

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

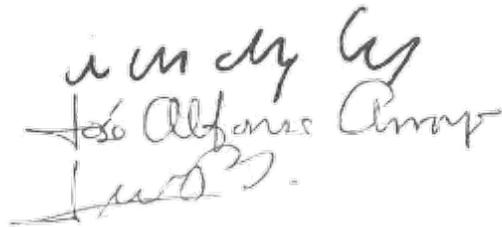
CARACTERIZACIÓN BIOFISICOQUÍMICA DE LA  
INTERACCIÓN SUPERFICIE PROTEÍNICA DEL  
FAGO M13 CON CRISTALES INORGÁNICOS

Tesis que presenta  
**Jhoana Lizeth González Cansino**  
Para obtener el grado de  
**Maestra en Ciencias (Química)**

Asesor: Dr. Andrés Hernández Arana  
Co-asesora: Dra. Liliana Irais Vera Robles



Jurado calificador  
Presidente: Dr. Andrés Hernández Arana  
Secretario: Dr. Alfonso Arroyo Reyna  
Vocal: Dr. Ismael Bustos Jaimes



México, Ciudad de México. Julio 2017





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00068

Matrícula: 2151801091

CARACTERIZACIÓN  
BIOFISICOQUÍMICA DE LA  
INTERACCIÓN SUPERFICIE  
PROTEINICA DEL FAGO M13 CON  
CRISTALES INORGÁNICOS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 27 del mes de julio del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA  
DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES  
DR. JOSE ALFONSO ARROYO REYNA

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: JHOANA LIZETH GONZALEZ CANSINO



JHOANA LIZETH GONZALEZ CANSINO  
ALUMNA

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

REVISÓ

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. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

VOCAL

DR. ISMAEL BUSTOS JAIMES

SECRETARIO

DR. JOSE ALFONSO ARROYO REYNA

# AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

- ❖ Al Dr. Joel Ireta Moreno por la asesoría, motivación, por compartir sus conocimientos y tiempo para generar el modelo de superficie (100) de  $\text{LiFePO}_4$ .
- ❖ Al Dr. Francisco J. Tzompantzi Morales por toda su motivación, sus consejos para caracterizar el  $\text{FePO}_4$  y tiempo que me dedico para ordenar mis resultados referentes a la síntesis del material ( $\text{FePO}_4$ ).
- ❖ A la técnica Patricia Castillo Ocampo que se encuentra en el laboratorio de microscopía electrónica de la UAM-Iztapalapa. Por su paciencia, motivación, por compartir sus conocimientos y tiempo que me dedico para analizar mis muestras en el microscopio.
- ❖ Al técnico Ricardo Rosas Cedillo del laboratorio de difracción de rayos-X de la UAM-Iztapalapa por la ayuda técnica y al laboratorio de docencia de CBI por permitirme el uso de sus instalaciones y equipos.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico a través de la beca de maestría, con el número de registro (CVU/ No. becario): 581714/574785 y por el apoyo financiero para el desarrollo de parte del trabajo (Convenio CB-2014-01-237256).
- ❖ A mis sinodales por el tiempo dedicado en la revisión de mi tesis y por sus valiosas correcciones.
- ❖ A mis asesores por permitirme desarrollar mi tesis de maestría en su grupo de investigación.

A mi familia Silvia, Juan Carlos, Jennifer y Mario

A mi abuelita y a mi tía Maru

A mis amigos Francisco, Iván, Héctor, Adán

Por todo su apoyo, motivación, amor y paciencia que me brindaron.



# Resumen

La biomineralización se ha vuelto un campo de la ciencia muy estudiado debido a que abre la posibilidad de diseñar y preparar un material con propiedades físicas y químicas específicas, en función de la plantilla empleada en la síntesis. La intención de estos diseños es obtener materiales a la medida para aplicaciones específicas.

Si bien es muy prometedor este campo de la ciencia, aún no se ha entendido por completo que factores controlan este proceso tan complejo. De este modo es necesario que el conocimiento de varias áreas concorra en este campo.

En esta tesis se presenta un estudio multidisciplinario inspirado en la biomineralización. Este estudio se dividió en tres secciones. Este trabajo se enfocó en primer lugar en estudiar la estabilidad (química y térmica) del bacteriófago M13 (plataforma ampliamente usada en estudios de biomineralización) mediante diferentes técnicas espectroscópicas y calorimétricas. Por otro lado, se propuso la síntesis de  $\text{FePO}_4$  empleando dos péptidos (obtenidos por *biopanning*) y se caracterizaron los materiales obtenidos. Finalmente, mediante cálculos de estructura electrónica se generó un modelo de superficie del  $\text{LiFePO}_4$ .

En base a este estudio, se encontró que el fago M13 en medio ácido (2.5 y 3.0) no sufre cambios significativos en la estructura secundaria. Con el estudio de estabilidad térmica se calculó el número de proteínas involucradas en el proceso de desnaturalización.

En la síntesis del  $\text{FePO}_4$  empleando uno de los péptidos mostró la capacidad de producir partículas con una distribución de tamaño más estrecha que el control. Finalmente, se obtuvieron los parámetros necesarios para generar el modelo de superficie (100) de  $\text{LiFePO}_4$ .



# Contenido

1	Introducción .....	1
1.1	Biom mineralización .....	1
1.2	Bacteriófago M13 .....	3
1.2.1	Estudios de estabilidad del fago M13 .....	6
1.3	Biopanning.....	8
1.3.1	Modelos teóricos.....	9
1.4	LiFePO <sub>4</sub> .....	11
1.4.1	Biom mineralización de FePO <sub>4</sub> .....	11
1.5	Planteamiento del problema.....	15
1.5.1	Objetivos generales.....	15
1.5.2	Objetivos particulares .....	15
2	Materiales y Métodos .....	16
2.1	Material.....	16
2.2	Expresión, purificación y caracterización del fago M13.....	16
2.3	Caracterización del fago M13.....	16
2.3.1	Espectroscopía UV-vis .....	16
2.3.2	Espectroscopía de fluorescencia .....	16
2.3.3	Espectroscopía de dicroísmo circular (DC).....	17
2.3.4	Dispersión de luz dinámica (DLS) .....	17
2.4	Estabilidad del fago M13.....	17
2.4.1	Caracterización del fago M13 en medio ácido.....	17
2.4.2	Ensayo de desnaturalización térmica en medio acuoso. ....	19
2.4.3	Desnaturalización térmica en medio etanol-agua. ....	19
2.4.4	Efecto de iones en la estabilidad térmica del fago M13 .....	20
2.5	Síntesis y caracterización del FePO <sub>4</sub> empleando como plantilla los péptidos jho1 y jho2 .....	20
2.5.1	Caracterización de las plantillas empleadas en la síntesis por espectroscopía UV-visible .	20
2.5.2	Síntesis del FePO <sub>4</sub> .....	20
2.5.3	Caracterización del FePO <sub>4</sub> sintetizado.....	21
2.6	Modelo teórico.....	22
2.6.1	Modelo del bulto de LiFePO <sub>4</sub> .....	22
2.6.2	Modelo de superficie (100) de LiFePO <sub>4</sub> .....	24
3	Resultados .....	25

3.1	Expresión, purificación y caracterización del fago M13.....	25
3.2	Estabilidad del fago M13.....	26
3.2.1	Caracterización del fago en medio ácido.....	26
3.2.2	Estudio de desnaturalización térmica del fago M13 en medio acuoso.....	29
3.2.3	Estudio de desnaturalización térmica en medios etanol-agua.....	30
3.2.4	Efecto de algunos iones en la estabilidad térmica del fago M13.....	38
3.3	Síntesis y caracterización del $\text{FePO}_4$ .....	40
3.3.1	Caracterización del $\text{FePO}_4$ sintetizado.....	40
3.4	Modelo teórico.....	51
3.4.1	Modelo del bulto de $\text{LiFePO}_4$ .....	51
3.4.2	Modelo de superficie (100) de $\text{LiFePO}_4$ .....	54
4	Conclusiones y perspectivas.....	57
4.1	Conclusiones.....	57
4.2	Perspectivas.....	58
5	Referencias.....	59
6	Apéndice I: Figuras adicionales.....	63
7	Anexo II: Trabajo presentado en congreso nacional e internacional.....	64

# 1 Introducción

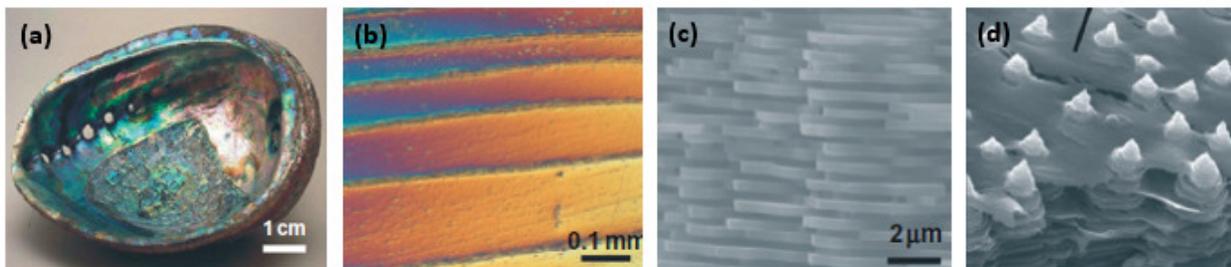
## 1.1 Biomineralización

En la naturaleza se ha observado que los organismos vivos son capaces de formar compósitos orgánico-inorgánico que organizados jerárquicamente producen estructuras complejas, tales como los huesos, dientes, conchas de ostras, corales, esmalte, entre otros; a este proceso se le llama biomineralización.

De acuerdo con Dove. *et al.*<sup>1</sup> la biomineralización se puede definir como el estudio de la formación, estructura y propiedades de los sólidos inorgánicos depositados en sistemas biológicos. La biomineralización le permite a los organismos crear materiales complejos capaces de realizar diferentes funciones (biológicas) básicas a las células que van desde sistemas de protección (mediante la formación de estructuras inorgánicas que sirven como esqueletos o exoesqueletos), de movimiento, de almacenamiento y sensores (gravidad, ópticos, magnéticos) del medio ambiente, entre otros.

Ejemplos de estos compósitos (orgánico-inorgánico) formados por organismos vivos los encontramos tanto en especies extintas o existentes de organismos uni- y multicelulares. Los trilobites eran una clase de artrópodos que tenían un par de ojos que estaban constituidos por lentes de calcita con un empaquetamiento hexagonal, de tal suerte que toda la luz que entraba desde cualquier ángulo se refractaba en el ojo de la criatura permitiéndole ver perfectamente en el agua<sup>2</sup>. Por otro lado, los *loxodes* (organismos unicelulares) contienen en su interior unas pequeñas vesículas con una variedad de cristales que actúan como sensores gravitacionales parecidos a los canales semicirculares de nuestro oído interno, permitiéndole una capacidad sensorial de movimiento, posición y equilibrio<sup>3</sup>.

La coraza de ciertos moluscos presenta una capa interna iridiscente llamada nácar compuesta de  $\text{CaCO}_3$  con una estructura cristalina tipo ortorrómbica (aragonita). Esta produce brillos y tonos de distintos colores cuando refleja la luz y exhibe propiedades mecánicas excepcionales siendo 3000 veces más resistente a las fracturas que la aragonita geológica. Estas propiedades se deben a la estructura jerárquica basada en bloques de aragonita organizados sobre una matriz de proteínas y fibras de quitina (polisacárido compuesto de unidades N-acetilglucosamina) similar a un arreglo de ladrillos y cemento, ver Figura 1<sup>4</sup>.



**Figura 1:** (a) Macroestructura de láminas de nácar, (b) meso-láminas compuestas de aragonita, (c) arreglo tipo bloques de aragonita y (d) matriz de quitina.

La magnetita es un mineral de hierro constituido por  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), se caracteriza por ser ferromagnético, es decir, presenta un momento dipolar magnético espontáneo en ausencia de un campo magnético aplicado. Esto se debe a que los momentos magnéticos de los dos cationes de hierro tienen diferente magnitud, dando como resultado un momento magnético resultante, aún después de que los momentos magnéticos se orienten en la misma dirección<sup>5</sup>. Todas las bacterias magnetotácticas forman magnetosomas, que se definen como vesículas formadas por una bicapa de fosfolípidos que envuelven un cristal de magnetita. La biomineralización del magnetosoma es un proceso complejo que se da en varios pasos. Estos incluyen la formación de la vesícula del magnetosoma, la acumulación de hierro por la célula, el transporte de hierro a las vesículas del magnetosoma y la biomineralización controlada del  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Tanaca *et al.*<sup>6</sup> reportaron que la proteína MMS6 regula la biomineralización de la magnetita con forma cubo-octaédrica en las bacterias magnetotácticas. Los magnetosomas están dispuestos en una o más cadenas paralelas al eje mayor de la célula. Se han observado tres tipos de morfología de las partículas de magnetita, ver Figura 2<sup>7</sup>. Estos cristales de magnetita actúan como una brújula orientando a las bacterias magnetotácticas con el campo magnético de la Tierra, para buscar zonas con menor concentración de oxígeno, debido a que estas bacterias son anaerobias o microaerofilas.



**Figura 2:** Micrografías de la morfología cristalina de los magnetosomas encontrados en varias bacterias magnetotácticas. Partículas de magnetita con forma cubo-octaédrica (a), hexagonal prismática alargada (b) y de punta de flecha (c).

Como puede observarse de los ejemplos anteriores en el proceso de biomineralización se encuentran involucradas biomoléculas como proteínas o péptidos, glucanos y lípidos<sup>8</sup>. Estas biomoléculas funcionan como plantillas y andamios para la nucleación y crecimiento de las estructuras inorgánicas. Otra característica notable es que las biomoléculas emplean los recursos existentes a su alrededor (iones disueltos) para sintetizar el material inorgánico. Si bien las características de las biomoléculas, como carga superficial, estructura tridimensional (cadenas aleatorias, alfa-hélice y hojas beta), carácter hidrofóbico e hidrofílico y la existencia de grupos funcionales ( $-\text{COOH}$ ,  $-\text{SH}$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ) expuestos; son decisivas en la formación de los compuestos inorgánicos, otros factores a nivel macroscópico y ambiental como la gravedad, temperatura, salinidad, pH y humedad juegan un papel importante en el crecimiento y desarrollo de los materiales<sup>9,10</sup>.

El estudio de los procesos de biomineralización ha sido de gran interés en los últimos años debido a las propiedades fascinantes que estos presentan. Además, estos procesos generan compuestos inorgánicos con métodos amigables para el medio ambiente. De esta manera, la biomimética ha surgido como un nuevo campo de estudio. Dentro de sus principales objetivos de estudio se encuentran<sup>11</sup>:

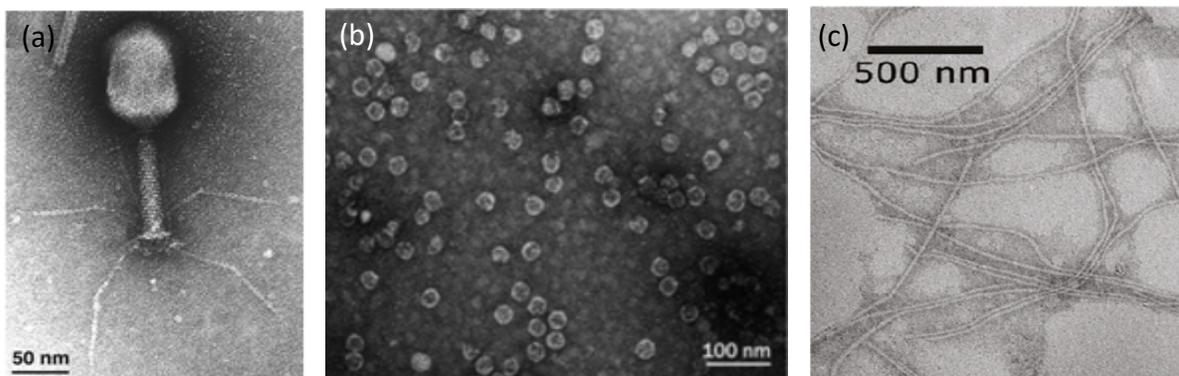
- ✓ Conocer y entender los procesos que llevan a cabo las macromoléculas orgánicas para controlar la síntesis, el alto nivel de organización y la complejidad de los biominerales.
- ✓ Caracterizar la composición y estructura de los biominerales.
- ✓ Entender las propiedades funcionales de los biominerales.

Para alcanzar estos objetivos se han empleado un gran número de técnicas químicas y físicas que brindan información relevante como parámetros termodinámicos, cambios conformacionales de la proteína o péptido, carga superficial, entre otros. Por ejemplo, con la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) se puede medir de forma muy precisa el calor de interacción entre dos moléculas y con la medición de este calor se pueden calcular las constantes de unión, la estequiometría de la reacción y los parámetros termodinámicos como el cambio en la entalpía ( $\Delta H$ ), la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y la entropía ( $\Delta S$ )<sup>12,13</sup>. De este modo, Limo *et al.*<sup>14</sup> reportaron un estudio de interacción entre partículas de ZnO y péptidos con afinidad a este material usando la técnica de ITC. Si bien es una técnica muy poderosa y, determinaron que una interacción favorable de interacción tiene un valor de  $\Delta G$  entre -6.0 y -8.5 kcal/mol, hacen notar que es un proceso complejo que involucra interacciones simultáneas como son: péptido-solvente, sustrato-solvente, péptido-sustrato, y donde posiblemente la conformación del péptido es muy diferente en cada tipo de interacción. Por lo cual se requiere complementar con otras técnicas convencionales y continuar mejorando la metodología para construir un modelo que permita determinar qué factores controlan el proceso de biomineralización.

