosilicato (TEOS) y nitrato de zirconilo dihidratado en una solución mixta de etanol y agua. En este trabajo se obtuvieron poros cilíndricos de aproximadamente 6 nm de diámetro y áreas superficiales de 300 a 700 m^2/g , como se muestra en la imagen 14. [37]

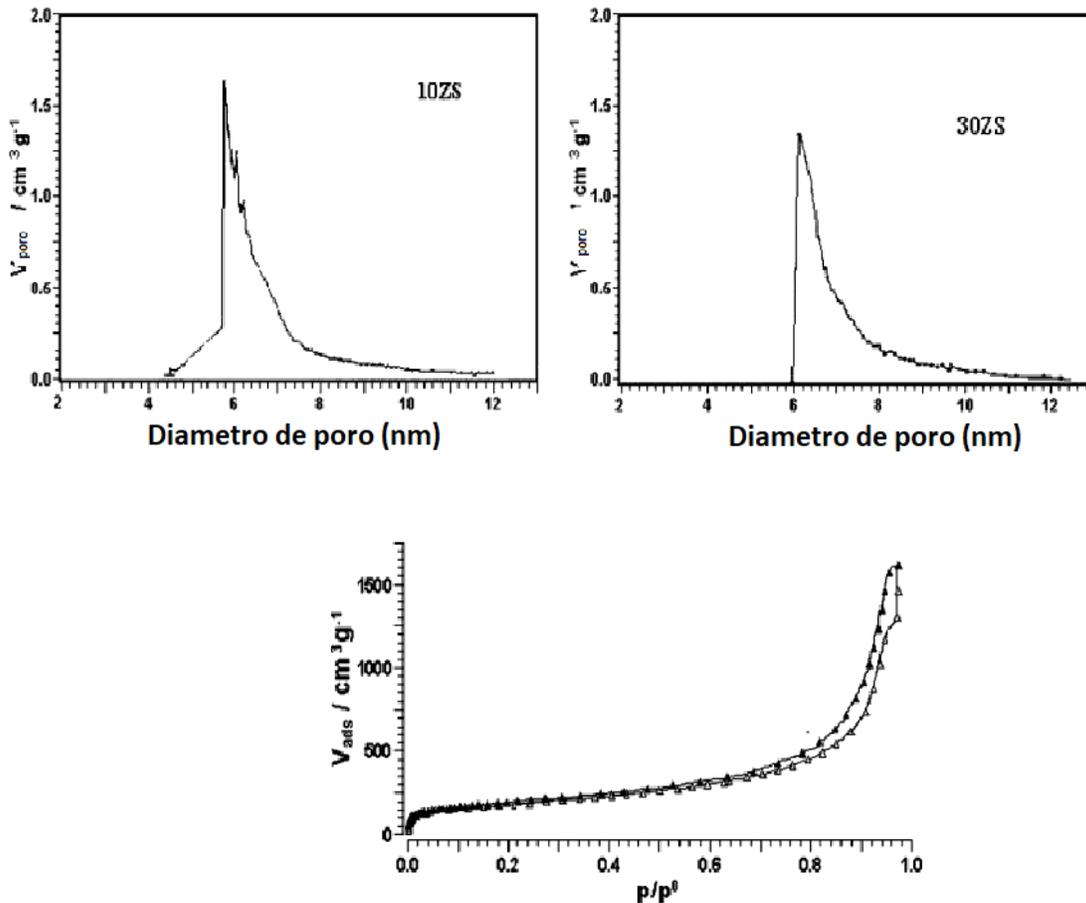


Figura 14. Se muestran las gráficas de distribución de poro, y la isoterma de adsorción-desorción de N_2 . Tomada de la referencia [37].

Capítulo 2

Hipótesis y Objetivos

2.1 Planteamiento del problema

Las necesidades tecnológicas actuales requieren la obtención de materiales porosos con tamaños de poro uniforme, estabilidad térmica y que permitan una síntesis rápida, poco costosa y amigable con el medio ambiente. Debido a que los bacteriófagos se han empleado en la síntesis de estructuras mesoporosas de silicio, las cuales han encontrado aplicaciones prometedoras en catálisis, en este trabajo nos hemos dedicado a estudiar la síntesis de otros materiales como el ZrO_2 empleando el fago M13 como plantilla. Por tal motivo como tema central de investigación nos hemos planteado la pregunta: ¿Es el bacteriófago M13 una plantilla universal para la síntesis de estructuras porosas de diversos óxidos?

2.2 Hipótesis

Moléculas capaces de auto-ensamblarse en estructuras supramoleculares, como los tensoactivos han sido ampliamente utilizados como plantilla en la síntesis de estructuras porosas. Por otro lado, fagos filamentosos como el M13 que tienen la capacidad de organizarse en forma de cristal-liquido podrían actuar como plantillas para la formación de estructuras porosas. Además, debido a la diversidad química de la cápside se plantea su habilidad para interactuar (química o electrostáticamente) con los precursores inorgánicos sin impedir la formación de los óxidos metálicos que formarían las paredes de la estructura mesoporosa.

Debido a las características de fago, ya expuestas, en este trabajo de tesis se plantea los siguientes objetivos:

2.3 Objetivos

General:

- Probar la eficiencia del fago M13 como plantilla para la síntesis de distintas estructuras mesoporosas.

Particulares:

- Obtener estructuras mesoporosas de ZrO_2
- Obtener estructuras mesoporosas de óxidos mixtos ZrO_2/SiO_2
- Estudiar la influencia de la relación molar Zr/Si en la morfología del material final
- Caracterizar los materiales obtenidos por técnicas tales como difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de transmisión y de barrido (TEM y SEM), entre otras.
- Proponer un posible mecanismo de formación de las estructuras porosas y el efecto del fago M13 en la morfología final.

Capítulo 3

Materiales y Metodología

3.1 Estructuras porosas

Se empleó el bacteriófago M13 (M13mp18) cultivado y purificado mediante protocolos estándar (**Anexo A**). Para la biosíntesis y purificación de bacteriófago M13 se utilizaron los medios de cultivo 2X YT y Luria broth (LB) de Invitrogen, polientilenglicol (MM ~8000) de Amresco, tetraciclina, cloruro de sodio, propóxido de zirconio, TEOS, APTES de Sigma-Aldrich y agua desionizada milli Q.

a) Preparación del bacteriófago M13

El crecimiento y purificación del bacteriófago se realizó de acuerdo con los protocolos estándar. En medio de cultivo 2X YT se agregó *E. Coli* (cepa *XL-Blue*), previamente crecida 16 horas, fago M13 (stock) y una cantidad apropiada de antibiótico (tetraciclina a una concentración final de 10 µg/mL). El medio se incubó 16 horas a 37° C y 200 rpm. El fago fue recuperado por centrifugación y precipitado por la adición de polietilenglicol (PEG) al 20% en peso en 2.5 M de NaCl. El fago puro fue cuantificado por espectroscopia UV-vis.

b) Preparación del óxido de zirconio empleando M13 como bioplantilla ($ZrO_2@M13$)

Se mezclaron 0.001mol (450 µL) de propóxido de zirconio (70% en peso en n-propanol), con 640 µL de fago (concentraciones de 6 y 8 mg/mL). La mezcla se agitó con un vortex, inmediatamente se formó un gel y se dejó reposar 4 días a temperatura ambiente y 2 días a 45°C. Posteriormente, el polvo obtenido se secó en aire y finalmente se calcinó a 600 °C durante cuatro horas. Además de la reacción con zirconio al 70 % se realizaron síntesis con menor cantidad de zirconio, el cual se diluyó en n-propanol para obtener diluciones al 30 y 50 % en volumen. De cada una de las diluciones se tomó 450 µL y se adicionó a 640 µL de fago a una concentración de 6 mg/mL, las reacciones se dejaron por 4 horas a temperatura ambiente, posteriormente se secaron y calcinaron a 600 °C por cuatro horas.

Muestra	Dilución de Zr/n-propanol	Volumen de Fago M13 (6mg/mL)
ZrO ₂ @M13 70%	70/30	640
ZrO ₂ @M13 50%	50/50	640
ZrO ₂ @M13 30%	30/70	640

**c) Preparación del óxido mixto zirconio/silicio empleando M13 como bioplantilla
ZrO₂/SiO₂@M13**

Para la síntesis del óxido mixto se prepararon varias mezclas de propóxido de zirconio y APTES, a diferentes relaciones molares, como se muestra en la tabla siguiente.

Muestra	Relación molar (RM) Zr/Si	Volumen de Fago M13 (6 mg/mL) (μL)
ZrO ₂ /SiO ₂ @M13 RM 9.8	9.8	640
ZrO ₂ /SiO ₂ @M13 RM 7.5	7.5	640
ZrO ₂ /SiO ₂ @M13 RM 6.1	6.1	640
ZrO ₂ /SiO ₂ @M13 RM 3.2	3.2	640
ZrO ₂ /SiO ₂ @M13 RM 1.5	1.5	640

Tabla 1. Síntesis de muestras con diferente relación molar de óxidos mixtos.

En todos los casos el volumen de la mezcla de los precursores se mantuvo constante (458 μL). Las mezclas se agitaron en un vortex, formándose un gel blanco, el cual se dejó reposar 4 días a temperatura ambiente y 2 días a 45°C. Posteriormente, el material obtenido se secó en aire y se calcinó a 600 °C durante cuatro horas.

3.2 Técnicas de caracterización

3.2.1 Espectroscopia infrarroja (FT-IR, Fourier)

Para determinar vibraciones en las muestras, se utilizó la espectroscopia infrarroja. Se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo Spectrum GX. El intervalo de medición fue 220 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , los datos se registraron cada unidad de cm^{-1} . La medición se hizo con la ayuda del accesorio ATR.

3.2.2 Difracción de rayos X (DRX)

Para determinar la cristalinidad del material sintetizado se utilizó la difracción de rayos X en polvo. Las mediciones se realizaron en un difractómetro *Bruker D-8 Advance*, con radiación $\text{Cu K}\alpha$ (1.5406 Å). El intervalo de medición fue de 5 a 70° en 2θ , los datos se tomaron cada 0.02°.

3.2.3 Microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Para investigar el tamaño de partícula y morfología de los materiales porosos se utilizó un microscopio electrónico de transmisión *JEOL 2010* operado a 200 kV. Las muestras fueron preparadas en rejillas de cobre con *formvar* de 200 Mesh, sobre las cuales se colocaron de 2 a 3 μL de muestra resuspendida en agua.

3.2.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para determinar la morfología del material poroso se empleó un microscopio *JEOL* con fuente de cañón de electrones operado a 5 kV. En una porta muestra metálico se adhirió

cinta de carbono con pegamento en ambos lados y, finalmente la muestra se recubrió con una capa de oro (aprox. 10 nm).

Capítulo 4

Resultados

La caracterización y cuantificación del bacteriófago se realizó mediante la técnica de espectroscopia UV-Vis. Esta técnica nos permite cuantificar la concentración del fago en función de la absorbancia a la longitud de onda (λ) de 269 nm (A_{269}), que es el máximo de absorción y corresponde a la contribución de las señales de ADN y proteínas. Además, nos permite estimar la calidad en el ensamble de los fagos ($A_{260}/A_{280} \sim 1.3$). La concentración del bacteriófago se determinó empleando la siguiente ecuación.

$$(1) \quad \frac{\text{mg de fagos}}{\text{mL de solución}} = \frac{(A_{269} - A_{320})}{3.84 \frac{\text{mL}}{\text{mg}}} \quad \text{De acuerdo con lo reportado en la literatura [38].}$$

Donde:

A_{269} : absorbancia en 269 nm y A_{320} : absorbancia en 320 nm.

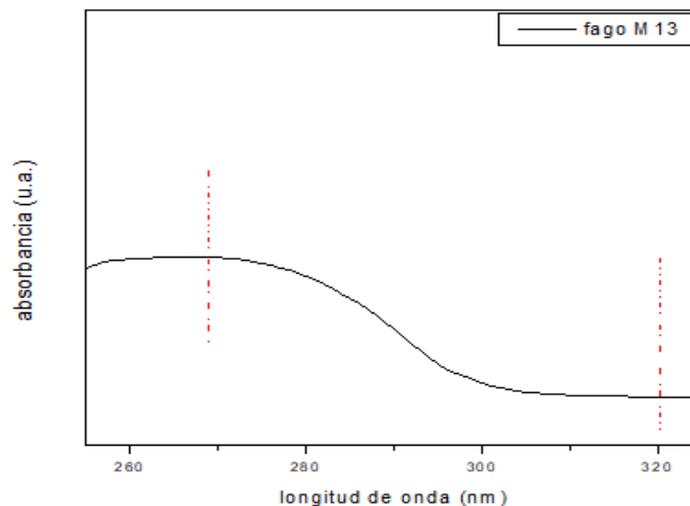


Figura 15. Espectro de UV-vis del fago M13.