## 1.2 Bacteriófago M13

Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan bacterias de una especie específica para replicarse. Consisten fundamentalmente de material genético y proteínas. Su genoma puede componerse de ácido ribonucleico (ARN) o ácido desoxirribonucleico (ADN), el cual puede consistir de una cadena doble (ds) o de una cadena sencilla (ss). El material genético está protegido por una cubierta de proteínas denominada cápside.

La forma en la que se arreglan las proteínas alrededor del material genético del virus determina la forma del fago, de tal modo que existen fagos icosaédricos, helicoidales o filamentosos, como se ilustra en la Figura 3.

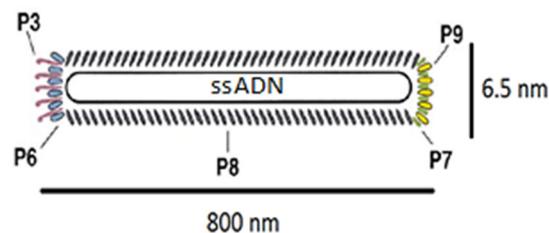


**Figura 3:** Micrografías de bacteriófagos con distinta morfología: compleja T4 (a), icosaédrica MS2 (b) y filamentosa M13 (c)<sup>15,16,17</sup>.

El fago M13 es un bacteriófago filamentosos con un diámetro de 6.5 nm y una longitud de aproximadamente 800 nm, Figura 3 (c)<sup>18</sup>. Su genoma está compuesto de una cadena sencilla de ADN (ssADN) de 6407 nucleótidos que contiene 11 genes, protegido por una cápside que se compone de cinco proteínas (ver Tabla 1). Las proteínas P3 y P6 se encuentran en un extremo, la proteína P3 juega un papel primordial durante la etapa de infección ya que es la encargada de interactuar con el F *pillus* de la bacteria. En el otro extremo se encuentran las proteínas P7 y P9. La proteína P8 está expresada mayoritariamente en el cuerpo del fago, ver Figura 4<sup>19</sup>.

**Tabla 1:** Proteínas que componen la cápside del bacteriófago filamentosos M13<sup>20</sup>.

Proteína	Número de aminoácidos	Masa molecular (Da)	Copias por fago
P3	406	42,500	~5
P6	112	12,300	~5
P7	33	3,600	~5
P8	50	5,200	~2,700
P9	32	3,600	~5

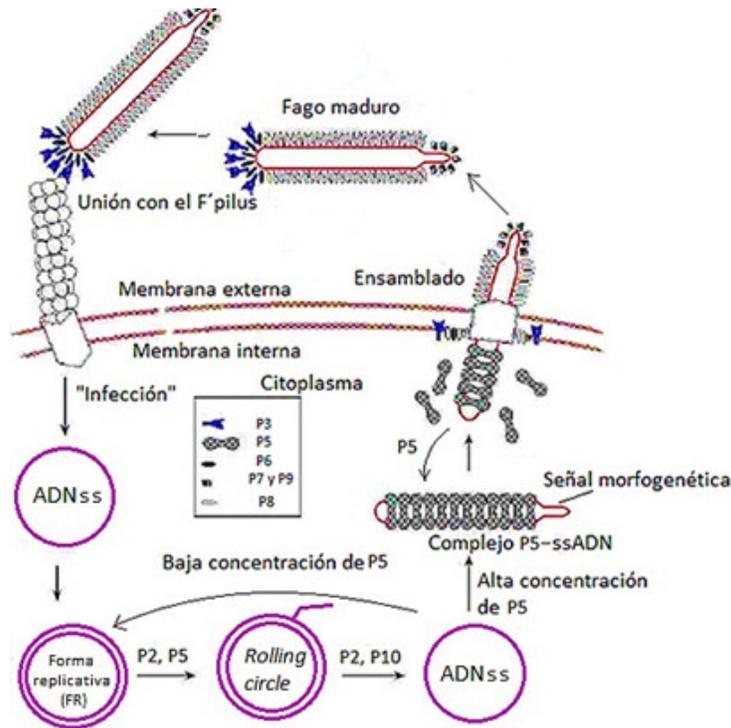


**Figura 4:** Estructura del bacteriófago filamentosos M13<sup>20</sup>.

La proteína P8 ha sido muy estudiada debido a que juega un papel muy importante en la estabilidad y ensamble del fago al momento de replicarse. Por estudios de cristalografía y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), se ha logrado caracterizar la estructura de la proteína P8. Esta proteína puede dividirse en cuatro segmentos, ver Figura 5. Del residuo 1 al 5 (extremo N-terminal) constituye un segmento móvil que interactúa con el solvente, en este segmento se puede insertar genéticamente de uno a seis residuos sin alterar la función de la proteína. A partir del residuo 6 hasta el 50 se forma una estructura tipo alfa-hélice de carácter anfipático. En la segunda región, que va desde la posición prolina (P6) hasta la tirosina 24 (Y), los residuos están parcialmente expuestos al solvente gracias al contenido de residuos ionizables E y K. El tercer segmento es altamente hidrofóbico (de la alanina 25 (A25) a la A35), por lo que está totalmente oculto al solvente; cabe mencionar que este segmento juega un papel primordial en la estabilidad del virus. El último segmento de la proteína, de la treonina 36 (T36) a la serina 50 (S50), constituye una región cargada positivamente que estabiliza el ADN del fago, ya que es rica en lisinas<sup>21</sup>.



participan en el proceso de ensamblado de las partículas virales. Las proteínas P1 y P4 se dirigen a la membrana de la bacteria para permitir la extrusión del fago al mismo tiempo que es ensamblado<sup>19,24,25</sup>.



**Figura 7:** Ciclo infeccioso del bacteriófago M13.

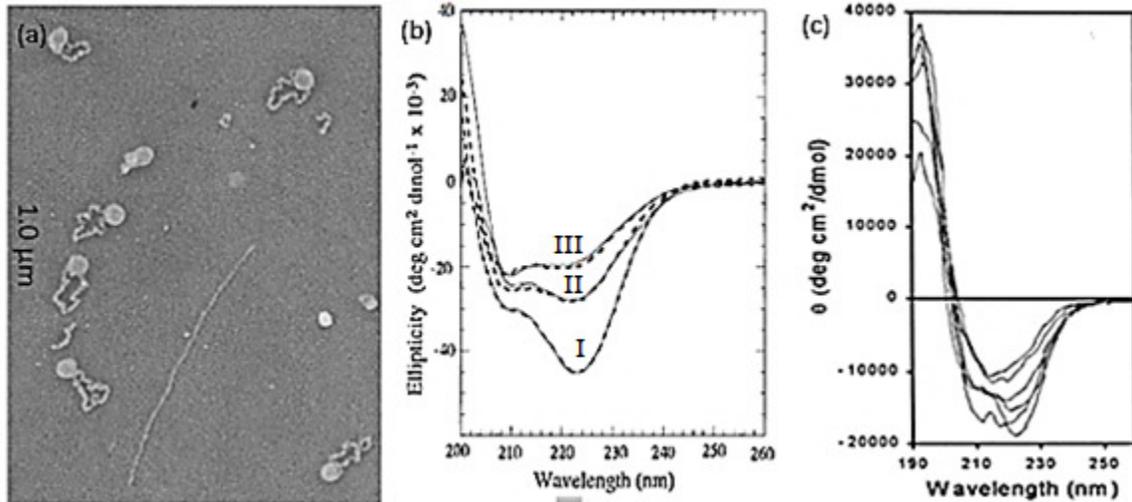
### 1.2.1 Estudios de estabilidad del fago M13

El fago M13 ha sido ampliamente usado en procesos de biomineralización, ya sea en su forma silvestre (wt) o modificado genéticamente con un *motivo proteínico* afín a un material en particular. Mientras el motivo proteínico es la región encargada de nuclear y biomineralizar el material en cuestión, poco se sabe del papel que tiene el resto de la proteína y del mismo fago en dicho proceso. Por tal motivo, es de particular interés estudiar la estabilidad del fago en diferentes condiciones. En estudios previos, el fago ha sido empleado como un modelo de las proteínas transmembrana, debido a que la proteína P8 del fago cumple con una función parecida. Este modelo se ha estudiado por espectroscopía de dicroísmo circular (DC), técnicas microbiológicas y microscopía electrónica (EM), entre otras. Así, se ha obtenido información de la estructura tridimensional de la P8 y su evolución en experimentos controlados de desnaturalización (desensamblaje). De igual modo, se ha estudiado el efecto de otros solventes y del pH en la estructura de la proteína P8 y su influencia en la estabilidad de la cápside y su capacidad de infectar (viabilidad biológica) nuevamente a *E. coli*.

Stopar *et al.*<sup>26</sup> hicieron un estudio sistemático con varios detergentes y lípidos para simular la interacción membrana-proteína y su influencia en el tipo de conformación del fago (filamentoso o esférico, ver Figura 8 (a))<sup>27</sup>. Debido a que ese tipo de conformación podría estar asociado al proceso de replicación.

De acuerdo con sus resultados (fluorescencia, espectroscopía de DC, resonancia paramagnética electrónica y EM) observaron que la conformación del fago presentó diferente estabilidad. Se

observó que la forma filamentosa se desensamblaba en detergentes con regiones hidrofóbicas flexibles y cargados electrostáticamente (dodecilsulfato sódico (SDS) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio, (CTAB)), debido a su capacidad de penetrar a través del empaquetamiento hidrofóbico de la proteína P8. Por otro lado, la solubilidad de las partículas esféricas cambió en presencia de moléculas más voluminosas (colato de sodio, tritón X-100) y la hidrofobicidad aumentó debido al ocultamiento de los residuos aromáticos, como consecuencia del cambio tridimensional de la p8, como se observa en la Figura 8 (b).



**Figura 8:** (a) Micrografía de TEM del fago M13 en sus dos diferentes conformaciones, (b) espectro de DC a temperatura ambiente del fago filamentoso (I), fago en forma esférica (II) y fago en forma esférica solubilizado en colato de sodio (III). (c) espectro de DC del fago f1 expuesto a diferentes concentraciones 0-95 % (V/V) de etanol-agua.

Olofsson *et al.*<sup>28</sup> estudiaron la estabilidad del bacteriófago f1 (variante de M13, la P8 contiene aspartato en la posición 11 en sustitución de asparagina D11N) en diferentes medios (metanol, etanol, 1-propanol, acetonitrilo y N, N-dimetilformamida) con el objetivo de proponer el uso de la tecnología *phage display* en medios no acuosos. En base a sus resultados concluyeron que las interacciones hidrofóbicas entre las P8 se ven afectadas por la polaridad del solvente, porque al ser menos polar el solvente éste desestabilizó más rápido las interacciones; y de acuerdo con los espectros de DC, ver Figura 8 (c), propusieron que el mecanismo por el cual se desensambló el fago fue simplemente debido a la solvatación y no por la formación de las partículas esféricas.

Steven *et al.*<sup>29</sup> estudiaron la viabilidad biológica del fago M13 después de estar expuesto a diferentes sustancias (desinfectantes comerciales), pH y temperatura en función del tiempo. Ellos encontraron que el desinfectante compuesto por surfactantes fue el más efectivo para inactivar al fago. Además, observaron que el fago conservó su viabilidad biológica en un intervalo de pH de 3.0 –11.0 (incubado 20 min) y a temperaturas menores de 80 °C (incubado 60 min).

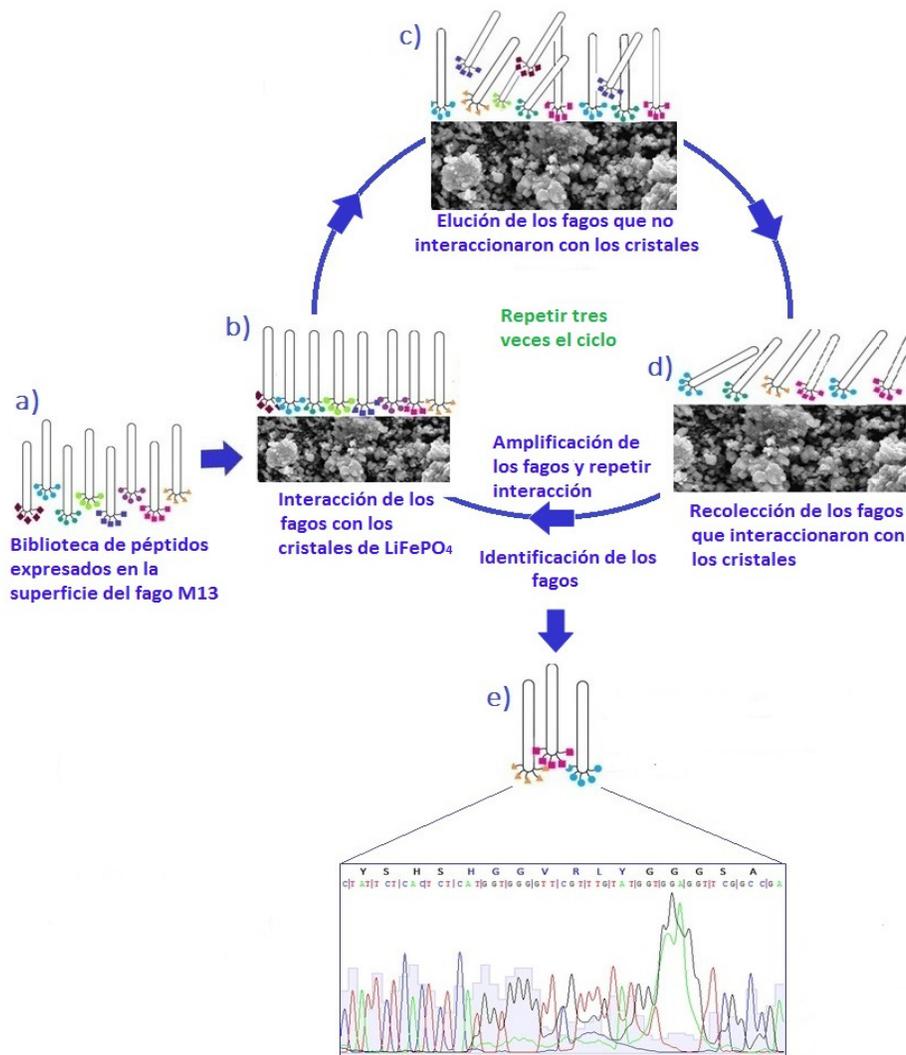
Sin embargo, para entender por qué se desactiva el fago, es necesario entender qué le pasa a la estructura de las proteínas que forman la cápside y así poder aplicar este conocimiento para su aplicación en la medicina<sup>30</sup> y la síntesis de materiales<sup>31</sup>.

### 1.3 Biopanning

Aunque en la naturaleza existen organismos capaces de biomineralizar materiales inorgánicos, muchos otros no son producidos por biogénesis. Sin embargo, se cree que proteínas o péptidos adecuados en presencia de precursores inorgánicos podrían biomineralizar estructuras inorgánicas. La búsqueda de estos péptidos se realiza por una técnica conocida como *biopanning*, que se describe abajo. Por esta técnica se han encontrado péptidos capaces de biomineralizar compuestos tan diversos como SiO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZnS, nanopartículas (NPs) de Au, Pt, entre otros<sup>32,33</sup>.

La búsqueda de secuencias de aminoácidos con afinidad a un material en particular se realiza empleando la técnica de *biopanning*, la cual emplea una biblioteca de péptidos desplegados en el fago, lo que permite tener en cada fago secuencias aleatorias de cadenas polipeptídicas que sirven como puente físico para enlazarse a otro material<sup>34</sup>. Una biblioteca de péptidos desplegados (*phage display*) es un sistema basado en la modificación genética del fago M13 para que exprese en el extremo N-terminal de la proteína P3 una secuencia extra (péptido) que queda expuesta al solvente<sup>35</sup>. Existen tres tipos de bibliotecas disponibles en el mercado, la diferencia es el tipo de péptido insertado, el cual puede ser un heptapéptido lineal, un dodecapéptido lineal o un heptapéptido circular formado por un enlace disulfuro. Todas las bibliotecas tienen del orden de  $1 \times 10^9$  péptidos diferentes.

En la Figura 9 se muestra un diagrama del proceso de *biopanning*. (a) Se tiene una biblioteca de péptidos desplegados en el fago M13 que se deja incubando con el material blanco, en este caso cristales de LiFePO<sub>4</sub> (b). Posteriormente (c) se realiza una serie de lavados con una solución de detergente (Tween-20) para eliminar todos los fagos con los péptidos que no tuvieron ningún tipo de interacción con el material blanco. Por último, (d) los fagos que se enlazaron específicamente al material son eluidos cambiando el pH del medio a 2.2, una vez colectados los fagos se neutralizan, en este punto del proceso la biblioteca de péptidos debió reducirse, es decir, el número de mutantes presentes en la solución es menor debido al proceso de selección. Para garantizar que las secuencias restantes tengan la misma oportunidad de volver a interactuar con el blanco, el eluato es amplificado en un medio de cultivo líquido adecuado previamente inoculado con bacteria con el fin de enriquecer la cantidad de fago que contiene el péptido afín al material (d). Este procedimiento se conoce como primer ciclo y generalmente se realizan otros dos ciclos más. En cada ciclo se incrementa la astringencia del medio en la etapa de lavado aumentando la concentración del detergente, para garantizar que los péptidos colectados tengan una fuerte afinidad al material. Después del tercer ciclo, a fin de conocer la secuencia de aminoácidos de los péptidos que presentaron afinidad al material, los fagos colectados se plantan sobre una carpeta de bacteria en un medio de cultivo sólido adecuado y se incuban durante la noche para producir placas. Cada placa corresponde a la información genética de un solo fago, por lo que se pican entre 10 a 20 placas bien aisladas (e). Cada placa se amplifica de forma individual en un medio de cultivo adecuado, después se purifica el ADN y se secuencia para determinar la identidad de los aminoácidos encontrados durante el proceso de *biopanning*.



**Figura 9:** (a) Representación de una biblioteca de péptido desplegados, donde cada color representa un péptido diferente, (b)–(d) esquema del ciclo de biopanning para la selección de péptidos específicos al  $\text{LiFePO}_4$ .

### 1.3.1 Modelos teóricos

Siendo una parte importante del proceso de biomineralización la búsqueda de las biomoléculas que inducen este proceso, surge la necesidad de emplear otras metodologías para entender que factores gobiernan la absorción de moléculas, polímeros y biopolímeros sobre una superficie.

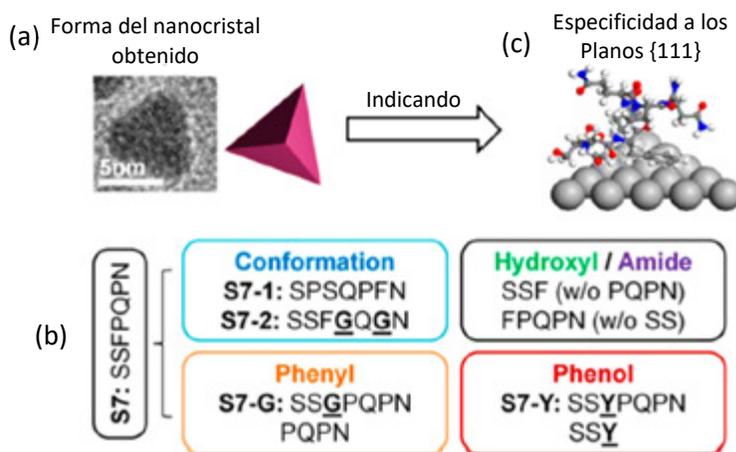
Es muy importante tener claro que las propiedades de una superficie pueden ser muy diferentes respecto a otras superficies, es decir, la polaridad, la basicidad o acidez, reactividad, entre otros, los cuales pueden ser factores que afecten la adsorción de biomoléculas. Recientemente diferentes grupos de investigación se han interesado en estudiar desde un punto de vista de modelos atomísticos y de simulación los posibles mecanismos que controlan la unión selectiva de péptidos sobre diferentes materiales.

El desafío consiste en entender desde una escala nanométrica hasta una escala macroscópica los factores que controlan este proceso. Los métodos computacionales empleados para examinar las propiedades estructurales, químicas y físicas de una superficie solo pueden extraer información de una subsección del todo. Por lo que es necesario el uso de varias metodologías

computacionales para combinar o correlacionar la información obtenida y así poder proponer un mecanismo de interacción más asertivo<sup>36</sup>.

Ruan *et al.*<sup>37</sup> presentaron un estudio detallado en el que relacionan datos experimentales y computacionales sobre el reconocimiento molecular que presenta el péptido S7 (SSFPQPN) al plano cristalino {111} de nanocristales de platino, ver Figura 10 (a). Cabe mencionar que este péptido fue identificado mediante el proceso de *biopanning*.

El diseño del experimento consistió primero en discernir si la conformación del péptido influye en la selectividad molecular y determinar qué residuo es esencial para que el cristal crezca en una dirección específica. Por lo que sintetizaron las nanopartículas de platino empleando el péptido S7 y algunas variantes, ver Figura 10 (b).



**Figura 10:** (a) nanocristales sintetizados con el péptido S7, (b) variantes del péptido S7 usadas para sintetizar los cristales de platino y (c) péptido adsorbido a la superficie {111} de platino.

En base a sus resultados concluyeron que el aminoácido fenilalanina (F) es un factor clave que determina la especificidad del péptido hacia el plano {111} del platino. Las observaciones que obtuvieron con las variantes, las cuales tenían F en diferentes posiciones con diferentes vecinos mostró los mismos rendimientos tanto en especificidad como en cantidad, por lo que sugirieron que tanto la conformación global como la estructura secundaria del péptido no juegan un papel importante. En base a los resultados experimentales decidieron calcular por dinámica molecular la energía de absorción de los mismos péptidos con la superficie {111} y como control calcularon la energía de interacción con la superficie {100}, ver Figura 10 (c).

Si bien no hubo una buena correlación de las energías de absorción encontradas con la superficie {111} respecto a los rendimientos obtenidos en la síntesis. Los resultados mostraron que la fenilalanina se coordina de forma hexagonal a la superficie, lo que podría contribuir a una mayor afinidad a la superficie. De forma contraria, la fenilalanina no presentó la misma coordinación en la superficie {100}.

En base al análisis que realizaron pudieron darle especificidad a un péptido que no presentaba afinidad a la superficie {111}. He aquí la importancia de conocer el tipo de interacciones orgánico-superficie que están involucradas en este proceso de mineralización al grado de que podamos manipular estas interacciones y nos permita diseñar materiales con la posibilidad de predecir las propiedades de éste.

## 1.4 LiFePO<sub>4</sub>

Los compuestos de tipo LiMPO<sub>4</sub> (M=Fe, Mn y Co) presenta una estructura cristalina tipo olivina (celda unitaria ortorrómbica) que consiste en un empaquetamiento hexagonal compacto, donde los átomos de oxígeno con los cationes de Li<sup>+</sup> y M<sup>2+</sup> están localizados en la mitad de los sitios octaédricos y el catión P<sup>5+</sup> en 1/8 de los sitios tetraédricos<sup>38,39</sup>.

Debido a las propiedades del LiFePO<sub>4</sub> tales como alta estabilidad química y térmica, bajo costo y una alta compatibilidad con el medio ambiente<sup>40</sup>, aunado a su alta capacidad específica teórica ( $\approx 170 \text{ mAhg}^{-1}$ )<sup>41</sup> es un componente importante empleado como material catódico en las baterías recargables de ion litio <sup>42</sup>.

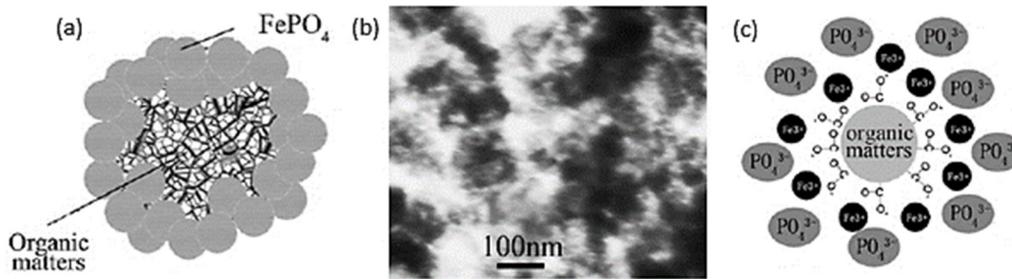
### 1.4.1 Biomineralización de FePO<sub>4</sub>

Si bien, el LiFePO<sub>4</sub> es un material prometedor para su implementación en las baterías de ion-litio, su contraparte no litiada FePO<sub>4</sub> ha sido también ampliamente estudiada, debido a que puede usarse como precursor del LiFePO<sub>4</sub> o bien como material catódico para las baterías de ion-litio debido a que tiene una capacidad específica teórica ( $\approx 178 \text{ mAhg}^{-1}$ ) similar al LiFePO<sub>4</sub><sup>43,44</sup>. Se ha propuesto que este material podría ser clave en el desarrollo de la siguiente generación de las baterías ión-litio. Sin embargo, este presenta algunos inconvenientes, como son, baja conductividad eléctrica y una velocidad lenta de inserción/extracción del ion Li<sup>+</sup>, lo que limita su uso en el diseño de cátodos.

Una forma de solucionar estos problemas intrínsecos ha sido el uso de nanoestructuras de FePO<sub>4</sub> dopadas con materiales conductores, de esta forma aumentaría la conductividad eléctrica y al tratarse de estructuras de dimensiones nanométricas la distancia que tienen que viajar los iones de Li<sup>+</sup> disminuiría considerablemente. Se han propuestos diferentes técnicas físicas y químicas para lograr este objetivo. Recientemente, la naturaleza ha servido para inspirar a grupos de investigación en el empleo de biomoléculas (ADN, proteínas, péptidos) capaces de controlar el ordenamiento de la estructura (biomineralización) y por ende las propiedades de compuestos con interés tecnológico. Así, se han buscado bioplantillas capaces de biomineralizar FePO<sub>4</sub> como a continuación se describe.

Zhou *et al.*<sup>45</sup> sintetizaron mesoporos de FePO<sub>4</sub> empleando el método de precipitación. Ellos utilizaron células de levadura como plantilla, ver Figura 11 (a), y encontraron que usando 0.8 g de levadura obtenían la mayor área superficial específica (120.2 m<sup>2</sup>/g). Después de calcinar a varias temperaturas determinaron que calcinando a 300 °C obtenían la mayor área superficial (146.2 m<sup>2</sup>/g) y la mayor conductividad del material ( $6.7 \times 10^{-4} \text{ S/cm}$ ). Ellos atribuyeron este fenómeno a la posible formación de una delgada pared de carbono producida durante la calcinación de las células de levadura. Cuando analizaron las muestras por microscopía electrónica de transmisión (TEM), ver Figura 11 (b), observaron que la muestra calcinada se aglomeraba de forma desordenada, en comparación a la muestra sin calcinar donde observaron partículas de 10 nm y de diferente morfología. Esta agregación podría indicar que la (meso)porosidad se debía a la interconexión de partículas. Finalmente, mencionaron que la mineralización del FePO<sub>4</sub> se debía a las interacciones electrostáticas y químicas del Fe<sup>3+</sup> con los grupos hidroxilo o grupos amino

expuestos en la superficie de la levadura, y que al adicionar el fosfato conducía a la formación de nanopartículas de  $\text{FePO}_4$ , ver Figura 11 (c).



**Figura 11:** (a) Esquema de la formación de nanopartículas de  $\text{FePO}_4$  en la superficie de la célula de levadura, (b) micrografía de TEM de los mesoporos formados después de calcinar el material híbrido a  $300\text{ }^\circ\text{C}$  y (c) esquema de interacción de los iones de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ .

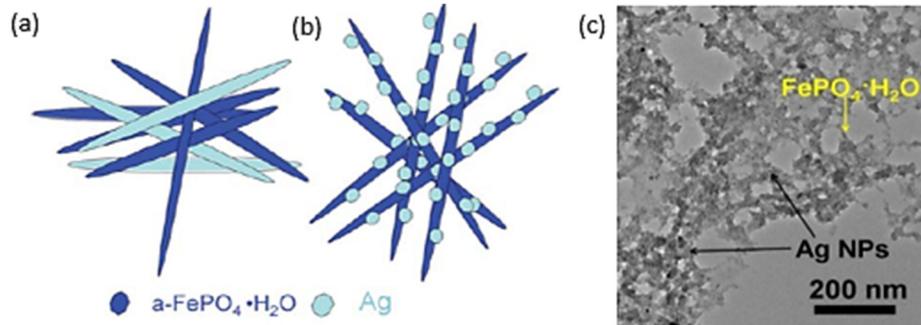
Ryu *et al.*<sup>46</sup> sintetizaron  $\text{FePO}_4$  empleando como plantilla el péptido fluorenilmetiloxycarbonilodifenilalanina (Fmoc-FF). De forma exitosa lograron mineralizar el  $\text{FePO}_4$  sobre la superficie del péptido en medio acuoso. Ellos atribuyeron a los grupos ácidos y polares del péptido el ordenamiento y mineralización del material. Si bien, el  $\text{FePO}_4$  que obtuvieron fue amorfo a temperatura ambiente, después de calcinarlo a  $350\text{ }^\circ\text{C}$  obtuvieron nanotubos (NTs) de  $\text{FePO}_4$  (amorfo) de  $20\text{ nm}$  de diámetro recubiertos de una capa interna de carbono amorfo; proveniente del péptido calcinado, de  $5\text{ nm}$  de espesor. Con la esperanza de que este compuesto pudiera mejorar las propiedades de conductividad, estudiaron el desempeño electroquímico del material como cátodo en una batería de ion-litio mediante una celda tipo *Swagelok*. Por medio de un voltamperograma observaron que el proceso de reducción y oxidación asociado a la inserción y extracción de los iones  $\text{Li}^+$  ocurría alrededor de un potencial de  $3\text{ volts}$ . En el primer ciclo obtuvieron una capacidad específica de  $170\text{ mAh/g}$ , sin embargo, esta disminuyó monótonamente después del tercer ciclo. Finalmente, reforzaron su hipótesis al mostrar que el compuesto  $\text{FePO}_4/\text{carbono}$  tenía mayor capacidad que el  $\text{FePO}_4/\text{péptido}$  sin calcinar.

Lee *et al.*<sup>47</sup> modificaron genéticamente al fago M13-IKE para que expresara en el extremo C-terminal de la proteína P8 cuatro glutamatos (M13-EEEE). Esta mutación la hicieron con el objetivo de biomineralizar en su superficie  $\text{FePO}_4$  y al mismo tiempo mejorar la conductividad eléctrica del material sin la necesidad de calcinar la muestra.

Prepararon dos compósitos, el primero consistió en biomineralizar en la superficie del fago M13 nanovarillas (NVs) de plata metálica (Ag) y de  $\text{FePO}_4$  de forma separada para después mezclarlas, ver Figura 12 (a). En el segundo compósito mineralizaron consecutivamente nanopartículas (NPs) Ag seguidas de  $\text{FePO}_4$ , ver Figura 12 (b) y (c). De este último compósito hicieron otra variante  $\text{AgCl-FePO}_4$ . Las NVs de  $\text{FePO}_4$  presentaron un diámetro entre  $10\text{ a }20\text{ nm}$  y las nanopartículas de Ag  $\sim 5\text{ nm}$ . En todos los casos el  $\text{FePO}_4$  resultó ser amorfo, mientras que el AgCl resultó ser cristalino. De acuerdo con las curvas termogravimétricas determinaron que los compósitos de NPs Ag- $\text{FePO}_4$  resultaron estar hidratados al menos hasta  $400\text{ }^\circ\text{C}$ ; sin embargo, el compósito  $\text{AgCl-FePO}_4$  resultó ser anhidro a temperatura ambiente, lo que permitió evitar la calcinación de la muestra.

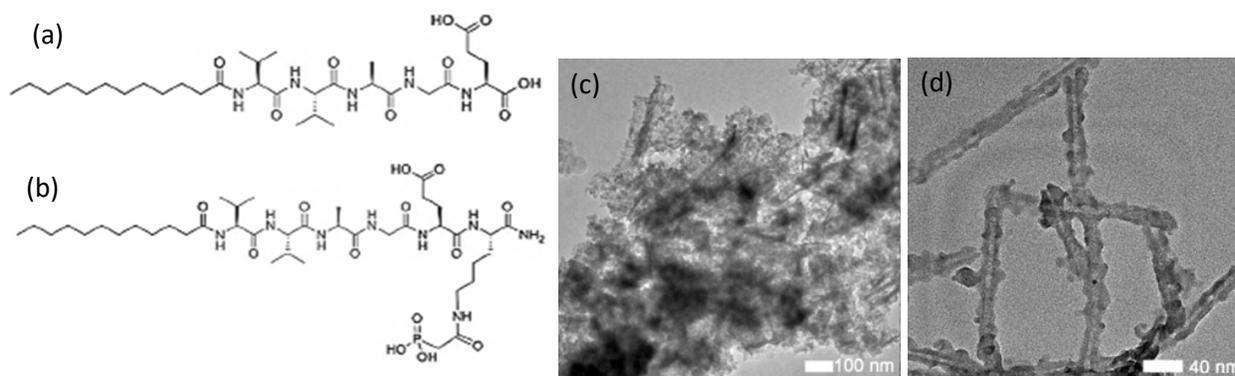
En base a los estudios electroquímicos, hechos con una celda tipo moneda, encontraron que el compósito  $\text{AgCl-FePO}_4$  presentó la mayor capacidad de descarga en el primer ciclo ( $145\text{ mAh/g}$ ) y después de 10 ciclos la capacidad decayó hasta  $100\text{ mAh/g}$ . Esta caída de capacidad la atribuyeron

a la reducción del AgCl durante el proceso de carga/descarga. Haciendo notar que, si bien la Ag metálica puede incrementar la conductividad eléctrica local, al momento de la reducción puede haber una disminución en el volumen de la partícula (AgCl) lo que disminuye el contacto entre las partículas e incrementa la resistencia. Para solucionar este problema decidieron adicionar una mayor cantidad de carbono conductor al momento de ensamblar la batería. Finalmente hicieron otra prueba para ver el comportamiento de la capacidad de descarga a diferentes velocidades, y observaron que las capacidades encontradas eran comparables con los mejores valores reportados para materiales sintetizados a altas temperaturas (165 mAh/g y 110 mAh/g en función de la velocidad). Así, mostraron que los materiales obtenidos por biomineralización podrían ser buenos candidatos en el diseño de batería de ión-litio.