En la Figura 15 se muestra un espectro característico del M13. El máximo a la longitud de onda de 269 nm corresponde a la contribución de la absorción de las proteínas que forman la cápside y la molécula de cadena sencilla de ADN. Este valor se toma y se corrige la dispersión empleando el valor de absorbancia a 320 nm. Por otro lado, la relación A_{260}/A_{280} aporta información sobre el correcto ensamble del fago y debe ser alrededor de 1.3. De este espectro y con la ecuación (1) la concentración corresponde a 4 mg/mL y la relación A_{260}/A_{280} es 1.12.

El rendimiento del fago se calculó a partir de un litro de medio de cultivo y se determinó que por cada litro se obtenían alrededor de 215 mg de bacteriófago, que corresponde a lo obtenido por otros grupos. [39] Una vez obtenido, purificado y cuantificado se procedió a la síntesis de los materiales. En todos los casos se obtuvieron polvos los cuales fueron caracterizados por FTIR, difracción de rayos X, microscopia de transmisión electrónica (TEM, siglas en ingles), microscopia electrónica de barrido (SEM, siglas en inglés) y adsorción de nitrógeno. Como ya se mencionó el óxido de zirconio puede adoptar varias fases cristalinas en función de la temperatura y/o en función de la adición de impurezas (dopantes). Además de la síntesis ya descrita en la parte experimental ($ZrO_2@M13$ para la fase pura y $ZrO_2/SiO_2@M13$ para la fase mixta) se hizo un estudio en función de la cantidad de dopante (Si) y se analizó su influencia en la cristalinidad de cada una de las fases obtenidas.

4.1 Espectroscopia infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo (IR) de las muestras se tomaron antes y después de calcinar. Los espectros que se presentan en la Figuras 16 a y b, corresponden a las muestras antes de calcinar. En ambos sólidos ($ZrO_2@M13$ y $ZrO_2/SiO_2@M13$) se observa una banda a 3298 cm^{-1} , correspondiente al alargamiento del enlace O–H, el cual se atribuye a los grupos hidroxilos expuestos en la superficie. Esta banda persiste en los óxidos mixtos y es más intensa a mayor concentración de zirconio. También se observan bandas a 1646 y 1543 cm^{-1} , típicas de amida I y de la flexión del grupo NH_2 respectivamente, provenientes de los grupos funcionales de la cápside del fago. En la región de $400\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ no se definen claramente las bandas. En contraste los óxidos mixtos presentan una banda alrededor de 916 cm^{-1} que

se relaciona con la vibración de estiramiento Si-O-Zr. De hecho, se observa que a medida que aumenta la concentración de Si, la intensidad aumenta y sufren un ligero corrimiento a mayor número de onda.

En las Figura 16 c y d se muestran los espectros de las muestras calcinadas. Se distingue la desaparición de todas las bandas asociadas al fango, así como a moléculas de agua. Mientras que las bandas asociadas a la red Zr-O prevalecen. Las bandas a 569 y 487 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de estiramiento de los enlaces Zr-O y Zr-OH, respectivamente. En los materiales dopados con Si ($\text{ZrO}_2/\text{SiO}_2@M13$) se observa una banda a 930 cm^{-1} que corresponden al estiramiento del enlace Si-O-Zr. De hecho, esta banda comienza a aparecer cuando la RM es 6.1 y aumenta de intensidad y se desplaza a mayor número de onda, a medida que la cantidad de Si aumenta.

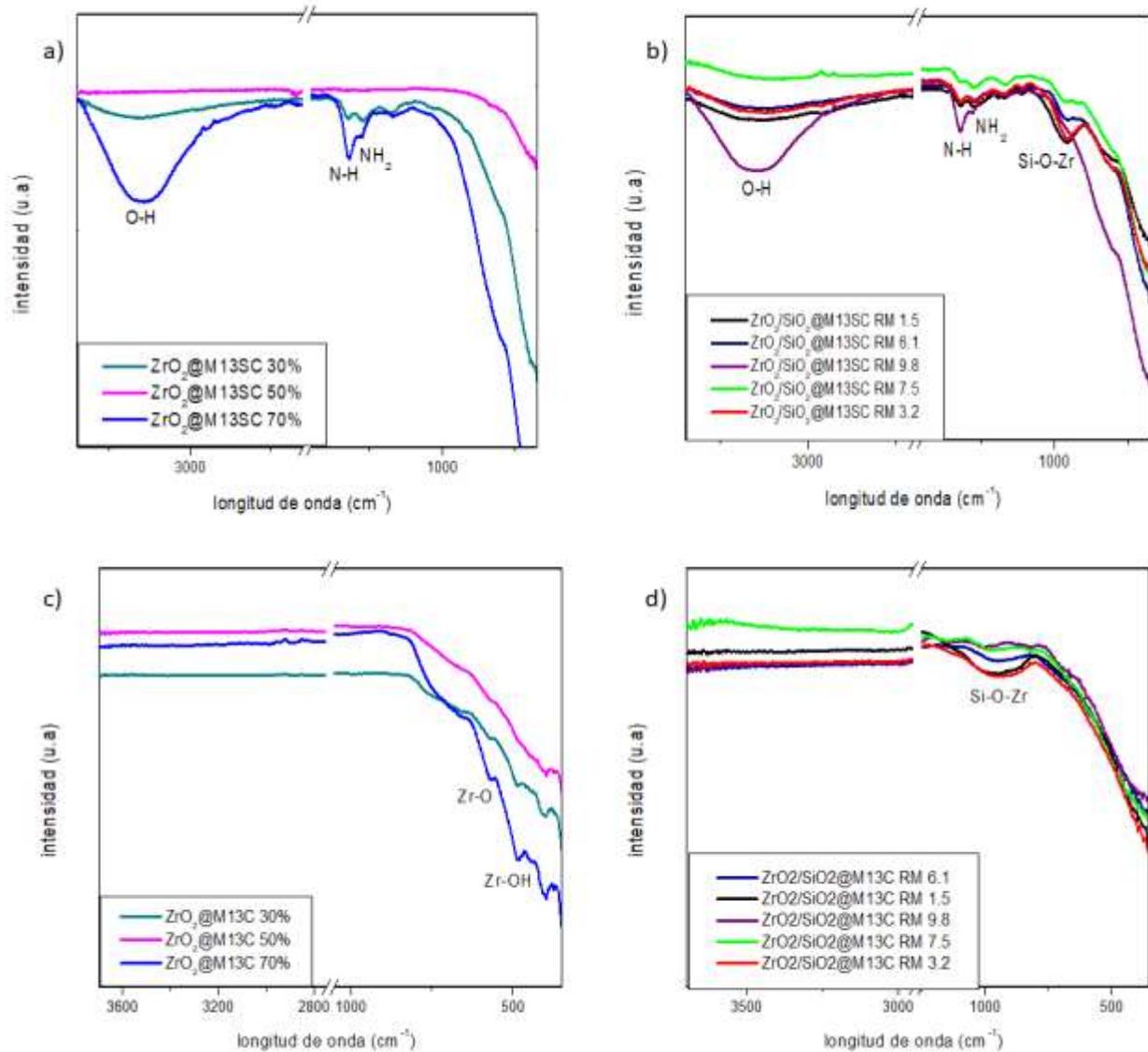


Figura 16. Espectros de los materiales obtenidos ZrO₂@M13 y a diferentes RM ZrO₂/SiO₂@M13 a y b) antes de calcar, c y d) después de calcar.

4.2 Difracción de Rayos X (DRX)

La técnica de difracción de rayos X (DRX) fue empleada para obtener información acerca de la cristalinidad de los materiales. En todos los casos se empleó el fago M13 como plantilla y el material obtenido se calcar a 600 °C. Se sintetizaron materiales de óxido de zirconio puro

y dopado con silicio. En los experimentos con propóxido de zirconio se emplearon diferentes cantidades de zirconio para observar si existía diferencia en las cristalinidades del material, las cuales fueron al 70, 50 y 30% en n-propanol, sin embargo, se observó que en todos los casos el material obtenido fue cristalino como se muestra en la Figura 18. Del difractograma se observan picos a $2\theta = 17.7, 24.4, 28.3, 31.7, 34.4, 40.9, 45.3, 50.2, 55.6$ y 60.3° , que corresponden a los planos (0 0 1), (0 1 1), ($\bar{1}$ 1 1), (1 1 1), (0 2 0), ($\bar{1}$ 1 2), ($\bar{2}$ 0 2), ($\bar{2}$ 2 1), ($\bar{3}$ 1 1) y (2 0 3) respectivamente, típicos de la fase monoclinica (M). (Anexo C)

En la síntesis de ZrO_2 dopado con Si observamos resultados diferentes. Para estudiar el efecto de la cantidad de dopante se realizaron síntesis empleando diferentes relaciones molares Zr/Si que van desde 10 hasta 1. Cuando la cantidad de silicio es pequeña (Zr/Si 9.8) se obtienen fases cristalinas de acuerdo con la Figura 19. Las reflexiones se observan a $2\theta = 30.2, 35.4, 50.2, 59.2, 60.2^\circ$, que pueden asignarse a los planos (0 1 1), (1 1 0), (1 1 2) y (1 2 1) respectivamente, de la estructura tetragonal (T). De estos resultados observamos que hay una distorsión en la red monoclinica al introducir iones de Si promoviendo la formación de la fase metaestable tetragonal (T). Cuando la RM $ZrO_2/SiO_2@M13$ es grande (9.8), es decir, la cantidad de zirconio es casi 10 veces mayor respecto de la de silicio, se obtienen muestras cristalinas (T), a medida que la RM $ZrO_2/SiO_2@M13$ disminuye el material obtenido es amorfo (1.0-6.1). Cabe mencionar que a diferencia de lo reportado en la literatura las fases cristalinas (con o sin fago) se forman a temperaturas relativamente bajas ($600^\circ C$) mientras que otros autores reportan temperaturas mayores a los $1000^\circ C$.

Por un lado, el zirconio y el silicio tienen radios iónicos de 0.59 y 0.26 \AA respectivamente, cuya relación $ZrO_2/SiO_2@M13$ es 2.27, es decir el átomo de silicio es más pequeño lo que le permite ocupar otros huecos en la estructura y como se verá más adelante permite una transición de fase a temperaturas cercanas a los $600^\circ C$. Recientemente se ha observado que no solo la temperatura influye en el proceso de cristalización, sino que hay otros factores que deben tomarse en cuenta como son: presión, pH y concentración de oxígeno y agua en el ambiente. Bajo las condiciones apropiadas se puede dirigir la ruta de reacción termodinámica sobre la cinética o viceversa. De hecho, se ha observado que la fase

monoclínica de ZrO_2 está separada por sólo 9.5 KJ/mol de la fase tetragonal. Además, el tamaño de clúster y de las nanopartículas nacientes pueden dirigir la formación de estructuras metaestables sobre las estables, controlando la maduración de Ostwald vs agregación como se muestra en la Figura 17. [40]

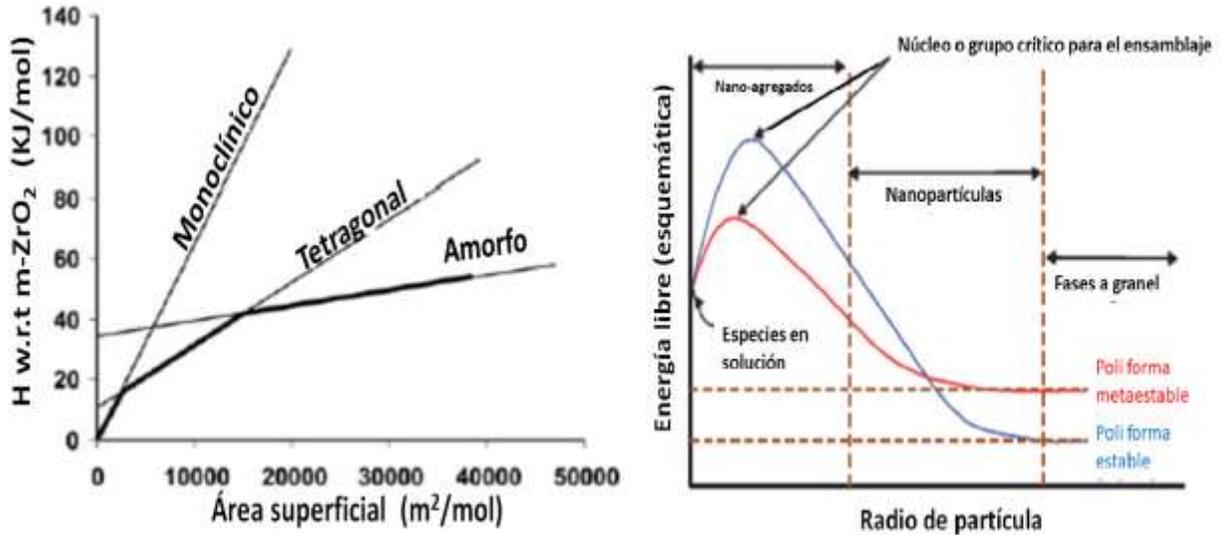


Figura 17. Esquema de representativo de la energía de estructuras cristalinas en relación con su área superficial. [40]

La estructura porosa de la muestra se analizó mediante DRX a ángulo bajo. En todas las muestras independientemente de la concentración de fago y de la ausencia o presencia de Si en la síntesis, el material obtenido presenta un pico a $2\theta = 1.18^\circ$ típico de estructuras mesoporosas, que corresponde a una distancia de 7.4 nm. Esta distancia se corresponde bien con el diámetro del fago M13 (6.5 nm). Sin embargo, debe mencionarse que la reflexión es de baja intensidad como se observa en la figura 20.