**Figura 12:** Compósitos de Ag- $\text{FePO}_4$  sobre la superficie del fago M13, (a) NVs de Ag y de  $\text{FePO}_4$  sintetizadas de forma separada, (b) NPs de Ag y de  $\text{FePO}_4$  sintetizadas sobre el mismo fago y (c) micrografía de TEM del compósito (b).

Susapto *et al.*<sup>48</sup> reportaron la síntesis de NTs y nanocintas (NCs) de  $\text{FePO}_4$  usando dos péptidos como bioplantillas. Estos dos péptidos anfifílicos, a saber, E-PA (lauril-VVAGE) y Phos-PA (lauril-VVAGEK-fosfonoacetilo), ver Figura 13 (a) y (b), los diseñaron con una cola hidrofóbica, una pequeña secuencia de aminoácidos que forma una estructura tipo  $\beta$ -laminar y en la cabeza un grupo cargado. Mediante espectroscopía de dicroísmo circular corroboraron la formación de la estructura tipo  $\beta$ -laminar y mediante TEM observaron que el péptido E-PA formaba NCs con un ancho de 60 nm y el péptido Phos-PA formaba NVs con un diámetro de 10 nm. Calcinaron las muestras a 350 °C durante 1 hora para formar  $\text{FePO}_4$  anhidro (amorfo), observaron que el E-PA/ $\text{FePO}_4$  se sinterizó, Figura 13 (c), pero el Phos-PA/ $\text{FePO}_4$  formó NTs con paredes de  $\sim 8$  nm, Figura 13 (d). Observaron que el Phos-PA/ $\text{FePO}_4$  presentó una mayor capacidad (155 mAh/g) en comparación con el E-PA/ $\text{FePO}_4$  (117 mAh/g) y el  $\text{FePO}_4$ /sin plantilla (18 mAh/g), haciendo notar que la plantilla incrementó significativamente la capacidad. Concluyeron que el Phos-PA se ve favorecido en la mineralización de  $\text{FePO}_4$  por contener grupos fosfatos y como consecuencia presenta mejores propiedades electroquímicas.



**Figura 13:** Péptidos empleados en la mineralización del  $\text{FePO}_4$ , (a) péptido E-PA, (b) péptido Phos-PA, micrografías de TEM del  $\text{FePO}_4$  mineralizado sobre el péptido E-PA (c) y Phos-PA (d) después de haber sido calcinado a  $350\text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

De acuerdo con lo reportado un factor muy importante que contribuye a mejorar la conductividad del  $\text{FePO}_4$  es controlar el ordenamiento y la dimensión de las partículas. Lo que nos inspiró a emplear dos péptidos reportados en un trabajo previo que presentaron mayor abundancia en el proceso de *biopanning* sobre cristales de  $\text{LiFePO}_4$  (ver Tabla 2) para mineralizar el  $\text{FePO}_4$  tomando como ventaja el reconocimiento molecular<sup>49</sup>.

**Tabla 2:** Secuencias de aminoácidos de los péptido encontrados en el proceso de *biopanning* sobre cristales de  $\text{FePO}_4$ .

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Abundancia
1	L P V R L D W	3
2	H G G V R L Y	2
3	Y A T S D F L	1
4	S I T L N T P	1
5	W S L S E L H	1
6	S Y T D L L R	1
7	T S T G A I A	1
8	D T A L H S L	1
9	D R L S H T R	1
10	Q L Y R E F N	1
11	H L K H S L L	1
12	N S V L P F H	1
13	V S R D T P Q	1
14	Y H T T Q Y T	1

## 1.5 Planteamiento del problema

De lo ya descrito, se puede observar que el proceso de biomineralización es complejo y para entenderlo se necesita un enfoque multidisciplinario. Si bien los péptidos por si solos pueden inducir la mineralización, su organización sobre un andamio es deseable para la síntesis de materiales organizados. Una plataforma obvia para estos péptidos es el fago M13; por lo que, en esta tesis, se estudió su estabilidad (térmica y química) para proponer en un futuro condiciones más propicias para procesos de biomineralización. Por otro lado, se estudió el comportamiento de mineralización de dos péptidos (LPVRLDW y HGGVRLY) aislados, el cual depende del tipo de interacción que se establece entre los residuos y los precursores. Con esto en mente se generó un modelo de superficie para depositar en la superficie un aminoácido, en este caso la valina, debido a que está presente en los dos péptidos. Lo que en un futuro nos permitirá entender las interacciones péptido–material, así como la influencia de la identidad de los residuos en este tipo de procesos. Por lo que se plantearon los siguientes objetivos:

### 1.5.1 Objetivos generales

1. Estudiar la estabilidad del fago M13.
2. Sintetizar y caracterizar el  $\text{FePO}_4$  empleando como plantilla dos péptidos específicos obtenidos por la técnica de *biopanning*.
3. Generar un modelo de superficie del plano cristalino (100) de  $\text{LiFePO}_4$ .

### 1.5.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar espectroscópicamente mediante las técnicas de UV-visible, dicroísmo circular (DC) y fluorescencia la estructura secundaria y algunas características de la estructura terciaria del fago M13.
2. Estudiar la estabilidad del fago en medio ácido mediante espectroscopía de fluorescencia, de dicroísmo circular, dispersión de luz dinámica y electroforesis de gel de agarosa.
3. Estudiar la estabilidad térmica del fago M13 empleando espectroscopía de dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido.
4. Sintetizar y caracterizar  $\text{FePO}_4$  empleando péptidos afines como plantilla.
5. Calibrar el método empleado para generar el modelo de superficie con un modelo de bulto.
6. Generar la superficie (100) de  $\text{LiFePO}_4$  con un tamaño de celda 1x1x1 y optimizar los parámetros requeridos.
7. Generar la superficie (100) de  $\text{LiFePO}_4$  con un tamaño de celda 1x2x2, buscar el estado de espín de menor energía y generar el modelo de la valina.

## 2 Materiales y Métodos

### 2.1 Material

Vector M13KE (New England Biolabs), *E. coli* cepa XL1-Blue (Stratagene), medio Luria-Bertani (LB), LB Top Agar (Life Technology), tetraciclina (Sigma Aldrich), polietilenglicol (PEG MM ~ 8000, Amresco), NaCl (Sigma-Aldrich), agarosa ultrapura (Invitrogen), EDTA (Santa Cruz Biotechnology), tris-base (Amresco), ácido acético (Reasol), HCl (Sigma Aldrich), azul de coomassie brillante R-250 (Sigma Chemical Company), ácido 2-(N-morpholino)ethanosulfónico (MES, Sigma Life Science), acetato de sodio anhidro (Sigma), dodecilsulfato de sodio (SDS, Sigma), glicina (Amresco),  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (Baker Analyzed),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (J.T. Baker),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (J.T. Baker), nitrato de plata (Aldrich Chem. Co), nitrato de sodio (Baker Analyzed), etanol (J.T. Baker) y ácido sulfúrico (J.T. Baker).

### 2.2 Expresión, purificación y caracterización del fago M13

Como ya se mencionó, el fago M13 necesita la maquinaria celular de un hospedero apropiado para amplificarse. El fago se amplificó en un medio de cultivo líquido de LB inoculado con un cultivo de células *E. coli* cepa XL1-Blue, enriquecido con tetraciclina. A este cultivo se le permitió crecer a 32 °C durante 15 h con agitación de 200 rpm. Posteriormente, los fagos se purificaron por la técnica de precipitación<sup>50</sup>, usando PEG al 20% en 2.5 M de NaCl. Se centrifugó el cultivo a 8000 rpm durante 15 min a 4 °C para que eliminar la bacteria y dejar en el sobrenadante los fagos amplificados. Al sobrenadante se le adicionó 1/5 parte del volumen total del sobrenadante de PEG, éste se incubó durante 2 h en hielo. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4 °C. En este paso se conservó el *pellet* (los fagos precipitados) y se resuspendió en agua. Se repitió el paso anterior para eliminar cualquier impureza remanente. Finalmente, el *pellet* se resuspendió en un volumen de agua adecuado para obtener la concentración deseada.

### 2.3 Caracterización del fago M13

#### 2.3.1 Espectroscopía UV-vis

Los espectros de absorción se trataron para eliminar la contribución de la dispersión de luz del espectro de absorción mediante un ajuste de regresión lineal<sup>51</sup> y la concentración de la solución de fago M13 fue calculada de acuerdo con la ecuación 1, considerando la absorción a 269 nm porque representa la contribución debida a las proteínas y el ADN presente en el fago.

$$A^{269} = C \cdot l \cdot \epsilon \quad (1)$$

Donde  $C$  es la concentración en mg/mL,  $l$  es la longitud del paso óptico igual a 1.0 cm y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción con valor de  $3.84 \text{ cm}^2/\text{mg}^{52}$ . Se utilizó un espectrofotómetro UV-1800 de Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón.

#### 2.3.2 Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se obtuvieron aplicando radiación de excitación con longitud de onda de 280 nm, en una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico con 2.0 mL de muestra (0.1

mg/mL) a 25 °C. Se empleó un espectrofluorómetro marca *HORIBA Scientific* modelo Fluorolog®3-22 con una rendija (*slit*) de 1 mm y un ancho de banda (*bandpass*) de 2.0 nm.

### 2.3.3 Espectroscopía de dicroísmo circular (DC)

Los experimentos de DC se hicieron en la región del UV-lejano (200-250 nm), con 2.0 mL de una solución de fago M13 (0.01 mg/mL) contenida en una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico. Los espectros se obtuvieron con un tiempo de respuesta de 4 s, una velocidad de barrido de 2 nm/min, con un ancho de banda de 1.0 nm, y los datos se almacenaron cada 0.2 nm.

Se restó la contribución del amortiguador a los espectros de las muestras y se reportó como elipticidad del residuo medio (MRE) en grados  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ , definida por la ecuación 2.

$$MRE = \frac{\theta_{obs} \times MRW}{C \times l \times 10} \quad (2)$$

donde  $\theta_{obs}$  es la señal observada del DC en miligrados, MRW es la masa molar del residuo medio (igual a 104, calculada  $MM/N_o \text{ de aa}$ , donde  $MM = 14,350 \text{ kDa}$  y  $137,915 \text{ aminoácidos}$ )<sup>20</sup>,  $l$  es la longitud del paso óptico y  $C$  es la concentración en mg/mL<sup>53</sup>. Los espectros de dicroísmo se corrigieron restando la señal del amortiguador. Se empleó un espectropolarímetro marca Jasco modelo J-715 equipado con un controlador de temperatura tipo peltier PTC-348WI.

### 2.3.4 Dispersión de luz dinámica (DLS)

En los parámetros del equipo se consideró como material a analizar proteína (índice de refracción= 1.450 y absorción= 0.001) y como dispersante agua (viscosidad= 0.8872 cP e índice de refracción= 1.330). Las mediciones se hicieron a 25 °C con un tiempo de equilibrio de 120 s, con una celda de 1 cm de paso óptico (modelo DTS0012) y 1.0 mL de muestra (0.1 mg/mL), a un ángulo de retrodispersión a 173°. Se hicieron 10 mediciones continuas y cada medición fue el promedio de 20 corridas con una duración de 10 s cada una. Se realizó en el equipo Zetasizer Nano modelo ZSP (Malvern Instruments Limited), que consiste de un láser de 10.0 mW de He-Ne con una longitud de onda de 632.8 nm.

## 2.4 Estabilidad del fago M13

### 2.4.1 Caracterización del fago M13 en medio ácido

Una limitante para caracterizar espectroscópicamente al fago M13 es su precipitación a valores de pH menores a su punto isoeléctrico ( $pI = 4.4$ )<sup>54</sup>, por lo que decidimos neutralizar las muestras al momento de analizarlas. A continuación, se describe brevemente el diseño del experimento: se preparó una solución de fago M13 (la concentración depende de la técnica de caracterización) en el amortiguador correspondiente (medio ácido) y se mantuvo en estas condiciones durante tres tiempos diferentes ( $t_1=10 \text{ min}$ ,  $t_2=120 \text{ min}$  y  $t_3=1260 \text{ min}$ ). Al momento de analizar la muestra, se hizo una dilución 1:10 en amortiguador MES (10 mM pH 7.0) para neutralizarla. Se utilizaron los siguientes amortiguadores de pH a una concentración 10 mM: MES (C pH 7.0), acetato de sodio (pH 3.0) y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 2.5).

En este estudio, como control, se usó una muestra intacta de M13 (referencia), una muestra sometida a sonicación (control 1) y una muestra desnaturalizada con SDS (2% final) y calentada a ebullición por 10 min con el fin de desensamblar por completo al fago<sup>55</sup> (control 2), a pH 7.0.

#### 2.4.1.1 Espectroscopía de fluorescencia

La solución inicial del fago (0.5 mg/ml) fue incubada en medio ácido durante diferentes periodos de tiempo ( $t_1=10$  min,  $t_2=120$  min y  $t_3=1260$  min). Para el análisis, las muestras se diluyeron con el amortiguador de pH MES 10 mM, pH 7.0 hasta una concentración final de fago de 0.05 mg/mL. También se analizó una alícuota de la muestra diluida después de ser centrifugada.

Los espectros de emisión de fluorescencia analizados se normalizaron respecto a la concentración de fago M13 a 0.05 mg/mL en base a los espectros de absorción UV-visible de cada muestra. También se determinó el centro de masa espectral (CME) de cada espectro de emisión de acuerdo a la ecuación 3.

$$CME = \frac{\sum \lambda_i F_i}{\sum F_i} \quad (3)$$

Donde  $\lambda_i$  es la  $i$ -ésima longitud de onda y  $F_i$  es la  $i$ -ésimo valor de intensidad de fluorescencia<sup>56</sup>. Se analizaron 2 mL de cada muestra contenidos en una celda de pasó óptico de 1 cm, aplicando los mismos parámetros del equipo que se mencionaron en el apartado 2.3.2.

#### 2.4.1.2 Espectroscopía de dicroísmo circular

Se prepararon 100  $\mu$ L de fago M13 (1.0 mg/mL) y se mantuvieron a pH 3.0 y 2.5 durante 120 min ( $t_2$ ). Para la caracterización de las muestras se diluyeron a 0.1 mg/mL en amortiguador MES; en este caso no se centrifugaron las muestras para analizarlas. Se analizaron 500  $\mu$ L contenidos en una celda de cuarzo de 0.2 cm de paso óptico. Los espectros se reportaron como elipticidad del residuo medio (MRE) en grados  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$  definido por la ecuación 2. Los parámetros establecidos en las mediciones fueron los mismos que se mencionaron en el apartado 2.3.3.

#### 2.4.1.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

Se caracterizaron las muestras en medio ácido y después de ser neutralizadas, se emplearon las mismas concentraciones que se indicaron en el apartado anterior. Los parámetros del equipo fueron los mismos que se mencionaron en el apartado 2.3.4.

#### 2.4.1.4 Electroforesis de gel de agarosa

Dos muestras de la solución inicial de fago (5 mg/mL) se incubaron a pH 3.0 y 2.5 durante 120 min ( $t_2$ ). Las muestras se diluyeron a 0.5 mg/mL en el mismo amortiguador en el que se incubaron, respectivamente, y otra alícuota se diluyó en amortiguador pH 7.0 para observar si había alguna diferencia en analizar la muestra neutra o en medio ácido.

Se cargaron 20  $\mu$ L de cada muestra en un gel de agarosa al 1 %, usando como amortiguador de corrida TAE (pH = 8.5, tris-base 40 mM, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM); las condiciones de corrida fueron 75 V por 80 min. Finalmente, el gel se tiñó con una solución de azul de coomassie.

## 2.4.2 Ensayo de desnaturalización térmica en medio acuoso.

### 2.4.2.1 Espectroscopía de dicroísmo circular

Se hizo un registro continuo de los cambios de elipticidad, a 222 nm, con una velocidad de calentamiento de 1 °C/min y en un intervalo de 25 °C a 85 °C, con agitación continua (400 rpm). Se estableció un tiempo de respuesta de 2 s, un ancho de banda de 2.0 nm y los datos se colectaron cada 0.2 °C.

Se analizaron 2.0 mL de una solución de fago 0.01 mg/mL a tres diferentes valores de pH (5.0, 7.0 y 10.0), empleándose los siguientes amortiguadores: acetato de sodio (pH 5.0), fosfato de sodio (pH 7.0, 15 mM) y glicina (pH 10.0, 10 mM). Se obtuvo el espectro de dicroísmo de 25 a 85 °C y después de enfriar la muestra a 25 °C, los parámetros del equipo fueron los mismos que se mencionaron en el apartado 2.3.3.

## 2.4.3 Desnaturalización térmica en medio etanol-agua.

### 2.4.3.1 Espectroscopía de dicroísmo circular

Se obtuvieron los perfiles de desnaturalización térmica del fago M13 (2 mL, 0.01 mg/mL) en una mezcla etanol-agua de diferente composición (% V/V), amortiguados a pH 7.0 con fosfatos (15 mM), siguiendo el cambio de elipticidad (222 nm). Estos estudios se hicieron en un intervalo de 25 °C a 80 °C, con los mismos parámetros de equipo mencionados en el apartado 2.4.2.1.

Para determinar la temperatura media de la transición ( $T_m$ ) a partir de los perfiles experimentales se consideró que el proceso de desnaturalización ocurre en una sola etapa (ver esquema 1).



Donde  $N$  representa el estado nativo y  $D$  el estado desnaturalizado. Según este modelo, la fracción desnaturalizada ( $f_d$ ) de proteína se calcula con la ecuación 4, empleando los valores de elipticidad (miligrados) obtenidos en el barrido.

$$f_D = \frac{(\theta_{obs} - \theta_N)}{(\theta_D - \theta_N)} \quad (4)$$

Donde  $\theta_{obs}$  es la elipticidad medida a cada temperatura,  $\theta_N$  y  $\theta_D$  representan la elipticidad de la forma nativa y desnaturalizada, respectivamente, a la misma temperatura. Se hicieron ajustes lineales de la región previa y posterior a la transición para estimar los valores de  $\theta_N$  y  $\theta_D$  en el intervalo de temperatura experimentado<sup>57</sup>.

Con los valores de  $f_d$  se determinó entonces la temperatura media de la transición ( $T_m$ ), que corresponde al punto de inflexión de la curva tipo sigmoide.

### 2.4.3.2 Calorimetría diferencia de barrido (DSC)

Los experimentos de DSC se hicieron con un volumen de celda de 300  $\mu$ L bajo una presión de 3.00 atm, a una velocidad de calentamiento de 1 °C/min. Después de cada barrido de calentamiento se enfrió la muestra y se repitió el barrido de calentamiento. Las muestras fueron desgasificadas durante 5 min antes de introducir las en el calorímetro.

Se analizó una solución de fago (2 mg/mL) en una mezcla etanol-agua amortiguada a pH 7.0 con fosfatos 15 mM. Los experimentos se hicieron en mezclas etanol-agua de diferente composición: 0, 10, 20, 30 y 50 % de etanol (V/V). Este estudio se llevó a cabo en un calorímetro nanoDSC de TA Instruments, modelo 6300.

## 2.4.4 Efecto de iones en la estabilidad térmica del fago M13

### 2.4.4.1 Espectroscopía de dicroísmo circular

Se obtuvieron los perfiles de desnaturalización térmica del fago M13 (2 mL, 0.01 mg/mL) en una mezcla etanol-agua (30 % etanol V/V) con diferentes cationes monovalentes, siguiendo el cambio de elipticidad (222 nm). Estos estudios se hicieron en un intervalo de 25 °C a 80 °C, con los mismos parámetros del equipo mencionados en el apartado 2.4.2.1.

Se analizaron tres relaciones  $[ion]/[residuo\ medio]$ , empleando  $Ag^+$  (0.5, 1 y 5) y  $Na^+$  (1 y 2). Considerando la masa molar del residuo medio igual a 104.75 g/mol<sup>58</sup> y como precursores de los cationes se usó la sal de  $AgNO_3$  y  $NaNO_3$ .

## 2.5 Síntesis y caracterización del $FePO_4$ empleando como plantilla los péptidos jho1 y jho2

### 2.5.1 Caracterización de las plantillas empleadas en la síntesis por espectroscopía UV-visible

Los péptidos jho1 y jho2 se obtuvieron de forma comercial a través de la empresa BIOMATIK, en la Tabla 3 se mencionan las características de cada péptido.

**Tabla 3:** Características de los péptidos empleados.

Péptido	Secuencia	MM (g/mol) <sup>a</sup>	Pureza % <sup>a</sup>	pI <sup>b</sup>	$\epsilon^{280\ nm} (M^{-1}cm^{-1})$ <sup>b</sup>
jho1	LPVRLDW	898.11	99.6	5.84	5500
jho2	HGGVRLY	800.96	97.2	8.75	1490

a: información obtenida del fabricante, b: información obtenida del servidor ExPASy ProtParam tool el día 19-06-2014.

#### 2.5.1.1 Espectroscopía UV-visible

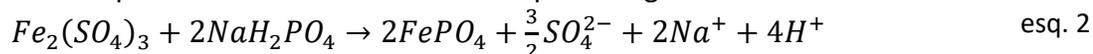
La solución del péptido se cuantificó mediante espectroscopía UV-vis en el equipo NanoDrop modelo 2000, empleando 2.0  $\mu$ L de muestra.

#### 2.5.2 Síntesis del $FePO_4$

Las reacciones de síntesis de  $FePO_4$  se hicieron con los péptidos jho1, jho2 y como control se hizo la reacción en ausencia de péptido. Para la síntesis se emplearon 2 relaciones molares  $[péptido]/[Fe^{3+}]/[PO_4^{3-}]$  iguales a 1/10/10 y 1/100/100.

A 500  $\mu$ L de una solución de péptido ( $\approx$  3.4 mM) se le adiciono el volumen adecuado de una solución de  $Fe_2(SO_4)_3$  (2.0 mM, pH 2.0, previamente ajustado con ácido sulfúrico), con agitación constante y manteniendo el pH en un valor de 2.0. La solución se incubó 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionó el volumen adecuado de una solución de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4 mM (pH 2.1-2.2, previamente ajustado con ácido clorhídrico), con agitación constante y manteniendo el pH constante. En el esquema 2 se muestra la reacción que da lugar al  $\text{FePO}_4$ .



Después de 24 h de incubación a temperatura ambiente se formó un precipitado de color amarillo, el cual se recuperó por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 min. El precipitado se lavó 3 veces con agua y se secó a 37 °C por 1 día. La muestra fue calcinada en una mufla (*Thermolyne* modelo 4800) a diferentes temperaturas empleando una rampa de calentamiento y de enfriamiento a una velocidad de 1 °C/min, en un medio de aire estático.

### 2.5.3 Caracterización del $\text{FePO}_4$ sintetizado

#### 2.5.3.1 Análisis termogravimétrico y análisis térmico diferencial (TG/DTA).

Este análisis se hizo con un equipo de TG/DTA marca *Perkin Elmer* modelo *Pyris Diamont*, se empleó una velocidad de calentamiento de 5 °C/min calentando de 25 a 800 °C, la muestra se colocó en una celda de platino con una masa entre 1.0 – 2.0 mg y se hizo en un medio de aire estático.

#### 2.5.3.2 Difracción de rayos X de polvos.

Se analizaron las muestras sin calcinar y calcinadas a 400 y 600 °C. Solo se analizaron las muestras cuya relación molar fue 1/100/100. Los difractogramas se obtuvieron con un difractómetro modelo D8ADVANCE *Bruker* empleando un ánodo de Cu con radiación  $\text{K}\alpha$  ( $\lambda=1.54 \text{ \AA}$ ), el equipo se operó con un potencial eléctrico de 40 kV y una corriente de 35 mA constantes, un paso de 0.02° y un tiempo de integración de 0.2 s., los datos se adquirieron en un intervalo de  $2\theta$  entre 5 – 70°.

#### 2.5.3.3 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier en modo de reflectancia total atenuada FTIR-ATR.

El análisis de IR se realizó en un equipo *Perkin Elmer* modelo Spectrum GX empleando el accesorio de reflexión atenuada (ATR), las mediciones se hicieron en un intervalo de 280 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  colectando los datos cada 1.0  $\text{cm}^{-1}$ , el espectro obtenido resultó de promediar 16 barridos con una resolución de 8  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 2.5.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS).

El tamaño, la morfología y composición del material obtenido se determinó por SEM y EDS respectivamente. El estudio de la morfología se hizo en un microscopio electrónico de barrido marca JEOL modelo JSM-7600F *Field Emission*. La muestra se soportó en una cinta de carbono pegada al porta muestras tipo barrilito. Antes del análisis de las muestras estas fueron cubiertas con oro.

El tamaño de partícula se midió con el programa *ImageJ*, calibrando el programa con la escala de cada imagen en nanómetros. Se analizaron entre 2 – 3 imágenes de cada muestra y se midieron entre 60 – 90 partículas para construir el histograma.

La composición química de los sólidos calcinados a 600 °C y sintetizados con la relación molar 1/100/00 fue obtenida mediante un espectro de dispersión de energía de rayos-X en un intervalo

de 0–8.0 keV. Se preparó una pastilla de  $\text{FePO}_4$  con un espesor de aproximadamente 1.0 mm y finalmente se cubrió con oro.

### 2.5.3.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y con filtrado energético (EFTEM).

Para caracterizar la cristalinidad de las partículas de  $\text{FePO}_4$  se obtuvieron imágenes de alta resolución de TEM (HRTEM). A partir de estas imágenes se obtuvieron las distancias interplanares. Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL modelo 2100F *Field Emission* con un voltaje de aceleración de 200 kV y una longitud de cámara de 120 cm. Las muestras fueron soportadas en rejillas de cobre (200 *mesh*) cubiertas de *formvar*.

Para obtener la composición elemental se usó un microscopio JEM modelo ARM200F *Atomic Resolution Analytical Microscope* con un voltaje de aceleración de 200 kV. Las muestras fueron soportadas en rejillas de cobre (200 *mesh*) cubiertas de *holey carbon*.

## 2.6 Modelo teórico

Para estudiar la interacción de un aminoácido sobre una superficie empleando cálculos de estructura electrónica es necesario emplear una metodología que nos ayude a demostrar que las aproximaciones empleadas describen bien el sistema.

La metodología para general el modelo de superficie de  $\text{LiFePO}_4$  se desarrolló en tres etapas. Primero se generó un modelo del bulto de  $\text{LiFePO}_4$  para determinar los parámetros requeridos para describir bien el sistema. Posteriormente se generaron diversos modelos para representar la superficie (100) del  $\text{LiFePO}_4$  partiendo de una celda unitaria correspondiente. Estos modelos se optimizaron considerando diferentes estados de espín. Finalmente se generó el modelo de la valina (aislada).

Todos los cálculos se realizaron con el paquete de simulación *Ab initio* Viena (*vasp*) en su versión 5.4, bajo la teoría de funcionales de la densidad (DFT) en el formalismo de Kohn-Sham, el método del proyector de ondas aumentadas (PAW) y la aproximación propuesta por Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) al funcional de intercambio y correlación. Adicionalmente, se optimizaron los parámetros de red con dos aproximaciones, la corrección de Hubbard, conocida como DFT+U, asignando el valor de los parámetros  $U = 5.3 \text{ eV}$  y  $J = 1 \text{ eV}$  de acuerdo con lo reportado por G. Ceder *et al.*<sup>59</sup> y las interacciones tipo Van der Waals, siguiendo la formulación empírica de Tkatchenk-Scheffler<sup>60</sup>.

### 2.6.1 Modelo del bulto de $\text{LiFePO}_4$

Para calibrar el método empleado en este estudio se hizo la selección de los pseudopotenciales disponibles en la base de datos de *vasp* para cada elemento del  $\text{LiFePO}_4$ . Se usó como modelo moléculas compuestas por átomos presentes en el  $\text{LiFePO}_4$  como  $\text{P}_2$ ,  $\text{O}_2$  y la estructura cristalina tipo fluorita del  $\text{Li}_2\text{O}$ .

Por cada pseudopotencial se hizo un muestreo para determinar el número de ondas planas requeridas para describir el sistema, tomando como criterio una variación en la energía relativa

menor al 0.5 kcal/mol. El número de ondas planas es determinado por un parámetro denominado corte en la energía. Se varió el corte en la energía, entre 200 eV—1000 eV considerando intervalos de 100 eV. Se estableció que el cambio en la energía entre dos pasos consecutivos del proceso de autoconsistencia (SCF) tenía que ser menor a  $10^{-7}$  eV como condición de convergencia. La variación en la energía relativa respecto al número de ondas planas se calculó de acuerdo con la ecuación 5.

$$E_{relativa}(kcal/mol) = 23.0609 * (E_{min} - E_i) \quad (5)$$

Donde  $E_{min}$  es la energía mínima encontrada en eV,  $E_i$  la  $i$ -ésima energía encontrada en eV y 23.0609 es el factor de conversión de eV a kcal/mol.

Para el caso de la estructura cristalina de  $Li_2O$  se realizó un estudio de convergencia con respecto al tamaño de malla de puntos  $k$  igualmente espaciados para muestrear la primera zona de Brillouin. Finalmente, se optimizó la geometría de los modelos relajando solo los grados de libertad internos (relajación de los iones) para las moléculas diatómicas y todos los grados de libertad (relajación de los iones, forma y volumen de la celda) para el  $Li_2O$ . Para la relajación estructural se usó como condición de convergencia que las fuerzas en todos los iones fueran menores de 0.01 eV.

Por cada elemento se eligió el pseudopotencial que describiera mejor la distancia de enlace o los parámetros de red respecto al valor experimental.

Por otro lado, se generó el modelo del bulto de  $LiFePO_4$  tomando como base la celda unitaria tipo *Triphylite*. En la Tabla 4 se muestran las posiciones atómicas y las características de la estructura cristalina del  $LiFePO_4$  usadas para generar la celda unitaria  $1 \times 1 \times 1$ .

Una vez determinado el número de funciones de ondas planas y los pseudopotenciales elegidos, se realizó un estudio de convergencia en la energía con respecto al tamaño de la malla de puntos  $k$ . Con estos parámetros se optimizó la geometría del cristal de  $LiFePO_4$  relajando todos los grados de libertad (relajación de los iones, forma y volumen de la celda).

**Tabla 4:** Estructura cristalina y posiciones atómicas del  $LiFePO_4$  determinadas a 300 K, reportados por Rouse et al.<sup>61</sup>.

Átomo	x	y	z
Li	0	0	0
Fe	0.2822	0.25	0.9738
P	0.0950	0.25	0.418
O (1)	0.09713	0.25	0.7428
O (2)	0.4573	0.25	0.2067
O (3)	0.166	0.0464	0.2851
Estructura cristalina	Ortorrómbica		
Grupo espacial	$Pnma$ (62)		
Parámetros de red	$a = 10.3377 \text{ \AA}$	$b = 6.0112 \text{ \AA}$	$c = 4.6950 \text{ \AA}$

Debido a la presencia del hierro consideró un estado de espín antiferromagnético y un momento magnético de magnitud de  $5 \mu_B$ . De acuerdo con lo reportado por Rouse et al.<sup>61</sup> el  $LiFePO_4$  presenta un estado de espín antiferromagnético y un momento magnético de  $4.19 \mu_B$ .

Se hicieron pruebas para determinar el estado de espín de los átomos de hierro presentes en la celda unitaria, por lo que se hizo un estudio con todas las posibles combinaciones de estados de espín del Fe y se eligió la de más baja energía, ver Figura A1 del Apéndice I.

Por último, se optimizaron los parámetros de red con las dos aproximaciones mencionadas anteriormente y se hizo un análisis de geometría (parámetros de red, distancia de enlace para verificar que nuestro modelo se aproximara a los valores experimentales reportados).

## 2.6.2 Modelo de superficie (100) de $\text{LiFePO}_4$

Para generar la superficie (100) se usó como base el modelo de bulto con la geometría que mejor describió los parámetros de red. Primero, se incrementó el tamaño de la celda unitaria  $1 \times 1 \times 1$  del modelo de bulto en la dirección de  $\vec{a}$  dejando  $10 \text{ \AA}$  de separación entre el último átomo y la celda unitaria denominado vacío, ver Figura A2 del Apéndice I.

Se decidió modelar al sistema con solo dos láminas como primera aproximación. Al momento de hacer el corte en esa dirección se mantuvo la geometría tetraédrica del  $\text{PO}_4$  debido al fuerte enlace covalente P–O, en consecuencia, los átomos de hierro coordinados con seis oxígenos fueron cortados y los iones  $\text{Li}^+$  se dejaron cerca del grupo P–O para compensar la carga negativa de los oxígenos.

Se realizó un estudio de convergencia, con diferentes tamaños de vacío para determinar el espacio requerido para evitar interacción entre láminas vecinas. Se empleó la misma metodología que se usó para el estudio del bulto, la única diferencia fue que se usó una malla de puntos  $k$  de  $1 \times 3 \times 3$ .

Posteriormente se optimizaron los grados de libertad internos (relajación de los iones) manteniendo fija la forma y volumen de la celda. Y se hizo un análisis de geometría para verificar que el modelo de superficie fuera adecuado.

Como resultados preliminares se generó una celda de  $1 \times 2 \times 2$  de la superficie (100) con la intención de poder depositar la valina en la superficie como futura perspectiva. El objetivo de hacer más grande la celda es para evitar que la valina interactúe con otras valinas vecinas y así garantizar que la energía obtenida sea solo debido a la adsorción.