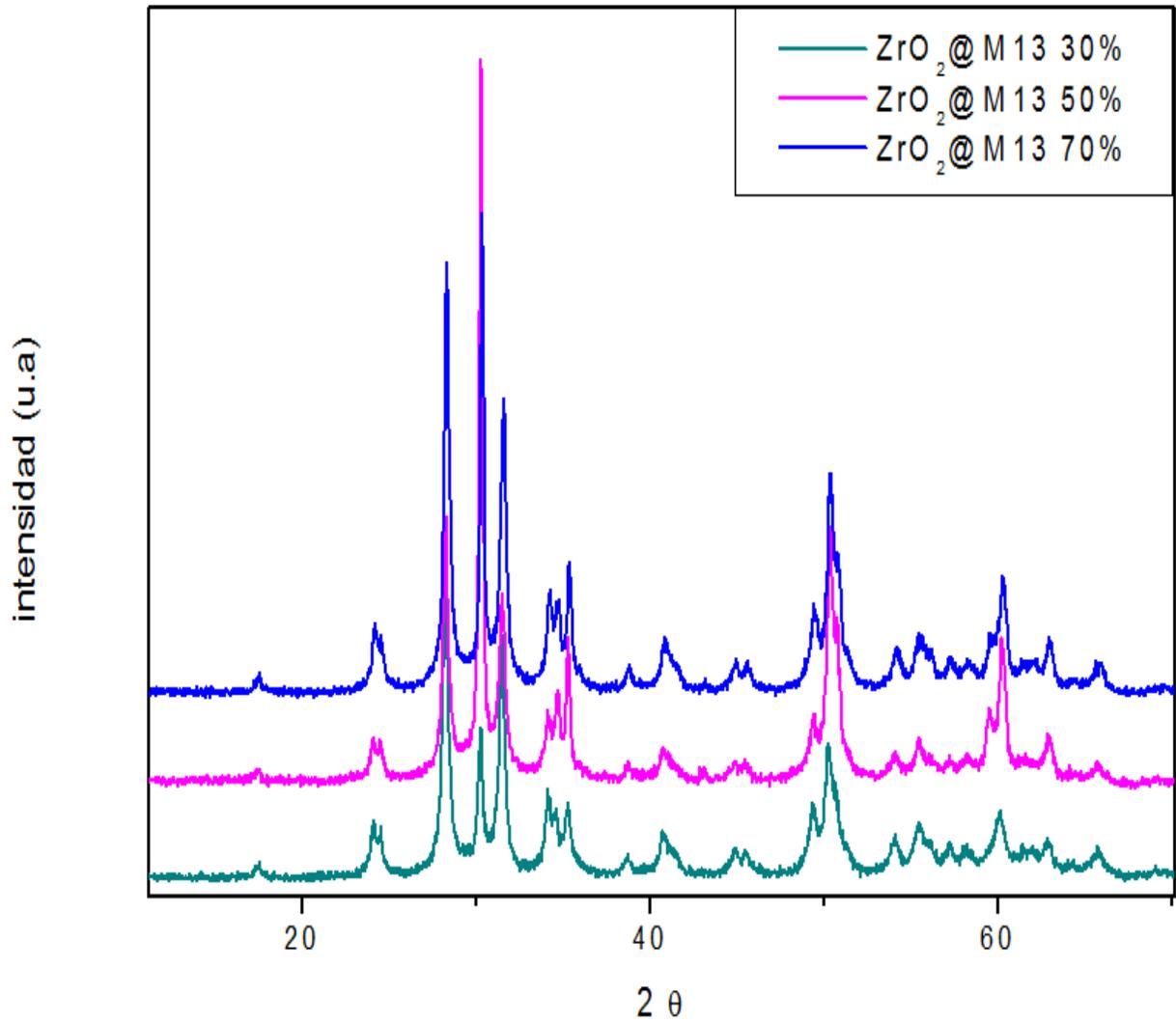


Figura 18. Difractogramas de las muestras obtenidas. En todas puede observarse la estructura monoclinica (muestras puras ZrO₂@M13).

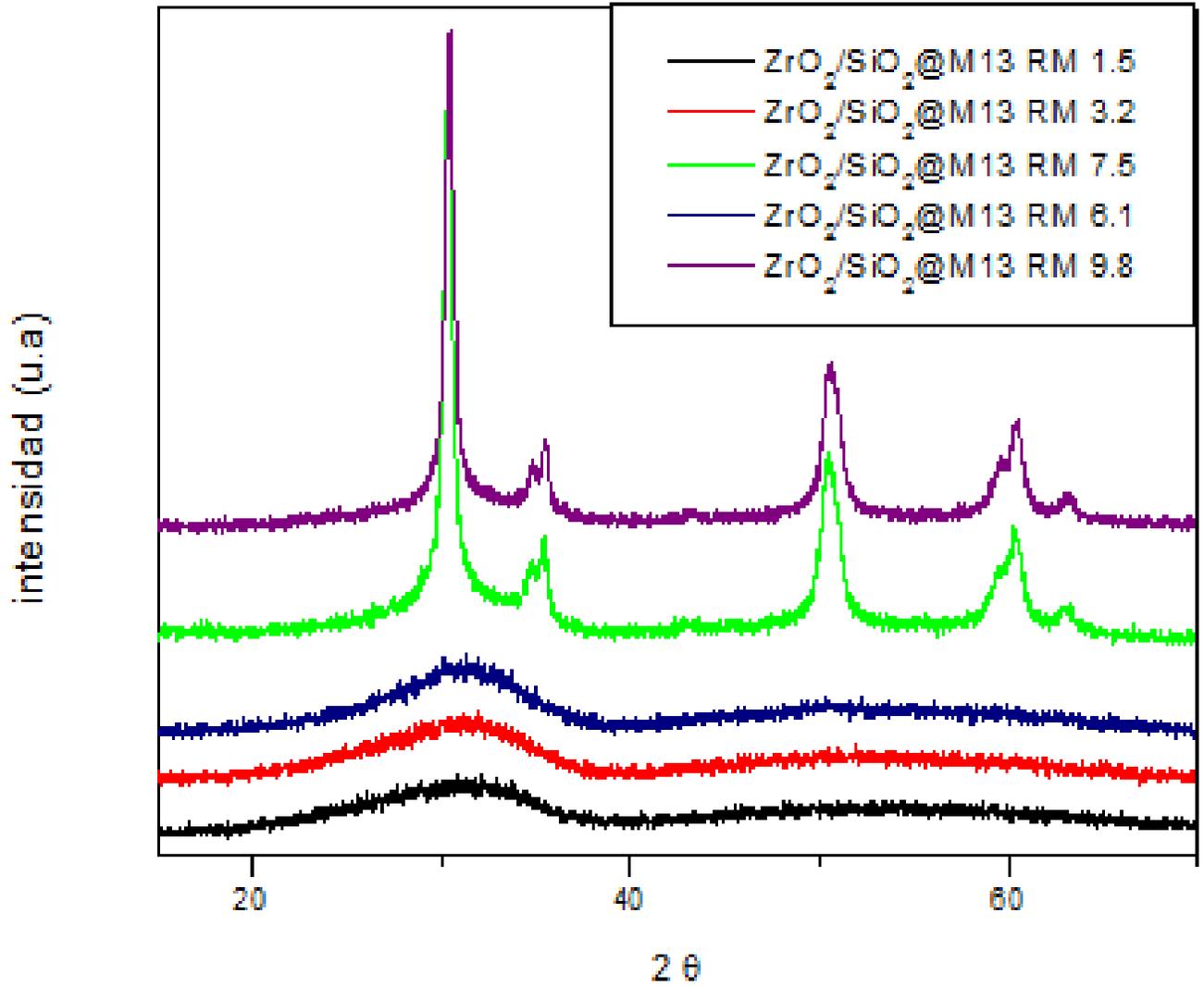


Figura 19. Difractogramas de RX, en los cuales se observan planos típicos de una estructura tetragonal a RM ZrO₂/SiO₂@M13 altas y estructura amorfa a RM bajas.

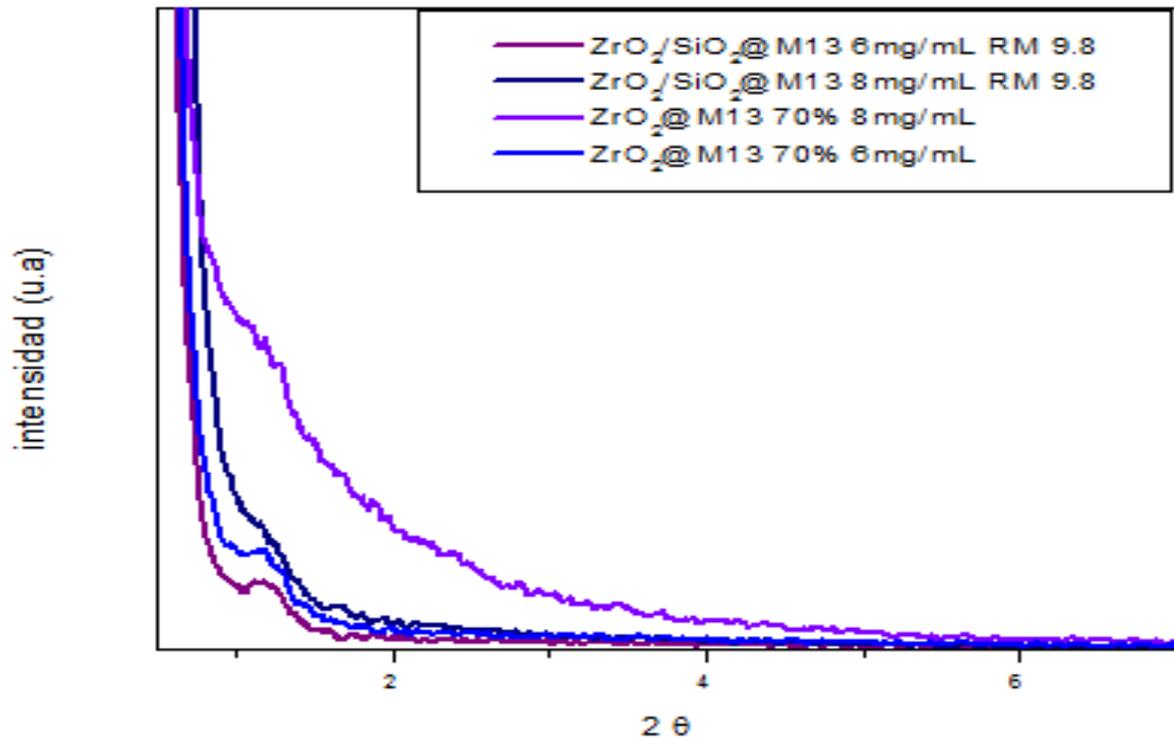


Figura 20. Difractogramas de RX a bajo ángulo, en el cual se observan señales características de mesoporos

4.3 Microscopia de transmisión eléctrica (TEM)

Para estudiar el arreglo de poros en las muestras, éstas se analizaron por técnicas de microscopia electrónica. Las imágenes obtenidas por microscopia para el ZrO_2 puro ($ZrO_2@M13$) y dopado ($ZrO_2/SiO_2@M13$) se observan en las Figuras 21 y 22. En el caso de sólidos que sólo contiene oxido de zirconio, se analizaron muestras en cuya síntesis se empleó alcóxido de zirconio a diferentes relaciones molares respecto del propanol (ver sección 3 b). Cuando se emplea el alcóxido sin diluir, difícilmente se ven estructuras porosas, sin embargo, cuando la cantidad de zirconio disminuye se observa un incremento en la

porosidad de los sólidos.