Con la geometría de la superficie  $1 \times 1 \times 1$  se generó una celda de  $1 \times 2 \times 2$  duplicando la celda en la dirección de  $\vec{b}$  y  $\vec{c}$  y se optimizaron nuevamente los grados de libertad internos.

También se generó el modelo de la valina (aislada) en su forma canónica, es decir el extremo carboxilo no se encuentra desprotonado y el extremo amino terminal no se encuentra protonado. Considerando que la valina es parte de un péptido que está insertado cerca del extremo N-terminal de la proteína P8 del fago M13; por lo tanto; este se encontraría de forma neutra. Posteriormente se optimizaron los grados de libertad internos.

### 3 Resultados

#### 3.1 Expresión, purificación y caracterización del fago M13

Empleando el método mencionado en la sección 2., se obtuvieron preparaciones del fago purificado cuya concentración fue determinada por absorción de luz UV. En la Figura 14 (a) se muestra un espectro típico de absorción del fago M13. La concentración se determinó de acuerdo con la ecuación 1, obteniéndose un valor de 0.076 mg/mL.

El fago M13 presenta aminoácidos aromáticos en toda su cápside, pero la mayor contribución se debe a la proteína P8 (ver Tabla 5). Así, la fluorescencia nos da información principalmente de la proteína que cubre el cuerpo del fago (P8).

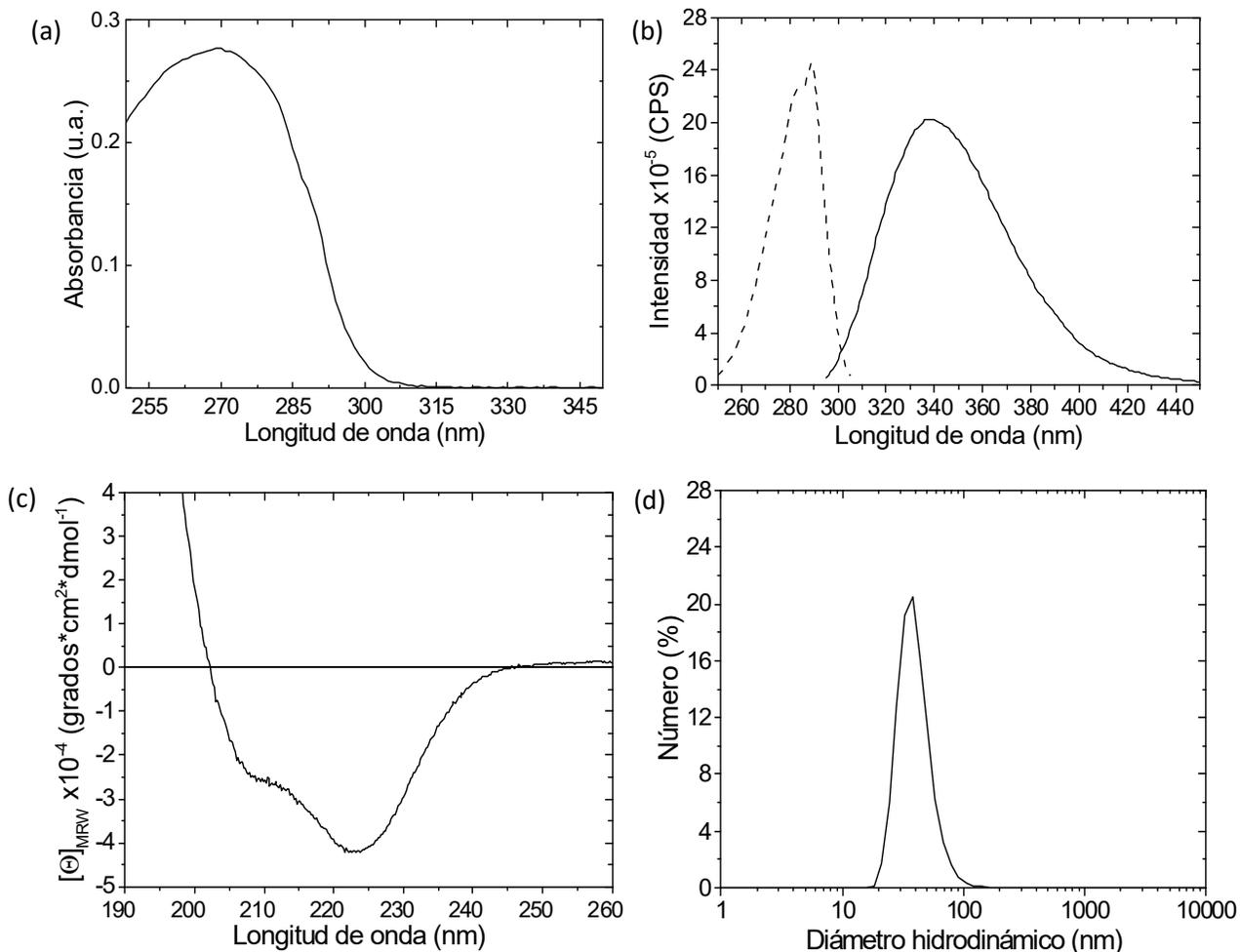
**Tabla 5:** Número de residuos aromáticos por unidad de proteína presentes en las diferentes proteínas que componen el fago M13<sup>20</sup>.

Proteína	No. de copias por fago	No. Tirosina	No. Triptófano	No. Fenilalanina
P3	≈ 5	20	4	21
P6	≈ 5	4	1	10
P7	≈ 5	1	0	2
P8	≈ 2700	2	1	3
P9	≈ 5	2	1	3
Total		29	7	39

En la Figura 14 (b) se muestra los espectros de fluorescencia de excitación y de emisión de una solución de fago 0.1 mg/mL en amortiguador MES (5 mM), con una longitud de onda máxima de emisión de 339 nm cuando la muestra fue excitada a 280 nm. El máximo de emisión indica que la fluorescencia se origina en un residuo de triptófano, en este caso el triptófano 26 (W26) de la proteína P8, que se encuentra en un ambiente moderadamente polar. Se sabe que un aumento en la polaridad del ambiente que rodea al fluoróforo indol causa un corrimiento del espectro de fluorescencia hacia el rojo debido a que se reorienta el cromóforo con los dipolos del solvente y los aminoácidos vecinos<sup>28</sup>.

En la Figura 14 (c) se muestra un espectro de dicroísmo circular característico del M13; se observan bandas negativas a 222 nm y a 208 nm típicas de la estructura tipo alfa-hélice, pero con una magnitud considerablemente mayor a 222 nm. Esta característica es típica del fago M13, y se ha propuesto que se debe a una importante contribución del triptófano de la proteína P8 o bien a la simetría que adquiere por interactuar con el ADN<sup>58,62</sup>.

En la Figura 14 (d) se muestra la distribución de tamaño de partícula en función del número. El diámetro hidrodinámico promedio del fago resultó de  $40.92 \pm 5.43$  nm que es similar al reportado por Ma *et al.* ( $49.0 \pm 16.9$  nm)<sup>63</sup>.



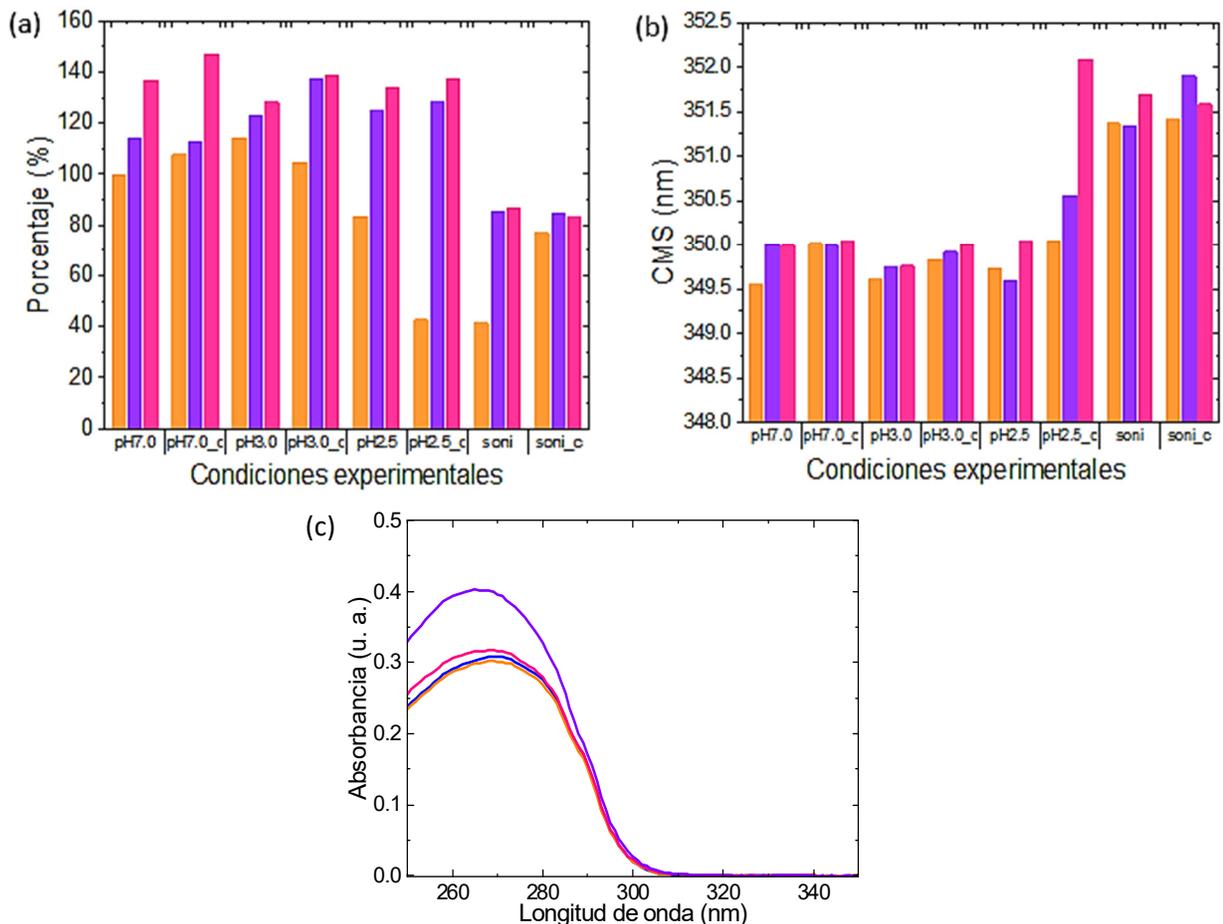
**Figura 14:** (a) Espectro de absorción UV-visible del fago M13 (0.076 mg/mL) en agua. (b) Espectro de fluorescencia del fago M13 (0.1 mg/mL, amortiguado con MES 5 mM, pH 7.0) donde la línea discontinua representa el espectro de excitación (EX) empleando una  $\lambda^{EM}$  de 339 nm y la línea continua representa el espectro de emisión (EM) empleando una  $\lambda^{EX}$  de 280 nm. (c) Espectro de DC del fago M13 (0.01 mg/mL, amortiguado con fosfatos 15 mM, pH 7.0). (d) Distribución del tamaño de partícula del fago M13 (0.1 mg/mL, amortiguado con fosfatos 15 mM, pH 7.0) en función del porcentaje en número.

## 3.2 Estabilidad del fago M13

### 3.2.1 Caracterización del fago en medio ácido

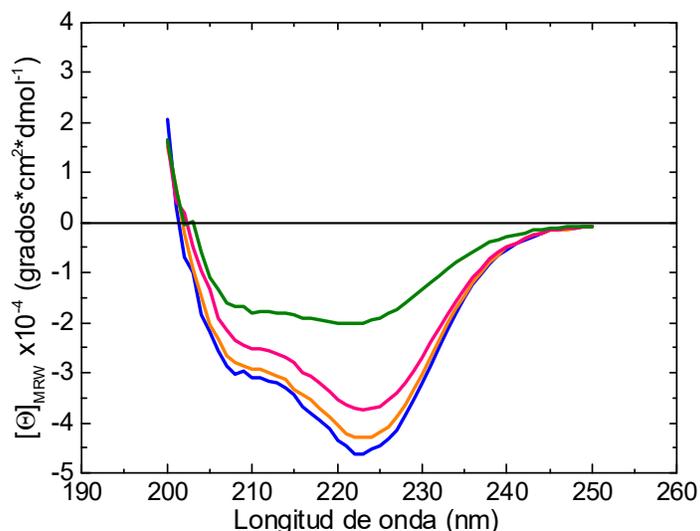
Para observar los cambios estructurales del fago a un pH dado se hicieron mediciones a diferentes tiempos y, se calculó el porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia a 339 nm respecto del fago intacto a pH 7.0 (referencia). En la Figura 15 (a) se puede observar que a  $t_1$  (10 min) la muestras no muestran una tendencia clara, solamente se ve una disminución en la intensidad para el fago a pH 2.5 y el sonicado (control 1). A los 120 min ( $t_2$ ) se puede observar que la intensidad no sufre modificaciones considerables. Después de 1260 min ( $t_3$ ) hay un pequeño incremento en intensidad respecto al  $t_2$ .

Se determinó el centro de masa espectral (CME) y se muestra Figura 15 (b). Puede observarse que es muy similar para las muestras acidificadas y la referencia y en todos los casos esta alrededor de  $350 \pm 0.5$  nm. Sin embargo, el fago expuesto a un pH de 2.5 y centrifugado muestra un desplazamiento de cerca de 2 nm. Un efecto similar se observa para el control 1. Este corrimiento hipsocrómico del CME también se observó en el espectro de absorción, debido probablemente a un cambio en el microambiente de los residuos aromáticos, los cuales se encuentran más expuestos al solvente<sup>64</sup>, Figura 15 (c).



**Figura 15:** (a) Análisis del porcentaje de variación de la intensidad de fluorescencia respecto a la muestra de referencia y (b) centro de masa espectral de cada uno de los espectros de emisión, donde “c” indica muestra centrifugada, al tiempo t<sub>1</sub> (naranja), al tiempo t<sub>2</sub> (morado) y al tiempo t<sub>3</sub> (rosa). (c) Espectro de absorción de las muestras analizadas por dicroísmo circular después de neutralizarlas al t<sub>2</sub>. Siendo la muestra de referencia a pH 7.0 (azul), después ser sometida a pH 3.0 (naranja), pH 2.5 (rosa) y control 1 (muestra sometida a sonicación, verde).

Por otra parte, en la Figura 16 se puede observar que la proteína P8 del fago, al estar expuesta a un ambiente ácido modifica su estructura secundaria, pero el espectro de DC no pierde la forma característica del fago. A pesar de que la muestra sonicada preserva la estructura alfa-hélice, se puede observar que la intensidad de las dos bandas cambia, lo que nos podría indicar que la proteína P8 ya no está interactuando con el ADN de la misma forma que en el fago intacto. Ya que al comparar la relación de  $[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$  que se muestra en la Tabla 6, las muestras conservan esta relación alrededor de 1.5 en cambio la muestra sonicada presenta un valor menor.



**Figura 16:** Espectro de dicroísmo circular de las diferentes muestras de fago M13 analizadas al tiempo  $t_2$ . Siendo la muestra de referencia a pH 7.0 (azul), después ser sometida a pH 3.0 (naranja), pH 2.5 (rosa) y sonicada (muestra sometida a sonicación, verde).

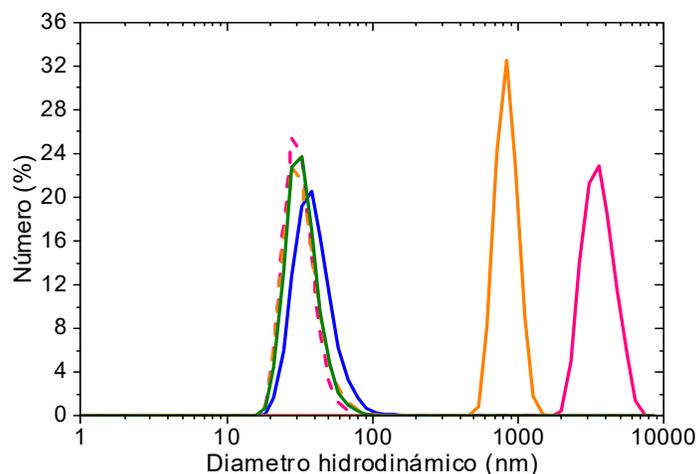
**Tabla 6:** Análisis de los espectros de dicroísmo de las muestras analizadas al  $t_2$ .

Muestra	MRE <sub>222nm</sub>	MRE <sub>208nm</sub>	$[\theta]_{222}/[\theta]_{208}$	% señal <sub>222nm</sub>
pH 7.0	-46181.71	-30174.87	1.53	100.00
pH 3.0	-42721.61	-27821.68	1.54	92.51
pH 2.5	-37269.54	-23622.62	1.58	80.70
sonicado	-20126.76	-16609.42	1.21	43.58

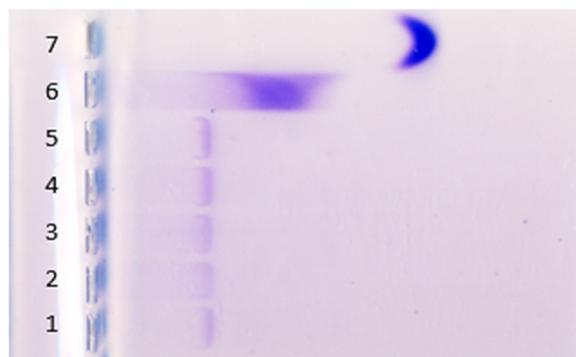
En esta tabla el valor % señal<sub>222nm</sub> es el porcentaje de variación del valor de MRE<sub>222nm</sub> de las muestras respecto a la muestra en agua.