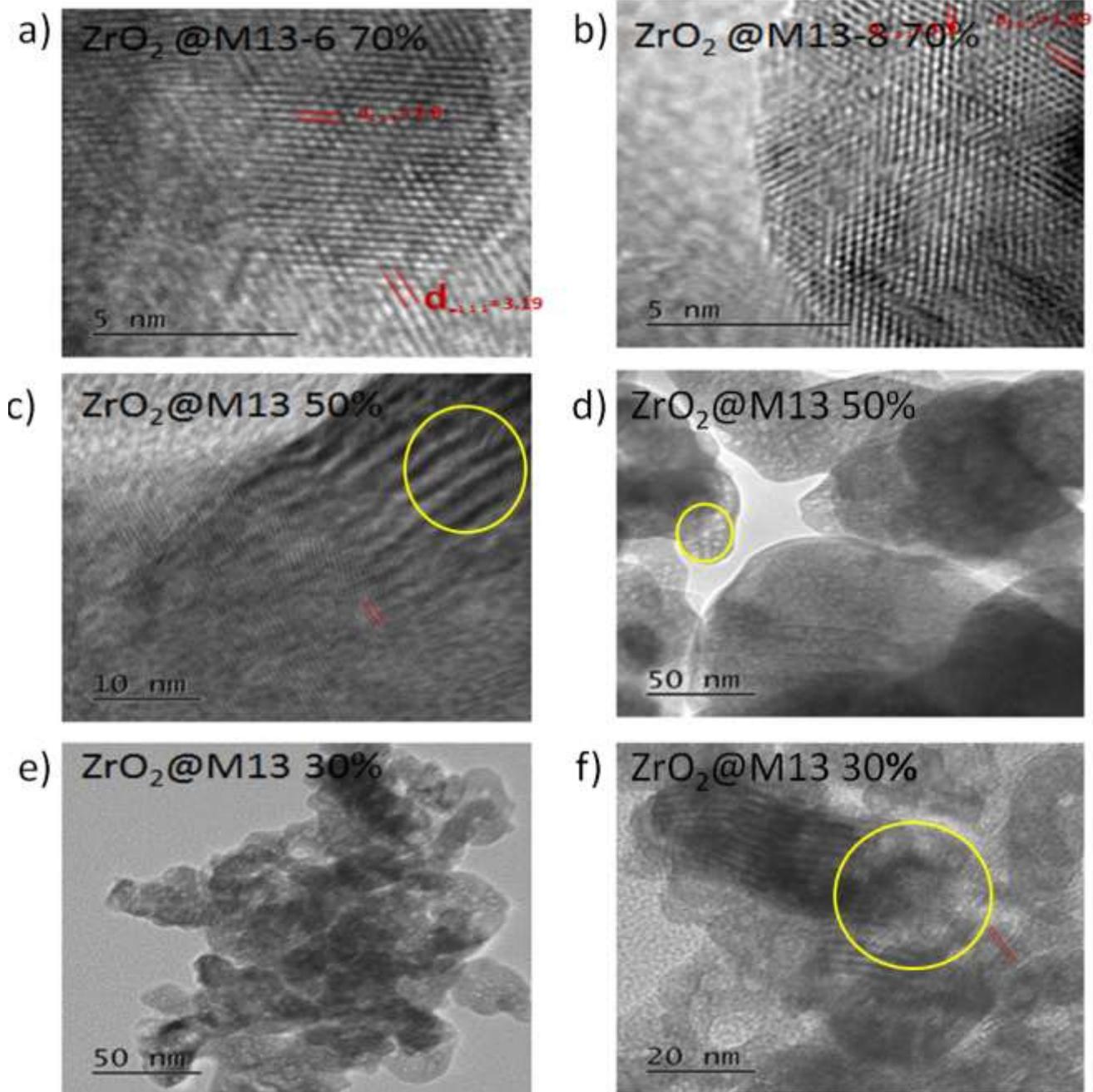


Figura 21. Micrografías de $\text{ZrO}_2 @ \text{M13}$ 6 y 8 mg/mL 70%, 30 y 50% a 6 mg/mL.

De las imágenes anteriores, se advierte claramente que la fase pura es cristalina y se observan dos planos cristalinos separados por una distancia de 2.8 y 3.19 Å que

corresponden a los planos $(1\ 1\ 1)$ y $(\bar{1}\ 1\ 1)$, confirmando que la fase corresponde a la estructura monoclinica. Si la cantidad de zirconio disminuye (50 %), la fase aún es cristalina (Figura 21 c), y al mismo tiempo se observan regiones con canales porosos de alrededor de 2.5 nm (circulo amarillo). Si la concentración de zirconio (30 %) continúa disminuyendo, el sólido muestra una gran porosidad, de hecho, hay dos tipos de poros: unos que semejan círculos, que podrían corresponder a vistas transversales de huecos ordenados aproximadamente de manera hexagonal como se señala en la Figura 21 d con un circulo amarillo. Al igual que en la muestra a 50 % se observan canales porosos de ~ 2 nm.

La microscopía de las muestras mixtas también fue analizada por TEM. A relaciones molares grandes, es decir con poca cantidad de silicio, el sólido es cristalino debido a que pueden apreciarse planos cristalinos de 2.92 y 1.92 Å que son asignados a los planos $(1\ 0\ 1)$ y $(2\ 0\ 0)$, típicos de la fase tetragonal, de acuerdo con la ficha (anexo C).

De las imágenes anteriores, se advierte claramente que la fase pura es cristalina y se observan dos planos cristalinos separados por una distancia de 2.8 y 3.19 Å que corresponden a los planos $(1\ 1\ 1)$ y $(\bar{1}\ 1\ 1)$, confirmando que la fase corresponde a la estructura monoclinica. Si la cantidad de zirconio disminuye (50 %), la fase aún es cristalina (Figura 21 c), y al mismo tiempo se observan regiones con canales porosos de alrededor de 2.5 nm (circulo amarillo). Si la concentración de zirconio (30 %) continúa disminuyendo, el sólido muestra una gran porosidad, de hecho, hay dos tipos de poros: unos que semejan círculos, que podrían corresponder a vistas transversales de huecos ordenados aproximadamente de manera hexagonal como se señala en la Figura 21 d con un circulo amarillo. Al igual que en la muestra a 50 % se observan canales porosos de ~ 2 nm.

La microscopía de las muestras mixtas también fue analizada por TEM. A relaciones molares grandes, es decir con poca cantidad de silicio, el sólido es cristalino debido a que pueden apreciarse planos cristalinos de 2.92 y 1.92 Å que son asignados a los planos $(1\ 0\ 1)$ y $(2\ 0\ 0)$, típicos de la fase tetragonal, de acuerdo con la ficha (anexo c).

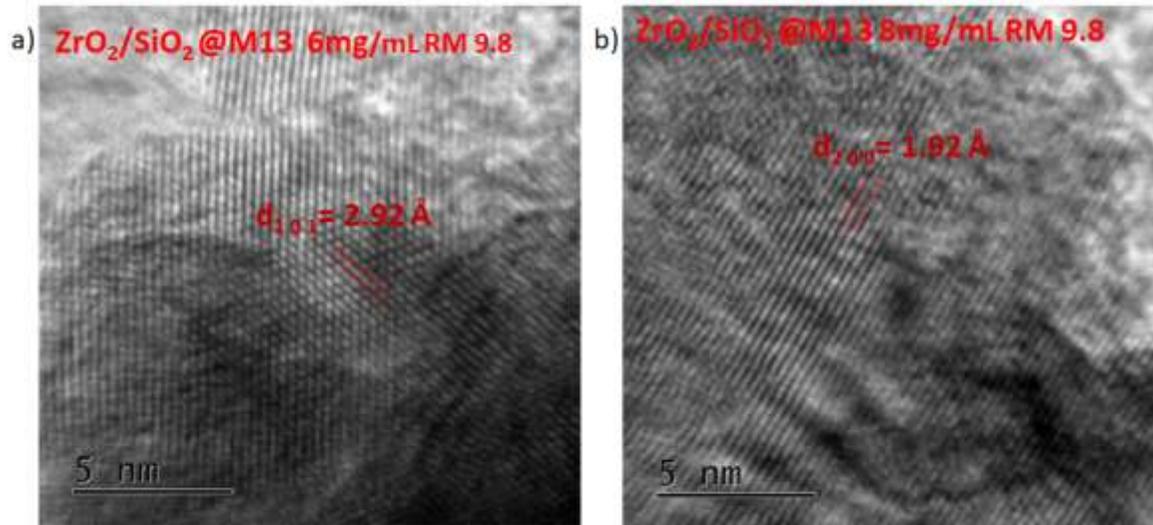


Figura 22. Imágenes de microscopía de la fase mixta, a diferente concentración de fago a) 6 mg/mL y b) 8 mg/mL; ambas con relación molar Zr/Si de 9.8.

4.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para obtener información de la morfología y caracterizar los sólidos se realizó un estudio de microscopía de barrido. Los sólidos obtenidos a diferentes concentraciones de fago no muestran diferencias significativas, en ambas se observa que la muestra no es homogénea y está formada por partículas que van desde una micra hasta decenas (Figura 23 a y b). Sin embargo, si observamos la muestra a mayor amplificación podemos observar que hay regiones porosas, cuyas paredes están construidas a su vez de partículas de alrededor de 100 nm, incluso es posible observar partículas de ~ 50 nm cuando la concentración del fago disminuye a 6 mg/mL.

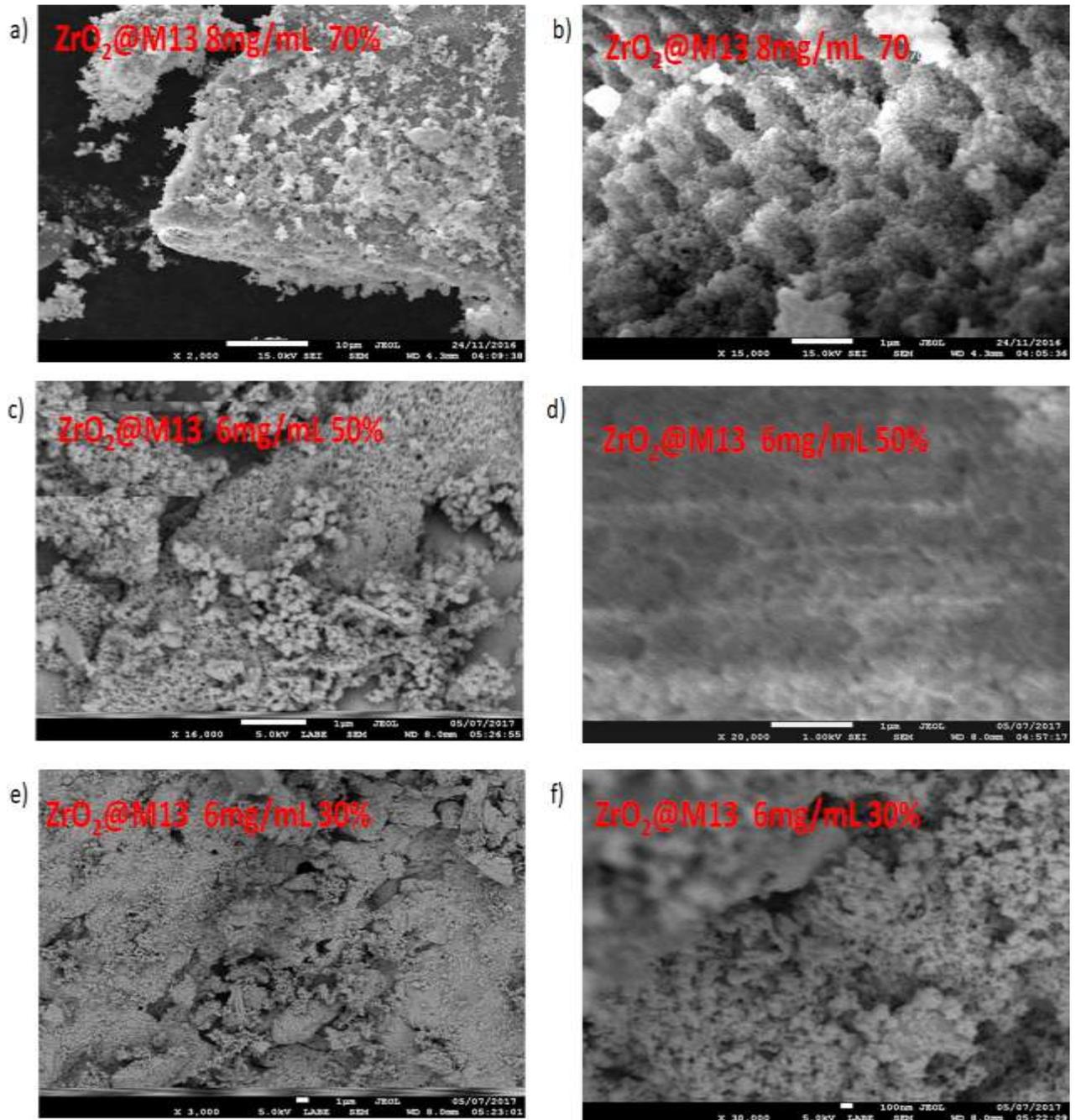


Figura 23. Imágenes de ZrO₂@M13 6 y 8 mg/mL.

A medida que la concentración de zirconio disminuye, se logró observar mayor porosidad en el material final. Esto se ilustra en las imágenes f y g de la Figura 24. Aquí se nota claramente que la muestra es más homogénea y prácticamente porosa, pero el tamaño de los poros muestra una amplia distribución.

Las muestras dopadas con Si presentan similitudes con respecto a las puras, ya que igual se observan partículas de varias micras y nanómetros. Note que las partículas no son sólidas, sino que contienen poros (Figura 24 a y c) y la “pared” es un agregado de partículas más pequeñas como se muestra en la Figura 24 b. Cuando la concentración de fago aumenta se forman estructuras tubulares de más de 10 μm , que vistas transversalmente (recuadro rojo Figura 24 c) se observan como las paredes que forman las estructuras porosas. Sin embargo, estos tubos también pueden observarse como estructuras aisladas, muy similares a las obtenidas por otros grupos que emplean TMV, en lugar del fago M13 (Figura 8b).