La distribución de tamaño de partícula obtenido de las diferentes condiciones a las que se sometió el fago se presenta en la Figura 17. Se puede observar claramente que las partículas de fago se agregan al estar en un medio a pH 3.0 y 2.5, siendo las partículas más grandes las que están a pH 2.5. Al momento de neutralizar la muestra se puede observar como el tamaño de partícula regresa al tamaño correspondiente a la referencia. Esto nos podría indicar que el fago no sufre cambios considerables en su estructura al estar expuesto en ese medio por 120 min. ( $t_2$ ) lo cual es consistente con los resultados observados en los espectros de dicroísmo circular.

En el gel de electroforesis en agarosa, Figura 18, se puede observar que las muestras en medio ácido y neutralizadas muestran las mismas propiedades electroforéticas que la referencia; en cambio en control 1 queda dispersa sobre el carril, pero con menor movilidad que la muestra desnaturada con SDS (control 2), lo que nos podría indicar que la proteína P8 no se disoció completamente al ser sometida a sonicación.



**Figura 17:** Distribución del tamaño de partículas de fago en función del porcentaje en número, referencia (azul), pH 3.0 (naranja), pH 2.5 (rosa) y control 1 (muestra sometida a sonicación, verde). La línea continua indica que el fago se encuentra en medio ácido y la línea discontinua indica que se analizó después de haber sido neutralizado.

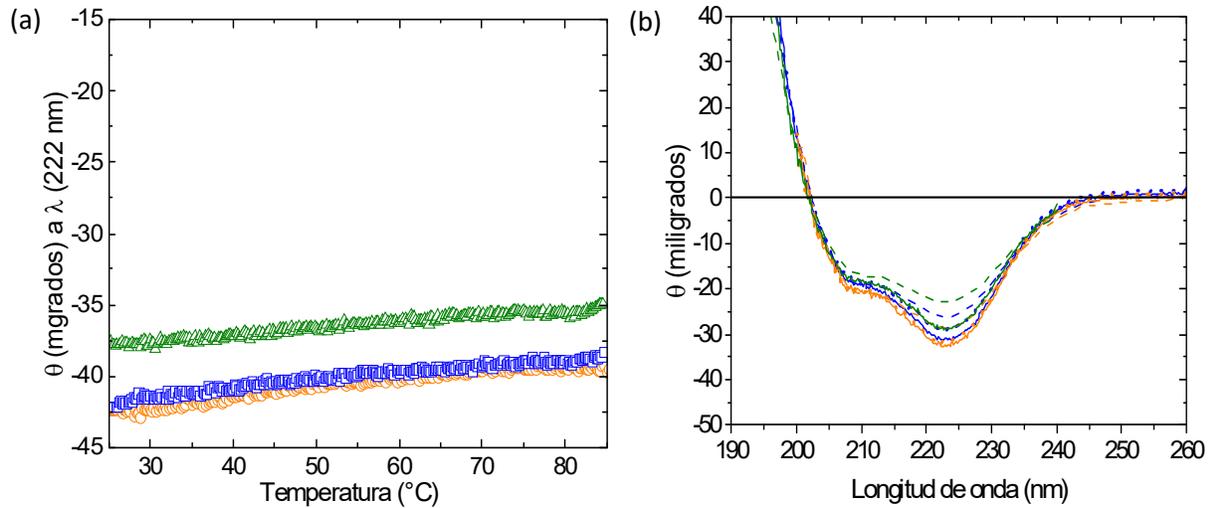


**Figura 18:** Gel de agarosa, carril 1: referencia, carril 2: fago tratado a pH 2.5, carril 3: fago tratado a pH 3.0, carril 4: fago neutralizado después de haber estado en pH 2.5, carril 5: fago neutralizado después de haber estado en pH 3.0, carril 6: control 1 (muestra sometida a sonicación) y carril 7: control 2 (muestra desnaturizada con SDS).

### 3.2.2 Estudio de desnaturalización térmica del fago M13 en medio acuoso

#### 3.2.2.1 Espectroscopía de dicroísmo circular

En la Figura 19 (a) se muestran los barridos térmicos de muestras de fago en amortiguadores acuosos con pH 5.0, 7.0 y 10.0, registradas a una velocidad de calentamiento de 1.0 °C/min. Como puede verse, no se aprecia más que un cambio gradual en la señal de DC (a 222 nm) al aumentar la temperatura hasta 85 °C. Los espectros registrados a la temperatura inicial, después de calentar y después de enfriar la muestra a 25 °C son todos muy parecidos, lo que indica que la estructura secundaria de la proteína P8 no se ve grandemente afectada en el intervalo de temperatura estudiado, ver Figura 19 (b). Sin embargo, a pH 7.0, y sobre todo a pH 10.0, se aprecia que al enfriar las muestras del fago no se recupera completamente la señal de elipticidad en 222 nm. Se puede observar que, a juzgar por los espectros de DC, no hay cambios significativos en la composición de la estructura secundaria lo que concuerda con el perfil de desnaturalización térmica del fago donde no se detectó ninguna transición conformacional.



**Figura 19:** (a) Desnaturalización térmica y (b) espectros de DC del fago M13 (0.01 mg/ml) a diferentes pH, de fago a pH 5.0 (amarillo), pH 7.0 (azul) y pH 10.0 (verde). En los espectros de DC la línea continua indica el espectro inicial a 25 °C, discontinua es el espectro a 85 °C y punteada después de enfriar la muestra.

### 3.2.3 Estudio de desnaturalización térmica en medios etanol-agua

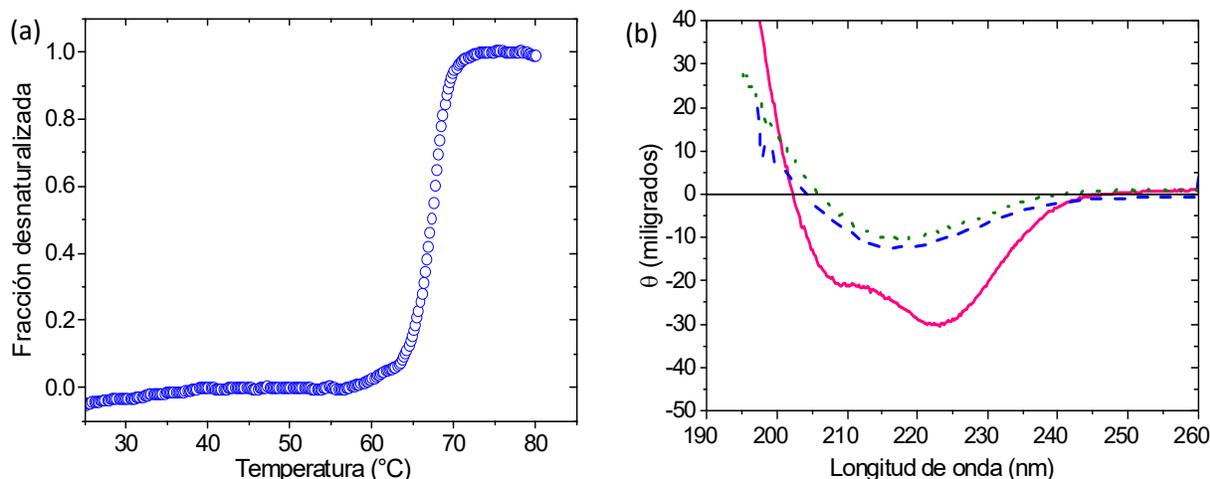
#### 3.2.3.1 Espectroscopía de dicroísmo circular

Como en los barridos térmicos del fago en soluciones amortiguadoras de diferente pH no se observaron indicios de cambios conformacionales importantes, se pensó entonces en modificar el medio para disminuir la estabilidad de la partícula basándonos en un estudio reportado por Olofsson *et al*<sup>28</sup>.

En la Figura 20 (a) se puede observar el perfil de desnaturalización térmica del fago M13, a una velocidad de barrido de 1 °C/min, en una solución etanol-agua al 30 % (V/V) amortiguada con fosfatos a pH 7.0. Se usó la ecuación 4 para calcular la fracción desnaturalizada del fago en función de la temperatura.

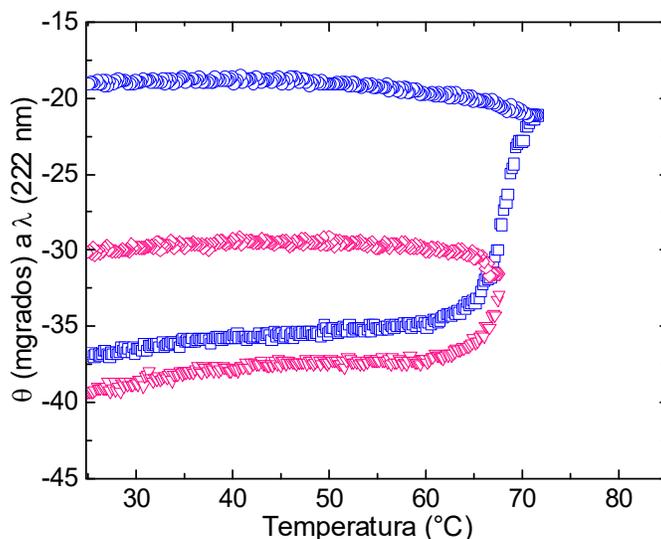
El perfil de desnaturalización tiene forma de una función sigmoide, lo que sugiere que el proceso de desnaturalización aparentemente ocurre en una sola etapa; la temperatura media se obtuvo derivando los datos para poder observar el punto de inflexión de la curva tipo sigmoide.

En la Figura 20 (b) se muestran los espectros de dicroísmo circular al inicio, a 80 °C y después de enfriar, de acuerdo a estos resultados, la proteína del fago parece perder la estructura secundaria tipo alfa-hélice al desnaturalizarse, formándose en su lugar una estructura tipo beta-laminar; después de enfriar la muestra está ya no recupera su estructura secundaria inicial.



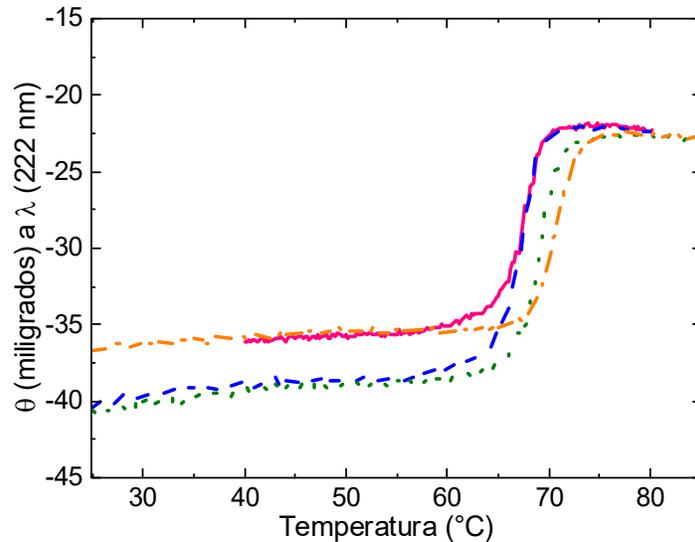
**Figura 20:** (a) Barrido térmico del fago M13 0.01 mg/mL en medio etanol-agua 30 % V/V amortiguada con fosfatos 15 mM, pH 7.0. (b) Espectros de dicroísmo del fago M13 0.01 mg/mL en etanol-agua 30 % amortiguado con fosfatos 15 mM, pH 7.0, donde la línea continua es el espectro obtenido a 25 °C (—), la línea punteada corresponde al espectro obtenido a 80 °C (---) y la línea punteada representa el espectro obtenido a 25 °C (···).

Considerando la posibilidad de que exista cierto grado de reversibilidad en la desnaturalización, se realizaron barridos térmicos parciales, esto es, se registró el cambio de estructura secundaria ( $\theta_{222}$ ) en el proceso de calentamiento y enfriamiento. Se calentó hasta 67.6 y 71.4 °C a 1 °C/min e inmediatamente se programó el enfriamiento a 1°C/min. En la Figura 21 se puede observar que el proceso es irreversible debido a que en ninguna de las dos condiciones la curva de enfriamiento indica recuperación de estructura secundaria inicial.



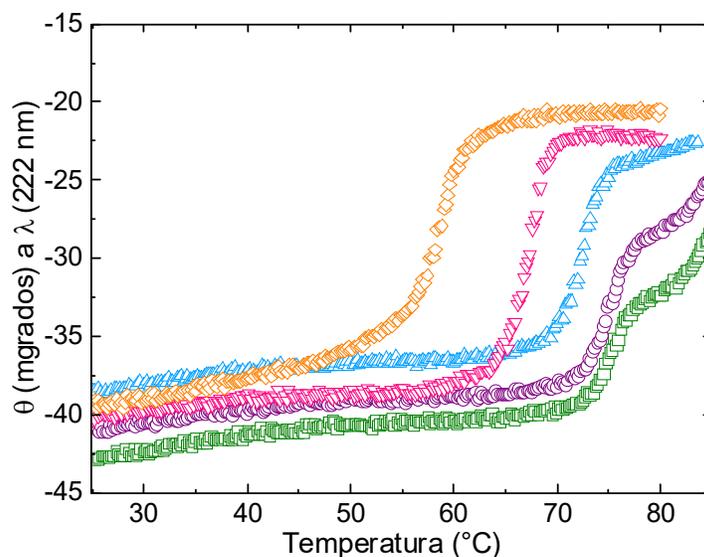
**Figura 21:** Barrido de calentamiento del fago M13 0.01 mg/mL en etanol-agua 30 % amortiguado con fosfatos 15 mM, pH 7.0, donde ( $\square$ ) representa la curva de calentamiento hasta 71.4 °C y ( $\circ$ ) la de enfriamiento, ( $\nabla$ ) representa el calentamiento hasta 67.6 °C ( $T_m$ ) y ( $\diamond$ ) representa el enfriamiento.

Se hicieron barridos de calentamiento a diferentes velocidades (0.5, 1, 2 y 4 °C/min) en un medio etanol-agua 30 %, amortiguado con fosfatos 15 mM, pH 7.0, ver Figura 22. Se puede observar en que la temperatura media tiene una alta dependencia con la velocidad de barrido, lo cual nos sugiere que el proceso de desnaturalización está controlado cinéticamente<sup>65</sup>.



**Figura 22:** Barrido de calentamiento del fago M13 0.01 mg/mL en etanol-agua 30 % amortiguado con fosfatos 15 mM, pH 7.0. Línea sólida (—), 0.5 °C/min; línea discontinua (---), 1 °C/min; línea punteada (···), 2 °C/min; línea discontinua con punto (— · —), 4 °C/min.

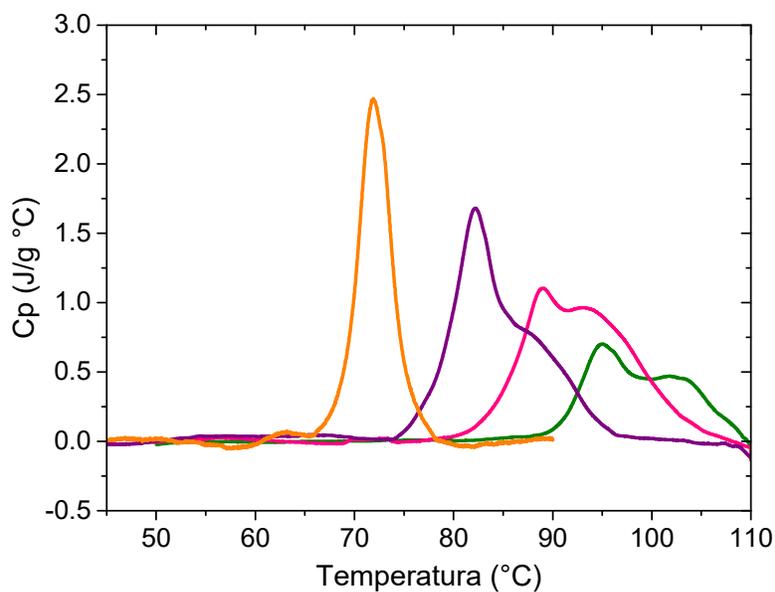
Se hizo el barrido de calentamiento con diferentes % (V/V) etanol-agua amortiguado a pH 7.0 con fosfatos 15 mM, para ver el efecto en la transición de desnaturalización. Se hizo el estudio a 50, 25, 22 y 20 % (V/V). En la Figura 23, se puede observar que a 20 y 22 % (V/V) etanol-agua la transición ocurre en dos etapas y a 25, 30 y 50 % ocurre en una sola etapa, mientras que la temperatura media disminuye al aumentar el % (V/V) etanol-agua. Lo anterior indica que al aumentar el % (V/V), se desestabiliza el fago y cambia el mecanismo de la desnaturalización. Sin embargo, debido a limitaciones técnicas del espectropolarímetro no fue posible registrar la parte final de las transiciones observadas en las menores concentraciones de etanol. Con el fin de tener una descripción completa del proceso de desnaturalización, se procedió entonces a usar la técnica de calorimetría diferencial de barrido.