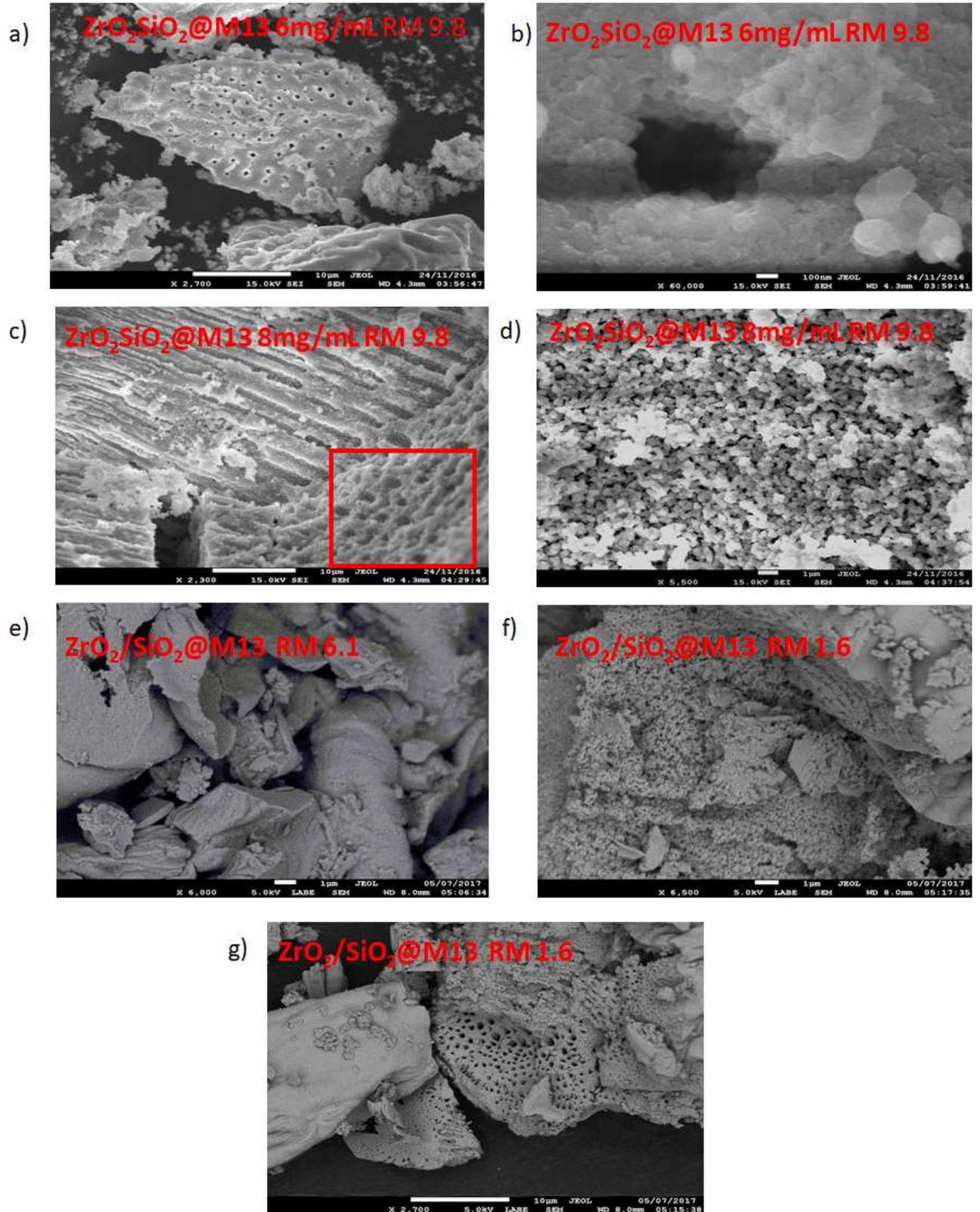


Figura 24. Microscopías de muestras mixtas con diferente RM.

En las muestras con RM pequeña podemos observar que el material presenta una mayor homogeneidad en las paredes, así como una distribución mayor de poros.

4.5 Isotermas de adsorción-desorción de N₂

Para estudiar la porosidad de los sólidos obtenidos se realizaron experimentos de adsorción-desorción de N₂. Las muestras analizadas corresponden a las calcinadas a 600 ° C durante 4 h. En la figura 25 se observan isotermas tipo IV típicas de estructuras mesoporosas. Estas isotermas se caracterizan por un prellenado de los poros que mantiene aproximadamente constante la presión relativa, y solo se observa un aumento drástico a presiones relativas altas, que es cuando el N₂ comienza a condensar en el poro. Como puede observarse en nuestras gráficas el volumen (N₂) adsorbido se presenta a presiones relativas mayores a 0.8 indicando la presencia de poros relativamente grandes y el vaciado de estos presenta solo una pequeña histéresis lo que se ve reflejado en un área superficial baja. De hecho, en nuestro caso el área superficial obtenida por el método BET para las muestras que contienen 70% de zirconio y fueron sintetizadas con diferentes concentraciones de fago (6 y 8 mg/mL), son de 12.24 y 13.33 m²/g respectivamente, sus isotermas se observan en las gráficas 25a y b, mientras que para la muestra que contiene menor cantidad de zirconio (30%) el área obtenida es de 27.98 m²/g, de la cual se observa su isoterma en la gráfica 25c

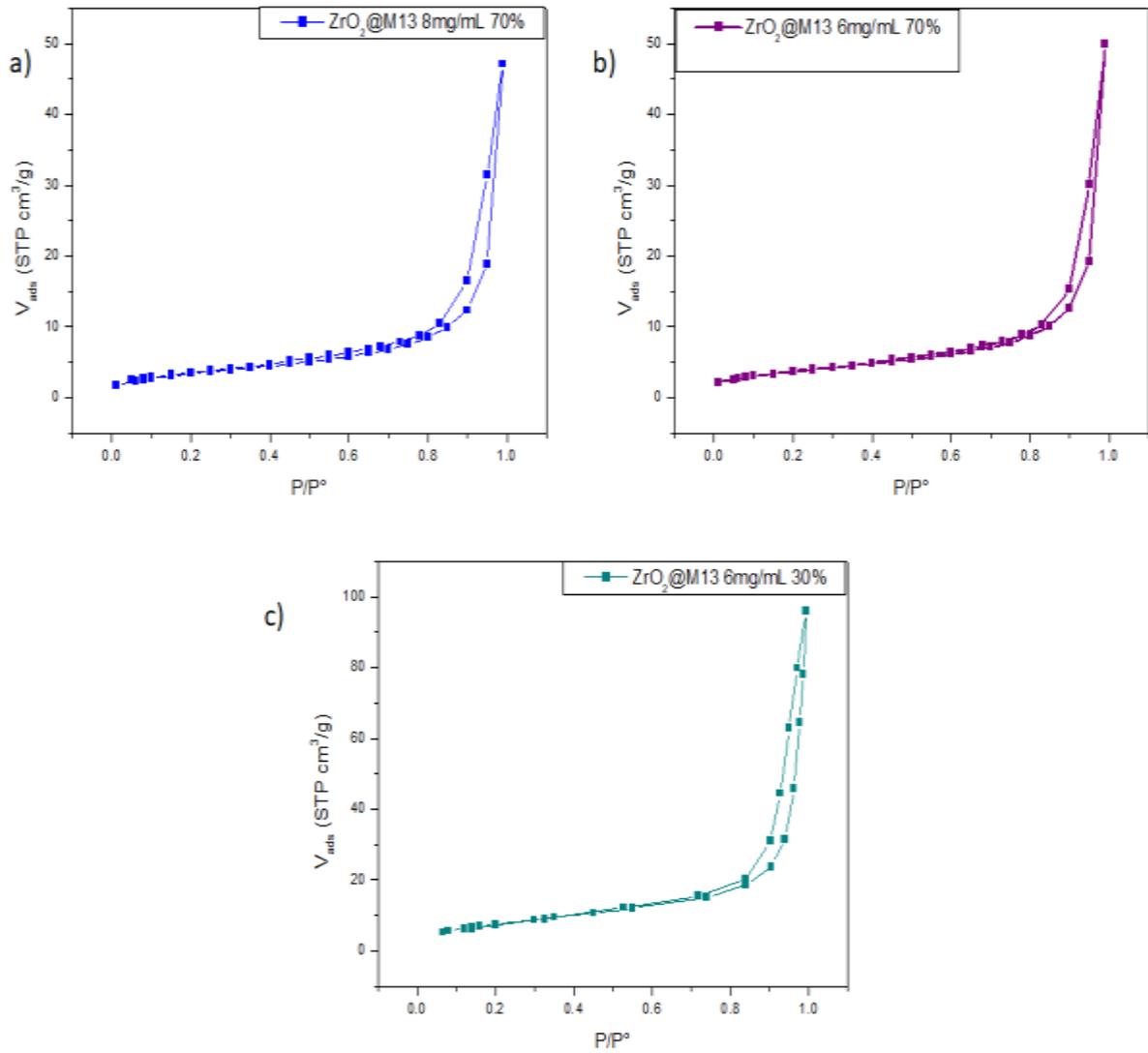


Figura 25. Isothermas de $ZrO_2@M13$, a) 8 mg/mL al 70 % de Zr, b) 6 mg/mL al 70% de Zr y c) muestra de $ZrO_2@M13$ 6 mg/mL al 30% de Zr.

Capítulo 5

5.1 Discusión

Como se ha demostrado previamente el fago es capaz de actuar como plantilla en la formación de estructuras porosas. Sin embargo, debe mencionarse que las estructuras porosas obtenidas hasta ahora son de SiO_2 [28, 29]. En esta síntesis se empleó como precursor TEOS y APTES. El APTES además de servir como fuente de silicio, debido a la existencia de grupos amino interacciona electrostáticamente con la superficie del fago, permitiendo la formación inicial de la red Si-O.

Si bien se han realizado síntesis de óxido de silicio empleando como precursores TEOS y APTES, en los cuales el silicio tiene una carga parcial prácticamente igual, que como se discutirá más adelante propicia que su velocidad de hidrólisis (V_h) sea lenta (horas). Así antes de la hidrólisis se permite la interacción de los grupos amino del APTES con los grupos ácido (glutamato y aspartato) de las proteínas que forman la cápside de cada fago. Posteriormente, las moléculas de APTES actúan como puntos de condensación y la red Si-O comienza a formarse en la cubierta del fago. Debido a que el fago puede comportarse como cristal líquido, a la concentración que se emplea (~ 4 mg/mL, fase esméctica) forma fases hexagonales de alrededor de 76 fagos (ver Figura 26). La red Si-O se forma en la superficie de la fase hexagonal y en las regiones intersticiales entre los fagos, dando origen a estructuras porosas cuyo diámetro externo es de 88.5 nm.

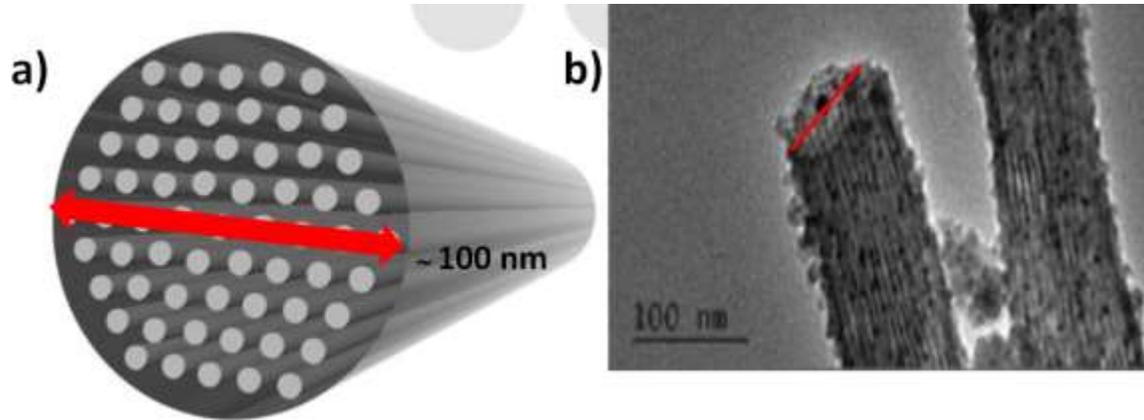


Figura 26. a) representación esquemática de un ramillete de aproximadamente 76 fagos, b) microscopia de estructura porosa de óxido de silicio adornada con nanopartículas de oro.

Adaptado de las referencias. [28, 29]

Por otro lado, alcóxidos de metales de transición como el zirconio o titanio debido a que tiene menor electronegatividad presentan menos estabilidad hacia las reacciones de hidrólisis y condensación, ya que son más electrofílicos. Se sabe que los alcóxidos metálicos se hidrolizan, incluso con el agua del ambiente. Entre los factores determinantes para la velocidad de hidrólisis (V_h) se encuentran la carga parcial del núcleo metálico y el tamaño del grupo alquilo. En el caso del TEOS el silicio tiene una carga parcial de ~ 0.28 mientras que para el zirconio (propóxido) tiene una carga parcial ~ 0.74 , que es aproximadamente tres veces mayor que la del silicio. Esto provoca que la V_h sea rápida y la formación de oligómeros sea prácticamente instantánea. Por esta razón, la reactividad del propóxido de zirconio en solución acuosa es sumamente difícil de controlar. [41]

Cuando el fago, que se encuentra en solución acuosa, interacciona con el alcóxido de zirconio, las reacciones de hidrólisis-condensación suceden rápidamente y los oligómeros no pueden penetrar la región intersticial fago-fago, ya que su V_h es muy alta, y la formación de la red Zr-O sólo se da en la superficie del ramillete. Esto podría explicar por qué se obtienen estructuras porosas con diámetros de poro de alrededor de 100 nm, cuando la concentración del alcóxido de zirconio es 70%. Sin embargo, cuando se tiene menor

concentración de zirconio la reacción comienza a ser un poco más lenta y se obtiene una mayor distribución de poros que va de los 30 a 100 nm.

Para las muestras mixtas, a pesar de que el APTES reacciona más lento, el zirconio sigue reaccionando rápidamente provocando la formación de oligómeros grandes que interaccionan con la superficie del ramillete de fagos y que como consecuencia de su tamaño no pueden penetrar la región fago-fago, en estas muestras se estudió la influencia en la RM Zr/Si, para tratar de controlar la V_h y estudiar sus propiedades. A pesar de que la reactividad de los precursores comienza a disminuir y la V_h es más lenta se comienza a perder la cristalinidad del material, por lo tanto, el silicio ya no estabiliza la fase cristalina del zirconio.

De los resultados mostrados en el capítulo anterior, en la síntesis de la fase pura de zirconio ($ZrO_2@M13$ 70, 50 y 30%) claramente se demostró que la cantidad de fago no influía en la morfología final del material.

Por medio de la espectroscopia infrarroja observamos la formación de nuevos enlaces debido a la formación de las redes M–O. Antes de calcinar las muestras se pudo observar la presencia de vibraciones correspondientes a la estructura orgánica debida a la presencia del fago, cabe destacar que en las diferentes concentraciones de zirconio estas vibraciones prevalecen, y que las vibraciones correspondientes a zirconio no se observa claramente, sin embargo después de calcinar se observan bandas más intensas en la región de 600 a 300 cm^{-1} , que representan vibraciones de estiramiento de los enlaces Zr–O y Zr–OH, esto puede relacionarse con los difractogramas obtenidos por medio de DRX, ya que antes de calcinar tenemos un material amorfo, y después de calcinar se obtiene una estructura cristalina monoclinica, la cual no cambia al disminuir la cantidad de zirconio en las diversas síntesis.

Por medio de TEM se corrobora la cristalinidad del material en las diferentes síntesis, además de observar que conforme disminuye la concentración de zirconio se presentan canales y círculos porosos de alrededor de 2 nm de diámetro, que aun así no concuerdan con el diámetro del fago, pero en DRX a bajo ángulo se presenta una señal tenue que representaría la existencia de estos poros, sin embargo en SEM, para las muestras que

contiene la concentración más alta de zirconio tiene poros de aproximadamente 100 nm de diámetro ya que como se ha mencionado es aproximadamente un ramillete de ~ 77 fagos, cuando la concentración de zirconio comienza a disminuir se observan poros de diferentes tamaños los cuales van de 30 a 100 nm, esto indica que como la reacción es un poco más lenta los precursores logran penetrar algunos ramilletes más pequeños (~ 16 fagos) y en otras regiones los oligómeros siguen reaccionando sobre las superficie de los ramilletes grandes.

Para las muestras mixtas, por espectroscopía IR, se observó que a medida que aumenta la cantidad de silicio la banda correspondiente al estiramiento del enlace Si–O–Zr se desplaza a mayor número de onda de 916 a 930 cm^{-1} , indicando la contribución de la vibración de los nuevos enlaces formados de Si–O. La formación de esta red (Si–O) está apoyada también en los resultados de DRX. A medida que aumenta la cantidad de silicio la estructura cristalina típica de la red tetragonal comienza a deformarse debido a que los átomos de Si comienzan a ocupar los huecos intersticiales (tetraédrico), deformado la longitud del enlace Zr–O. A medida que estos huecos son ocupados el silicio sustituye posiciones del zirconio, lo que lleva a la ruptura total de la red cristalina. En los difractogramas para las diferentes RM podemos observar que a RM pequeñas el material comienza a ser amorfo.

Por medio de TEM al igual que en las muestras puras, cuando se tiene la mayor RM se observan planos cristalinos correspondientes a la estructura cristalina tetragonal, mientras que en SEM podemos ver poros de aproximadamente 100 nm, y algunos canales porosos, cuando la RM disminuye se observa un mayor número de poros que siguen siendo de aproximadamente 100 nm, a pesar de que en DRX a bajo ángulo podemos observar un pico muy tenue que puede representar la existencia de estructuras mesoporosas, de lo cual podemos decir que a pesar de que la reactividad en la síntesis disminuye los oligómeros siguen interaccionando con la superficie de los ramilletes grandes de fagos y solo logra penetrar regiones muy pequeñas de fago-fago, lo cual nos permite ver esa señal débil en DRX a bajo ángulo.

Por otro lado, de las muestras analizadas por BET, se obtiene un isoterma tipo IV típica de estructuras porosas, de las cuales se tienen áreas pequeñas, representando la presencia de estructuras porosas con diámetros grandes, que es lo que se ha mencionado anteriormente en los análisis de SEM y TEM.

Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que la reacción con especies de zirconio ocurre rápidamente y no hay control en las reacciones de hidrólisis-condensación, llevándose a cabo en la superficie de la solución y no en la superficie del fago, mientras que cuando la concentración de zirconio comienza a disminuir se comienza a obtener poros más pequeños.

5.2 Conclusiones y perspectivas

Se sintetizaron estructuras porosas de ZrO_2 y ZrO_2/SiO_2 , de las cuales se obtienen tamaños de poro de alrededor de 100 nm, sin embargo, estas estructuras no fueron ordenadas, respecto de la distribución del tamaño de poro.

Se determinó que la concentración de fago entre 6 y 8 mg/mL no influye en la formación de estas estructuras porosas, por tal motivo se decidió trabajar a 6 mg/mL.

Para las muestras puras se intentó optimizar la concentración de zirconio que permitiera lograr una mayor interacción entre este y la región intersticial fago-fago, lo que permitió obtener poros de aproximadamente 30 nm los cuales coinciden con el diámetro de un ramillete formado aproximadamente de 16 fagos, sin embargo, se siguen obteniendo en menor cantidad poros de 100 nm de diámetro.

Para los óxidos mixtos se realizó una serie de experimentos y se determinó la cantidad de silicio que permite la estabilización de la estructura tetragonal en el material mixto. Estos experimentos demostraron que a pesar de tener una RM (Zr/Si) pequeña los oligómeros se siguen formando en la superficie de los ramilletes de fagos, lo que impide obtener estructuras porosas del tamaño del fago, ya que siguen prevaleciendo poros de 100 nm de diámetro.

De los resultados obtenidos se puede determinar que el fago no es una plantilla universal para síntesis de estructuras porosas empleando alcóxidos, por lo tanto, se pretende optimizar la síntesis de óxidos empleando otros precursores, que posean una reactividad lenta en medio acuoso, que les permita interactuar con la superficie de cada fago.

Anexo A

Crecimiento y purificación del bacteriófago

Se usaron medios de cultivo 2X YT, Luria Broth (LB) y LB agar. La preparación de cada uno de ellos consistió en pesar 5 g de extracto de levadura, 10 g de peptona, 5 g de NaCl, para el 2X YT son 6 g adicionales de peptona, para el LB agar se agregan 12 g de agar, se agregó suficiente agua milli Q hasta un litro. Los medios fueron esterilizados en una autoclave 15 minutos a 121°C y 15 psi (libra-fuerza por pulgada cuadrada).

Como primer paso, en condiciones de estéril se rayó una caja de LB agar que contenía tetraciclina (Cf = 10 µg/mL) con un stock de glicerol de la cepa de E. coli (*XL-Blue*), la caja se incubo por 16 horas a temperatura de 37 °C. Al cabo de las 16 horas se observaron colonias en la caja.

De las colonias crecidas, del paso anterior, se tomó una y se inoculó en 12 mL de LB suplementado con tetraciclina, se dejó creciendo con agitación de 200 rpm por 16 horas. (este es el cultivo *overnight*, ON)

En cuatro matraces de 2 litros se colocaron 250 mL de medio 2X YT en cada uno se adicionó tetraciclina (500 µL a cada matraz), posteriormente se colocó 2.5 mL de bacteria (ON) a cada matraz y 500 µL de un stock de bacteriófago M13 (M13mp18), y se dejó agitando a 200 rpm, 37 °C y 16 horas.

Para la purificación se centrifugó el medio a 8000 rpm por diez minutos y 4 °C. En este paso se obtuvo un sólido, conocido como *pellet* y el sobrenadante. En el *pellet* se encuentran las células, por lo que se desecha. Mientras que en el sobrenadante se encuentra el bacteriófago M13. El fago M13 se precipito agregando una quinta parte en volumen de PEG (20% en peso en NaCl 2.5 M), se dejó reposar en hielo durante 1 hora, posteriormente se

centrifugo a 10000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el pellet obtenido, ahora corresponde al fago M13, se resuspendió en 10 mL de agua y se repitió la precipitación con PEG dos veces más. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en agua o en amortiguador, y se almacenó a 4°C hasta su uso.

Anexo B

Síntesis vía sol-gel

El proceso sol gel es una ruta química que permite fabricar materiales amorfos y policristalinos de forma sencilla. Este proceso fue empleado principalmente para la síntesis de óxidos metálicos, en la cual se usa un precursor que se encarga de integrar las partículas. Los precursores suelen ser principalmente alcóxidos metálicos o sales metálicas, los cuales reaccionan mediante hidrólisis-policondensación.

Dentro del proceso sol-gel existen dos variantes principales:

Primer paso: La formación del óxido metálico implica interconectar los núcleos metálicos vía puentes oxo ($M-O-M$) o hidroxilo ($M-OH-M$), generando un polímero metal-oxo o metal-hidroxilo en dispersión coloidal o sol.

Segundo paso: formación de un gel a partir de la hidrólisis y policondensación de compuestos metalorgánicos en un medio acuoso-alcohólico.

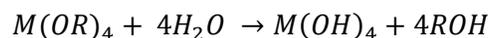
En el caso de precursores orgánicos, la dispersión coloidal se obtiene sometándolo a una reacción de hidrólisis. Los alcóxidos metálicos son precursores que reaccionan rápidamente con el agua, es decir que se hidrolizan fácilmente.

En una reacción de hidrólisis, un ion hidroxilo se ve unido al átomo metálico del precursor; como en la siguiente reacción:

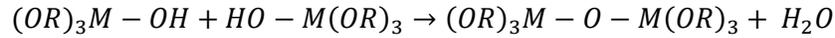


“M” representa el metal, “R” representa un ligando, “OR” es un grupo alcoxi y “ROH” es un alcohol.

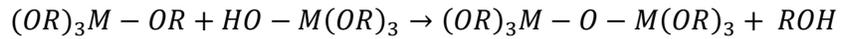
Dependiendo de la cantidad de agua, la hidrólisis puede ser completa; es decir que todos los grupos OR son reemplazados por grupos OH:



Así mismo la reacción puede detenerse cuando el metal está parcialmente hidrolizado, ya que dos moléculas parcialmente hidrolizadas pueden unirse entre sí en una reacción de condensación:



O'



Por definición, la condensación libera moléculas de agua o alcohol. Este tipo de reacción puede continuar para construir moléculas que contienen metal cada vez más grandes por medio del proceso de polimerización.

Si una molécula alcanza dimensiones macroscópicas de forma tal que se extienda por toda la solución se dice que dicha sustancia es un gel. El punto de gelación es el tiempo en el cuál el último enlace de la molécula gigante es formado.

La formación de enlaces no se detiene en el punto de gelación, el envejecimiento consiste en el proceso de cambio en la estructura y propiedades del gel después del punto de gelación. Los materiales obtenidos por el método de sol-gel son útiles para la preparación de cerámicos densos, pero presentan otros puntos de interés como la alta porosidad y la alta área específica que poseen. Así mismo se ha encontrado que el gel seco contiene muchos sitios que ofrecen oportunidades para que sucedan nuevas reacciones. La mayoría de los geles son amorfos (no cristalinos), aunque estén secos, pero muchos cristalizan al ser calentados. [41, 42]

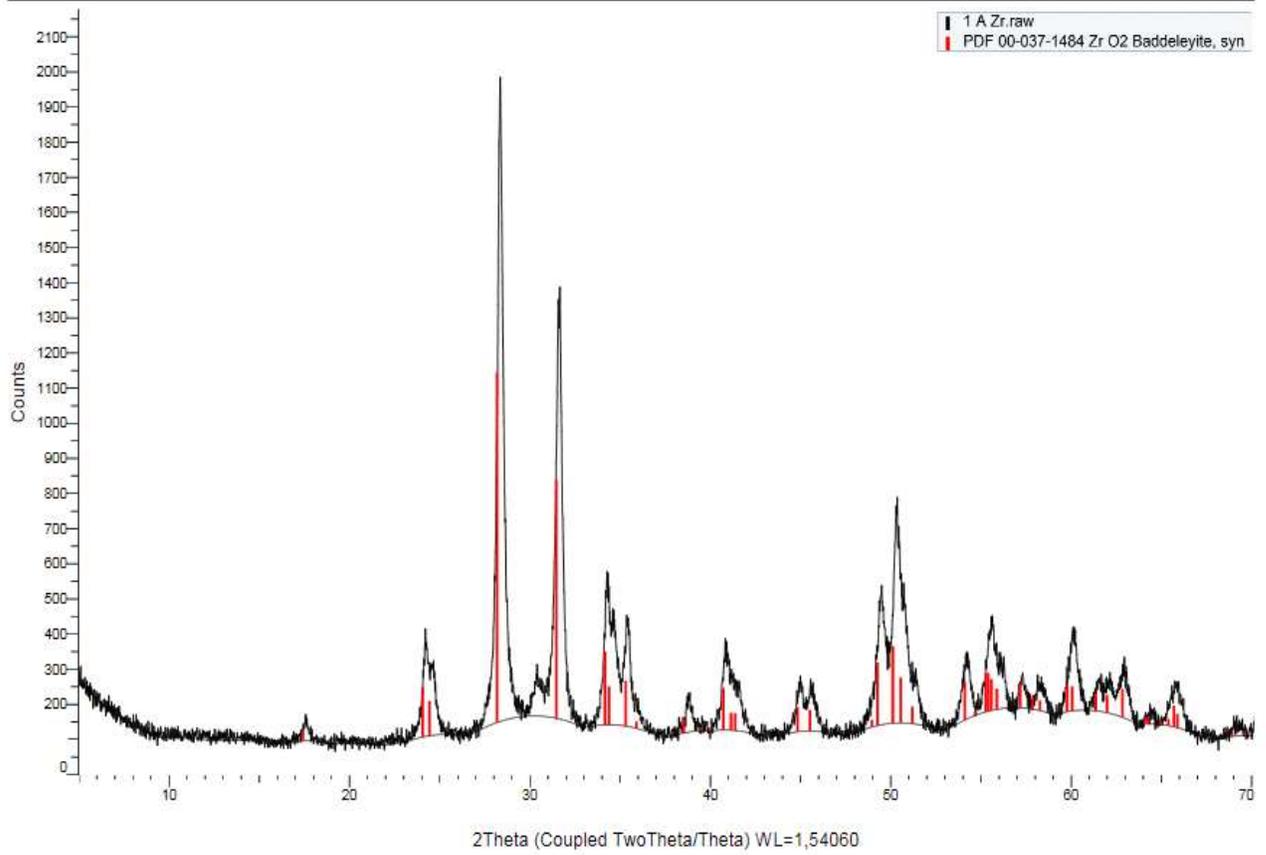
Anexo C

Carta cristalográfica de ZrO_2

Pattern: PDF 00-037-1484 Radiation: 1,54060 Quality: Star (*)

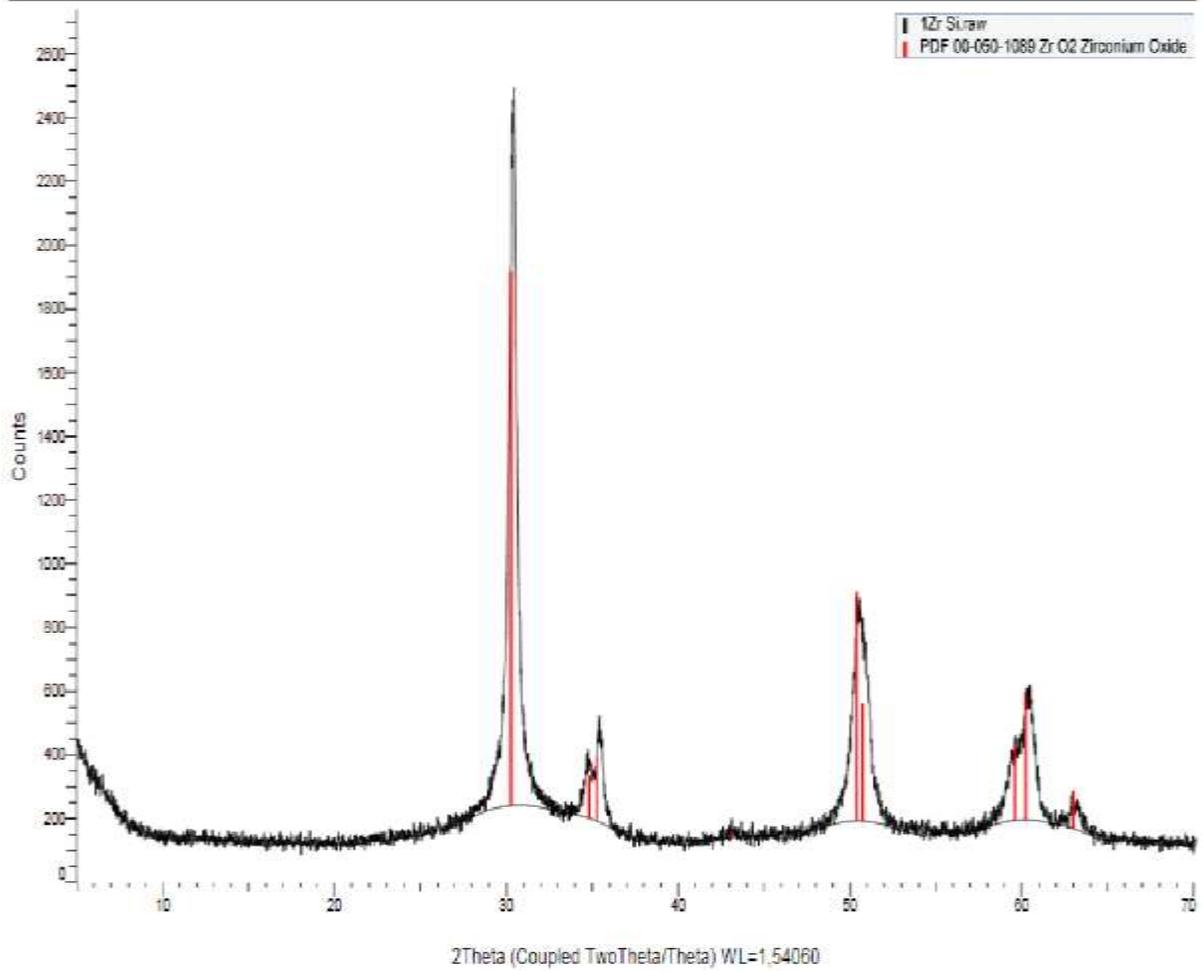
Formula		Zr O2		d	2 θ	h	k	l
Name		Zirconium Oxide		5,08701	17,419	3	0	1
Name (mineral)		Baddeleyite, syn		3,69785	24,048	14	1	0
Name (common)		zirconium dioxide, zirkite, zirconia		3,63907	24,441	10	0	1
				3,16470	28,175	100	-1	1
				2,84063	31,468	68	1	1
				2,62268	34,180	21	2	0
				2,60618	34,383	11	0	2
				2,53992	35,309	13	0	2
				2,49945	35,900	2	-2	0
				2,34250	38,396	1	-2	1
				2,33404	38,541	4	1	2
				2,28450	39,411	1	0	2
				2,25274	39,990	1	-2	1
				2,21377	40,725	12	-1	2
				2,19188	41,150	5	2	0
				2,18053	41,374	5	-1	2
				2,02030	44,826	7	2	1
				1,99101	45,522	6	-2	0
				1,85933	48,949	2	-2	2
				1,84810	49,266	18	2	0
				1,81874	50,116	22	0	2
				1,80383	50,559	13	-2	2
				1,78297	51,193	5	-1	2
				1,69371	54,104	11	0	3
				1,67723	54,680	1	2	2
				1,66070	55,270	11	1	2
				1,65712	55,400	11	3	0
				1,65245	55,570	9	-3	1
				1,64394	55,883	6	0	3
				1,61000	57,168	7	-1	3
				1,59235	57,861	4	-1	3
				1,58220	58,268	3	-2	2
				1,54586	59,775	8	1	3
				1,53932	60,055	7	-2	0
				1,50952	61,367	5	3	1
				1,49596	61,984	5	-3	2
				1,47787	62,838	8	1	3
				1,45201	64,079	1	3	2
				1,44856	64,250	2	2	3
				1,43432	64,966	1	0	3
				1,42616	65,384	2	-2	3
				1,42006	65,700	6	0	3
				1,41654	65,884	4	-1	3
				1,38150	68,912	1	2	3
				1,34937	69,620	1	3	2
				1,33980	70,190	1	-3	2
				1,32534	71,071	2	-2	3
				1,32165	71,300	4	-4	0
				1,31130	71,950	1	4	0
				1,30888	72,104	1	-2	3
				1,30348	72,450	1	0	4
				1,30050	72,642	1	3	2
				1,28622	73,580	1	-3	3
				1,26995	74,682	2	0	4
				1,26469	75,046	4	1	4
				1,24548	76,410	1	-1	4
				1,23211	77,392	1	3	0
				1,22298	78,079	1	4	0
				1,21273	78,866	1	0	3
Lattice: Monoclinic		Mol. weight = 123,22						
S.G. P21/a (14)		Volume [Å ³] = 140,7						
		Dx =						
		Dm =						
		Dcor = 2,600						
a = 5,31290	alpha =							
b = 5,21250	beta = 99,218							
c = 5,14710	gamma =							
a/b = 1,01926	Z = 4							
c/b = 0,98745								
Additional Patterns: To replace 00-013-0307 and 00-036-0420 and validated by calculated pattern 00-024-1165. See PDF 01-072-1669, 01-072-0597, 01-074-0815 and 01-078-0050								
Analysis: Spectrographic analysis showed that this sample contained less than 0.01% each of Al, Hf and Mg and between 0.1 and 0.01% each of Fe, Si and Ti								
Color: Colorless								
General Comments: Pattern reviewed by Holzer, J., McCarthy, G., North Dakota State Univ., Fargo, North Dakota, USA, ICDD Grant-in-Aid (1990). Agrees well with experimental and calculated patterns. Additional weak reflections (indicated by brackets) were observed								
Polymorphism/Phase Transition: There are a number of polymorphic forms of "Zr O2" stable at different temperatures and pressures								
Sample Source or Locality: Sample was obtained from Titanium Alloy Manufacturing Co. (1990) and was heated to 1300° for 48 hours								
Structures: The structure of "Zr O2" (baddeleyite) was determined by McCullough and Trueblood (1) and confirmed by Smith and Newkirk (2)								
Temperature of Data Collection: The mean temperature of the data collection was 298.5 K								
Unit Cell Data Source: Powder Diffraction								
Structure								
Publication: Acta Crystallogr.								
Detail: volume 12, page 507 (1959)								
Authors: (1) McCullough, J., Trueblood, K.								
Publication: Acta Crystallogr.								
Detail: volume 18, page 983 (1965)								
Authors: (2) Smith, D., Newkirk, H.								
Primary Reference								
Publication: Powder Diffr.								
Detail: volume 1, page 275 (1986)								
Radiation:	CuK α	Filter	M					
Wavelength:	1,54060	d-spacing						

1 A Zr (Coupled TwoTheta/Theta)



Formula Zr O ₂ Name Zirconium Oxide Name (mineral) Name (common)		<table border="1"> <thead> <tr> <th>d</th> <th>2θ</th> <th>l</th> <th>h</th> <th>k</th> <th>l</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>2,95020</td><td>30,271</td><td>100</td><td>0</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>2,57504</td><td>34,812</td><td>8</td><td>0</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td>2,54361</td><td>35,256</td><td>12</td><td>1</td><td>1</td><td>0</td></tr> <tr><td>2,09529</td><td>43,140</td><td>1</td><td>0</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,80989</td><td>50,378</td><td>43</td><td>1</td><td>1</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,79875</td><td>50,712</td><td>22</td><td>0</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,54970</td><td>59,612</td><td>14</td><td>0</td><td>1</td><td>3</td></tr> <tr><td>1,53580</td><td>60,207</td><td>24</td><td>1</td><td>2</td><td>1</td></tr> <tr><td>1,47491</td><td>62,969</td><td>7</td><td>2</td><td>0</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,28793</td><td>73,467</td><td>3</td><td>0</td><td>0</td><td>4</td></tr> <tr><td>1,27202</td><td>74,540</td><td>5</td><td>2</td><td>2</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,17444</td><td>81,974</td><td>11</td><td>1</td><td>2</td><td>3</td></tr> <tr><td>1,16854</td><td>82,478</td><td>6</td><td>0</td><td>3</td><td>1</td></tr> <tr><td>1,14899</td><td>84,198</td><td>4</td><td>1</td><td>1</td><td>4</td></tr> <tr><td>1,14106</td><td>84,920</td><td>3</td><td>2</td><td>2</td><td>2</td></tr> <tr><td>1,13774</td><td>85,226</td><td>3</td><td>1</td><td>3</td><td>0</td></tr> <tr><td>1,04715</td><td>94,719</td><td>3</td><td>0</td><td>2</td><td>4</td></tr> <tr><td>1,04080</td><td>95,481</td><td>9</td><td>1</td><td>3</td><td>2</td></tr> </tbody> </table>						d	2θ	l	h	k	l	2,95020	30,271	100	0	1	1	2,57504	34,812	8	0	0	2	2,54361	35,256	12	1	1	0	2,09529	43,140	1	0	1	2	1,80989	50,378	43	1	1	2	1,79875	50,712	22	0	2	0	1,54970	59,612	14	0	1	3	1,53580	60,207	24	1	2	1	1,47491	62,969	7	2	0	2	1,28793	73,467	3	0	0	4	1,27202	74,540	5	2	2	0	1,17444	81,974	11	1	2	3	1,16854	82,478	6	0	3	1	1,14899	84,198	4	1	1	4	1,14106	84,920	3	2	2	2	1,13774	85,226	3	1	3	0	1,04715	94,719	3	0	2	4	1,04080	95,481	9	1	3	2
d	2θ	l	h	k	l																																																																																																																				
2,95020	30,271	100	0	1	1																																																																																																																				
2,57504	34,812	8	0	0	2																																																																																																																				
2,54361	35,256	12	1	1	0																																																																																																																				
2,09529	43,140	1	0	1	2																																																																																																																				
1,80989	50,378	43	1	1	2																																																																																																																				
1,79875	50,712	22	0	2	0																																																																																																																				
1,54970	59,612	14	0	1	3																																																																																																																				
1,53580	60,207	24	1	2	1																																																																																																																				
1,47491	62,969	7	2	0	2																																																																																																																				
1,28793	73,467	3	0	0	4																																																																																																																				
1,27202	74,540	5	2	2	0																																																																																																																				
1,17444	81,974	11	1	2	3																																																																																																																				
1,16854	82,478	6	0	3	1																																																																																																																				
1,14899	84,198	4	1	1	4																																																																																																																				
1,14106	84,920	3	2	2	2																																																																																																																				
1,13774	85,226	3	1	3	0																																																																																																																				
1,04715	94,719	3	0	2	4																																																																																																																				
1,04080	95,481	9	1	3	2																																																																																																																				
Lattice: Tetragonal S.G. P42/nmc (137)		Mol. weight = 123,22 Volume [CD] = 66,71 ρ_x = ρ_m = l/ρ_{cr} =																																																																																																																							
a = 3,59840 b = c = 5,15200 a/b = 1,00000 c/b = 1,43175	alpha = beta = gamma = z = 2																																																																																																																								
<p>Additional Patterns: See PDF 01-088-1007 General Comments: t-Phase. Tetragonal phase is stable between 1170 C and 2370 C. Pattern taken on metastable phase at room temperature Sample Preparation: An ammonia solution was added to a solution of "Zr O Cl₂" to form a gel. The partially dried gel was slowly heated to 600 C under nitrogen, then quenched to room temperature Unit Cell Data Source: Rietveld or profile fit analysis</p>																																																																																																																									
<p>Primary Reference Publication: Powder Diffr. Detail: volume 12, page 96 (1997) Authors: Malek, J., Benes, L., Mitsuhashi, T.</p>																																																																																																																									
Radiation: CuKα Wavelength: 1,54060 SS/FOM: 55,3 (0,0136;24)		Filter F d-spacing																																																																																																																							

1Zr Si (Coupled TwoTheta/Theta)



5.3 Referencias

- [1] C. M. Zheng, Y. Q. Wang, Z. J. Liu y M. L. Guo, «Fabrication of highly ordered mesoporous silica with the assistance of phosphate,» *New J. Chem.*, pp. 7763--7767, **2015**.
- [2] J. Rouquerol, D. Avnir, C. W. Fairbridge, D. H. Everett, J. H. Haynes, N. Pernicone, J. D. Ramsay, K. S. Sing y K. K. Unger, «Recommendations for the characterization of porous solid,» *Pure & Appl. Chem.*, pp. 1739-1758, **1994**.
- [3] Á. B. Murcia, «Ordered Porous Nanomaterials: The Merit of Small,» *ISRN Nanotechnology*, pp. 1-29, **2013**.
- [4] C. S. Cundy y P. A. Cox, «The Hydrothermal Synthesis of Zeolites: History and Development from the Earliest Days to the Present Time,» *Chem. Rev.* 663-701, pp. 663-701, **2003**.
- [5] F. Hoffmann, M. Cornelius, J. Morell y M. Fröba, «Silica-Based Mesoporous Organic–Inorganic Hybrid Materials,» *Angewandte Chemie*, p. 3216 – 3251, **2006**.
- [6] D. Zhao, P. Yang, N. Melosh, I. Feng, . B. F. Chmelka y G. D. Stucky, «Continuous Mesoporous Silica Films with Highly Ordered Large Pore Structures,» *Advanced Materials*, pp. 1380-1385, **1998**.
- [7] D. Zhao, P. Yang, N. Melosh, G. H. Fredrickson, B. F. Chmelka y G. D. Stucky, «Triblock Copolymer Syntheses of Mesoporous Silica with Periodic 50 to 300 Angstrom Pores,» *science*, pp. 548-552, **1998**.
- [8] J. S. Beck, J. C. Vartuli, W. J. Roth, M. E. Leonowicz, C. T. Kresge, K. D. Schmitt, C. T. Chu, D. H. Olson, E. W. Sheppard, S. B. McCullen, J. B. Higgins y J. L. Schlenker, «A New Family of Mesoporous Molecular Sieves Prepared with Liquid Crystal Templates,» *J. Am. Chem. Soc.*, pp. 10834-10843, **1992**.
- [9] A. E. Terasaki, B. Garcia y Osamu, «Structural Investigations of AMS-n Mesoporous Materials by Transmission Electron Microscopy,» *Chem. Mater.*, pp. 813-821, **2004**.
- [10] M. Moritz y M. Geszke-Moritz, «Mesoporous materials as multifunctional tools in biosciences: Principles and applications.,» *Materials Science and Engineering C*, p. 114–151, **2015**.
- [11] C. M. Niemeyer, «Nanoparticles, Proteins, and Nucleic Acids: Biotechnology Meets Materials Science,» *Angew. Chem.*, pp. 4128 - 4158, **2001**.

- [12] N. F. Steinmetz y M. Manchester, *Viral Nanoparticles Tools for materials science and biomedicine*, Singapore: Pan Stanford Publishing Pte.Ltd., **2011**.
- [13] D. Shangjun, W. Yaoming, H. Zhanglian, L. Xujie, W. Dongyun y H. Fuqiang, «Biomolecule-Assisted Route to Prepare Titania Mesoporous Hollow Structures,» *Chem. Eur. J.*, p. 11535 – 11541, **2011**.
- [14] N. L. Rosi y C. A. Mirkin, «Nanostructures in Biodiagnostics,» *American Chemical Society*, pp. 1547-1562, **2005**.
- [15] D. Deng, R. Tang, X. Liao y B. Shi, «Using Collagen Fiber as a Template to Synthesize Hierarchical Mesoporous Alumina Fiber,» *Langmuir*, pp. 368-370, **2008**.
- [16] N. F. Steinmetz y M. Manchester, *Viral nanoparticles*, **2011**, p. 23.
- [17] D. Deng, R. Tang, E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, S. Liao Mann y B. Shi, «Organization of Metallic Nanoparticles Using Tobacco Mosaic Virus Templates,» *Nano Letters*, pp. 413-417, **2003**.
- [18] X. Chen, K. Gerasopoulos, J. Guo, A. Brown, C. Wang, R. Ghodssi y J. N. Culver, «Virus-Enabled Silicon Anode for Lithium-Ion Batteries,» *ACS nano*, p. 5366–5372, **2010**.
- [19] C.-M. Liu, Q. Jin, A. Sutton y L. Chen, «A Novel Fluorescent Probe: Europium Complex Hybridized T7 Phage,» *Bioconjugate Chem.*, pp. 1054-1057, **2005**.
- [20] E. Fruciano, «Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle’s heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West,» *Can J Infect Dis Med Microbio*, pp. 19-26, **2007**.
- [21] D. Stopar, R. B. Spruijt, C. J. Wolfs y M. A. Hemminga, «Mimicking Initial Interactions of Bacteriophage M13 Coat Protein Disassembly in Model Membrane Systems,» *Biochemistry*, pp. 10181-10187, **1998**.
- [22] I. Kim, J.-S. Moon y J.-W. Oh, «Recent advances in M13 bacteriophage-based optical sensing applications,» *Nano Convergence*, pp. 1-17, **2016**.
- [23] W. J. Chung, M. Sena, A. Merzlyak y S. W. Lee, «Phages as Tools for Functional Nanomaterials Development,» *Elsevier*, pp. 95-111, **2011**.
- [24] K. Li, Y. Chen, S. Li, G. H. Nguyen, Z. Niu, S. You, M. C. Mello, X. Lu y Q. Wang, «Chemical Modification of M13 Bacteriophage and its Application in Cancer cell imaging,» *Bioconjugate Chem.*, p. 1369–1377, **2010**.

- [25] K. N. Avery, J. E. Schaak y R. E. Schaak, «M13 Bacteriophage as a Biological Scaffold for Magnetically-Recoverable Metal Nanowire Catalysts: Combining Specific and Nonspecific Interactions To Design Multifunctional Nanocomposites,» *Chem. Mater.*, p. 2176–2178, **2009**.
- [26] C. K. Jeong, I. Kim, K.-I. Park, H. M. Oh, H. Paik, G.-T. Hwang, K. No, Y. S. Nam y K. J. Lee, «Virus-Directed Design of a Flexible BaTiO₃ Nanogenerator,» *acsnano*, p. 11016–11025, **2013**.
- [27] C. E. Fowler, W. Shenton, G. Stubbs y S. Mann, «Tobacco Mosaic Virus Liquid Crystals as Templates for the Interior Design of Silica Mesophases and Nanoparticles,» *Adv. Mater*, p. 1266–1269, **2001**.
- [28] . M. Chuanbin, W. Fuke y C. Binrui , «Controlling Nanostructures of Mesoporous Silica Fibers by Supramolecular Assembly of Genetically Modifiable Bacteriophages,» *Angew. Chem.*, p. 6517 –6521, **2012**.
- [29] L. I. Vera-Robles, J. Gonzalez-Gracida, A. Hernandez-Gordillo, A. Campero-Celis y A. Hernandez-Arana, «Using the M13 Phage as a Biotemplate to Create Mesoporous Structures Decorated with Gold and Platinum Nanoparticles,» *Langmuir*, p. 9188–9197, **2015**.
- [30] D. G. Schüth, y Ferdi, «Synthesis of non-siliceous mesoporous oxides,» *Chem. Soc. Rev.*, pp. 313-344, **2014**.
- [31] «Temperature-Dependent Phase Transitions of ZrO₂,» *Materials Design*, **2009**.
- [32] D. Páez, A. Ceballos Campo y J. E. Rodriguez, «Zr O₂ TETRAGONAL OBTENIDO POR EL MÉTODO DE PRECIPITACIÓN CONTROLADA,» *Dyna*, pp. 224-233, **2011**.
- [33] D. G. Schüt y Ferdi, «Synthesis of non-siliceous mesoporous oxides,» *Chem. Soc. Rev*, pp. 313-344, **2014**.
- [34] Y. Peidong, D. Zhao, D. I. Margolese, B. F. Chemelka y G. D. Stucky, «Generalized syntheses of large-poremesoporous metal oxides with semicrystalline frameworks,» *nature*, pp. 152-155, **1998**.
- [35] R. C. Pessoa, M. Cerqueira, V. P. Yoshida y R. S. Nasar, «Synthesis of stabilized zirconia without dopants,» *Cerâmica*, pp. 253-258, **2008**.
- [36] R. M. Benjaram, A. Khan, P. Lakshmanan, M. Aouine, S. Loidant y J.-C. Volta, «Structural Characterization of Nanosized CeO₂-SiO₂, CeO₂-TiO₂, and CeO₂-ZrO₂ Catalysts by XRD, Raman, and HREM Techniques,» *J. Phys. Chem. B*, pp. 3355-3363, **2005**.

- [37] Z.-G. Wu, Y.-X. Zhao y D.-S. Liu, «The synthesis and characterization of mesoporous silica–zirconia aerogels,» *Microporous and Mesoporous Materials*, p. 127–132, **2004**.
- [38] J. R. Sambrook y D. W., *Molecular Cloning: a laboratory manual*, **2001**, pp. 3.13-3.49.
- [39] M. Chuanbin, D. J. Solis, R. D. Brian, K. T. Stephen, S. Y. Rozamond, H. Andrew, G. Georgiou, I. Brent y A. M. Belcher, «Virus-Based Toolkit for the Directed Synthesis of Magnetic and Semiconducting Nanowires,» *SCIENCE*, pp. 213-217, **2004**.
- [40] A. Navrotsky, «Energetic clues to pathways to biomineralization: Precursors, clusters, and nanoparticles.,» *PNAS*, p. 12096–12101, **2004**.
- [41] S.-G. Science, C. Jeffrey Brinker, George W. Scherer, Academic Press inc., **1990**, p. 42.
- [42] L. L. Hench y J. K. west, «The Sol-Gel Process,» *Chem. Rev.*, pp. 33-72, **1990**.