**Figura 23:** Barridos térmicos del fago M13 0.01 mg/mL en amortiguador de fosfatos 15 mM, pH 7.00, con diferentes contenidos de etanol: 20 % V/V etanol ( $\square$ ), 22 % V/V etanol ( $\circ$ ), 25 % V/V etanol ( $\Delta$ ), 30 % V/V etanol ( $\nabla$ ) y 50 % V/V ( $\diamond$ ).

### 3.2.3.2 Calorimetría diferencial de barrido

En la Figura 24 se muestran los termogramas de DSC (i.e.,  $C_p$ , que es la capacidad calorífica por unidad de masa, vs temperatura) del fago M13 en diferentes mezclas de etanol-agua. Se puede observar que sin etanol el proceso de desnaturalización ocurre en al menos dos etapas, ya que se observan dos picos, siendo el primero el que está más definido. Al aumentar el % de etanol (V/V), los picos se van fusionando, lo que nos indica que a esas condiciones el proceso ocurre probablemente en una sola etapa (es decir, se vuelve más cooperativo); estos resultados concuerdan, en lo general, con los obtenidos mediante DC. La Tabla 7 contiene un resumen de los valores de temperatura media ( $T_m$ ), que es la temperatura a la cual la fracción desnaturalizada (determinada de acuerdo con la ecuación 5) tiene un valor igual a 0.5, determinados de las transiciones seguidas por DC. En dicha Tabla se presentan también los valores de  $T_{m\acute{a}x}$ , los cuales corresponden a los máximos de  $C_p$  en los termogramas de DSC.



**Figura 24:** Termogramas de DSC del fago M13 a diferentes % (V/V) etanol-agua, amortiguado a pH 7.0 con fosfatos 15 mM: 0 % V/V etanol (verde), 10 % V/V etanol (rosa), 20 % V/V etanol (morado) y 30 % V/V etanol (amarillo).

**Tabla 7:** Temperatura media obtenida por espectroscopía de dicroísmo circular y por calorimetría diferencial de barrido del fago M13 en diferentes % (V/V) etanol-agua, amortiguado a pH 7.0 con fosfatos 15 mM.

% (V/V) etanol-agua	DC	DSC	
	$T_m$ (°C)	$T_{máx1}$ (°C)	$T_{máx2}$ (°C)
0	--	95.06	101.88
10	--	89.06	93.09
20	--	82.22	87.78
25	72.6	--	--
30	67.6	71.92	--

El análisis de los termogramas se hizo considerando un proceso cinético secuencial de dos etapas irreversibles, de primer orden cada una como se muestra en el esquema 3.



Donde  $N$  representa el fago en estado nativo,  $I$  es un estado intermedio y  $D$  representa el fago desnaturalizado térmicamente. Las “constantes de velocidad” para la primera ( $N \rightarrow I$ ) y segunda reacción ( $I \rightarrow D$ ) se denotan como  $k_1$  y  $k_2$ , respectivamente. Para este modelo, los cambios en las fracciones de cada estado del fago ( $f_N$ ,  $f_I$  y  $f_D$ ) cambian con la temperatura de acuerdo con las ecuaciones siguientes<sup>65,66</sup>:

$$df_N/dT = -(1/v)k_1f_N \quad (6)$$

$$df_I/dT = (1/v)(k_1f_N - k_2f_I) \quad (7)$$

$$df_D/dT = -(1/v)k_2f_I \quad (8)$$

En estas ecuaciones  $v$  ( $^{\circ}C/s$ ) es la velocidad de barrido de temperatura con la cual se obtuvo el termograma; la dependencia de  $k_1$  y  $k_2$  con la temperatura está dada por una ecuación similar a la ecuación de Eyring (ecuación 9).

$$\ln\left(\frac{k_i}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S_i^{\ddagger}}{R} - \frac{\Delta H_i^{\ddagger}}{RT} \quad (9)$$

La variación con la temperatura de  $k_1$  y  $k_2$  depende de los valores de la entalpía de activación  $\Delta H_i^{\ddagger}$  respectivos; la entropía de activación  $\Delta S_i^{\ddagger}$  y el factor pre-exponencial  $\ln(k_B/h)$ .

Tanto  $\Delta H_i^{\ddagger}$  como  $\Delta S_i^{\ddagger}$  se consideran independientes de la temperatura,  $T$ . Si se determinan las funciones  $f_N, f_I$  y  $f_D$ , la "entalpía cumulativa",  $\langle \Delta H \rangle$ , y la función  $C_p$  (que se obtiene de los termogramas) quedan dadas como sigue<sup>67</sup>:

$$\langle \Delta H \rangle = f_I \Delta H_I - f_D \Delta H_D \quad (10)$$

$$C_p = (df_I/dT)\Delta H_I + (df_D/dT)\Delta H_D \quad (11)$$

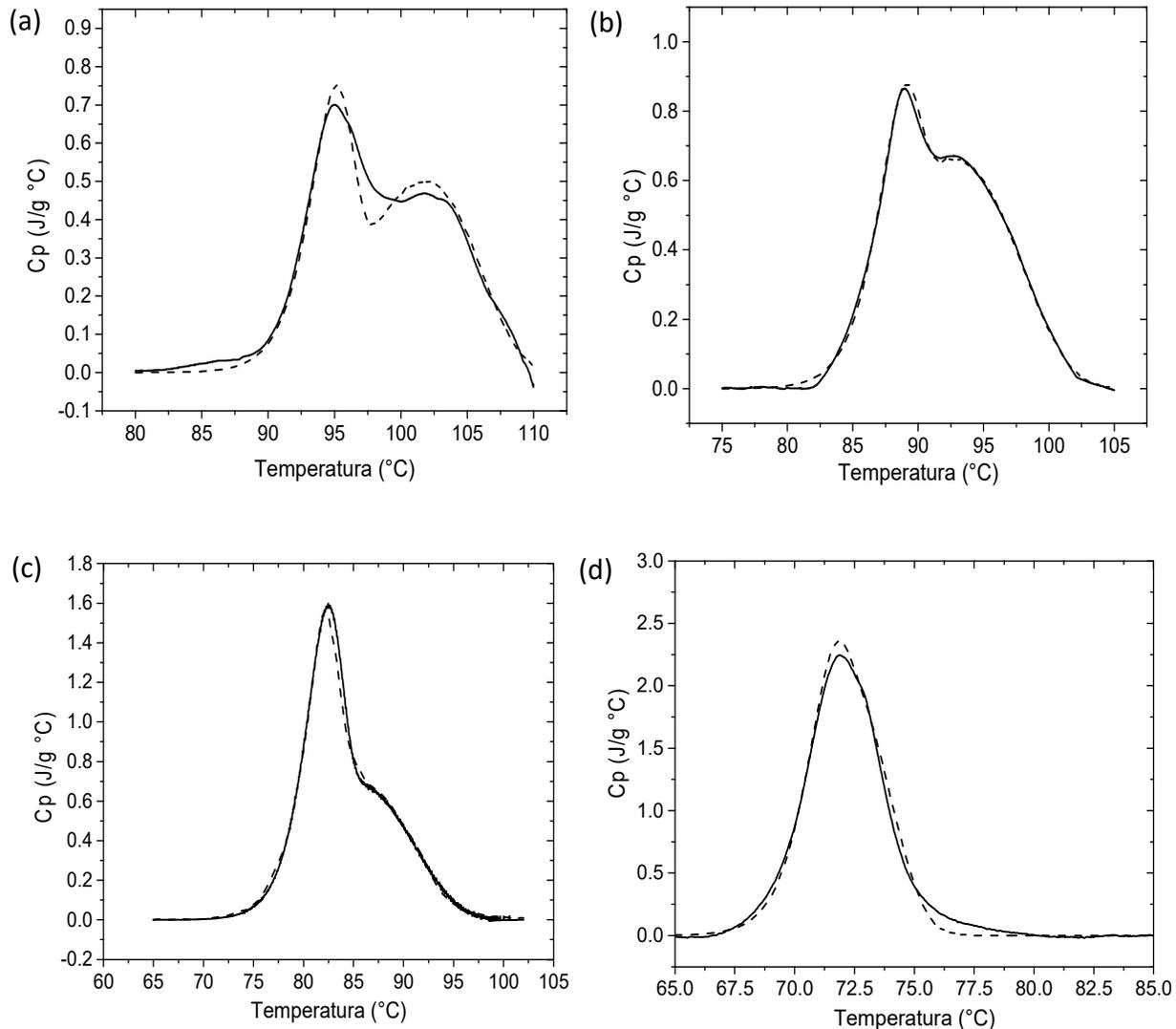
Donde  $\Delta H_I$  y  $\Delta H_D$  son los cambios de entalpía (independientes de la temperatura) para las etapas  $N \rightarrow I$  y  $N \rightarrow D$ , respectivamente; es decir, el valor de  $\Delta H_D$  es igual al cambio de entalpía total debido a la desnaturalización, y se obtiene por integración bajo la curva de  $C_p$ .

Los termogramas experimentales fueron analizados usando un método publicado recientemente el cual permite encontrar valores de los parámetros de activación ( $\Delta H_i^{\ddagger}/R$  y el término  $\ln(k_B/h) + \Delta S_i^{\ddagger}/R$ ), así como  $\Delta H_I$  y  $\Delta H_D$ <sup>68</sup>.

Los resultados del análisis se presentan en la Tabla 8, y los perfiles de  $C_p$  calculados a partir de dichos resultados se encuentran en las Figura 25.

**Tabla 8:** Parámetros determinados del perfil de capacidad calorífica a partir de un modelo secuencial de dos etapas. Donde  $a_i = \ln(k_B/h) + \Delta S_i^{\ddagger}/R$  y  $b_i = -(\Delta H_i^{\ddagger}/R)$ .

% Etanol	$a_1$	$10^{-3} \times b_1$	$\Delta H_I$ (J/g)	$a_2$	$10^{-3} \times b_2$	$\Delta H_D$ (J/g)
0	217.83 (0.11)	84.01 (0.04)	3.16	69.72 (0.20)	30.47 (0.07)	7.86
10	205.70 (0.40)	78.16 (0.14)	2.33	52.86 (0.09)	23.63 (0.03)	8.88
20	181.34 (0.52)	68.17 (0.18)	5.93	40.90 (0.09)	18.90 (0.03)	12.76
30	349.89 (0.86)	123.86 (0.29)	2.29	138.10 (0.73)	51.35 (0.25)	8.95



**Figura 25:** Termogramas de DSC del fago M13 en amortiguador de fosfatos 15 mM, pH 7.0, con diferentes contenidos de etanol: 0 % V/V etanol (a), 10 % V/V etanol (b), 20 % V/V etanol (c) y 30 % V/V etanol (d). La línea continua representa el termograma determinado experimentalmente y la línea discontinua representa la curva construida de acuerdo con la ecuación 11 y empleando el método reportado por Hernández-Arana et al.<sup>68</sup>.

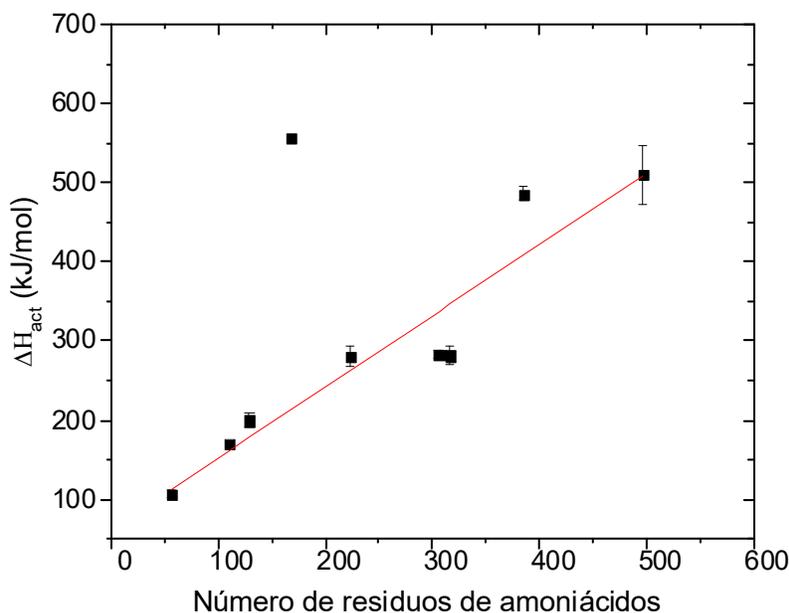
Observando las figuras mencionadas, puede decirse que el modelo secuencial se ajusta adecuadamente a los datos experimentales de la desnaturalización del fago en presencia de etanol, pero no en ausencia del mismo. En este último caso el proceso podría ser más complejo que un mecanismo de dos etapas.

Por otra parte, los resultados de la Tabla 8 indican que el cambio total de entalpía ( $\Delta H_D$ ) no se ve afectado de manera importante por el etanol. Como la proteína P8 es, con mucho, la más abundante en el fago, es posible entonces calcular el cambio de entalpía molar que correspondería a la proteína P8 (cuya masa molecular es igual a 5,200 Da<sup>20</sup>) y a un residuo promedio de aminoácido de la misma (50 residuos en cada unidad de P8). El valor que se obtiene

por mol de residuo está entre 0.8 y 0.9 kJ/mol, el cual es tres o cuatro veces menor que el valor determinado para proteínas globulares (2.9 – 3.2 kJ/mol residuo)<sup>69</sup>.

Lo anterior parece indicar que la P8 en el fago se desnatura parcialmente, en concordancia con la propuesta de que la desnaturalización está acompañada de un cambio de estructura alfa-hélice a una estructura típica de segmentos  $\beta$ , ver Figura 20 (b).

Otro aspecto importante de los resultados se refiere a las magnitudes de las entalpías de activación en relación con la cooperatividad de la desnaturalización a nivel molecular. Es razonable considerar que mientras mayor sea el número de interacciones (puentes de hidrógeno, van der Waals, etc.) que se deben romper o debilitar para alcanzar el estado de transición, mayor será el valor de la entalpía de activación. Esta expectativa se cumple, de forma aproximada, para el desplegamiento y desnaturalización de proteínas globulares, según puede observarse en la Figura 26. De acuerdo a los datos de esta figura y a los valores de  $\Delta H_1^\ddagger$  y  $\Delta H_2^\ddagger$  (Tabla 8), una estimación del número de residuos que constituyen una unidad cooperativa en las etapas 1 y 2 (en 30 % de etanol) sería de 1073 y 404, respectivamente, lo anterior equivale a decir que cerca de 21 unidades de la proteína P8 se desnaturalizan cooperativamente en la etapa  $N \rightarrow I$ , y aproximadamente 8 unidades en la etapa  $I \rightarrow D$ . En contraste, en ausencia de etanol los resultados indicarían unas 14 unidades de P8 como unidad cooperativa en primera etapa, y aproximadamente 4 unidades en la segunda etapa. Los resultados anteriores permiten entonces plantear que un estudio más detallado de la desnaturalización térmica del fago mediante DSC conduciría a proponer un modelo del proceso en términos de estructura de la partícula.

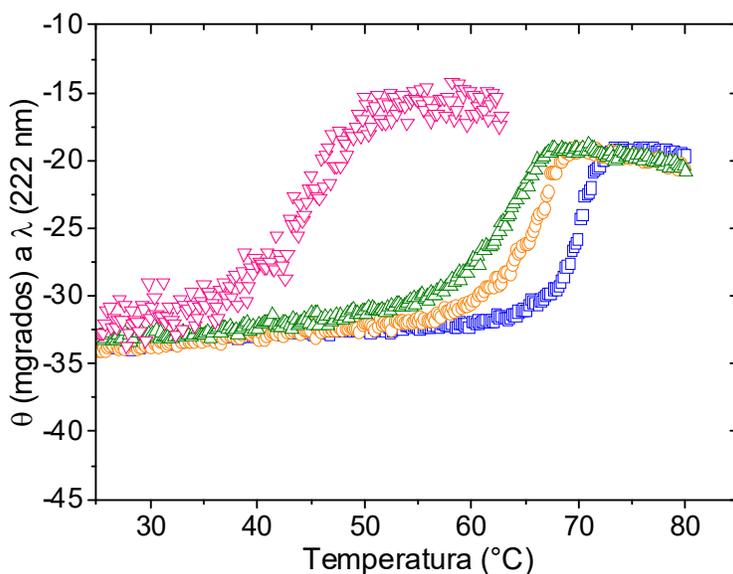


**Figura 26:** Curva de entalpía de activación ( $\Delta H_i^\ddagger$ ) en función del número de residuos de aminoácidos construida con datos reportados de diferentes proteínas globulares. La recta que se ajusta a los datos es  $\Delta H^\ddagger = 61.989x + 0.902$  con un  $R^2 = 0.903$ <sup>65,70</sup>.

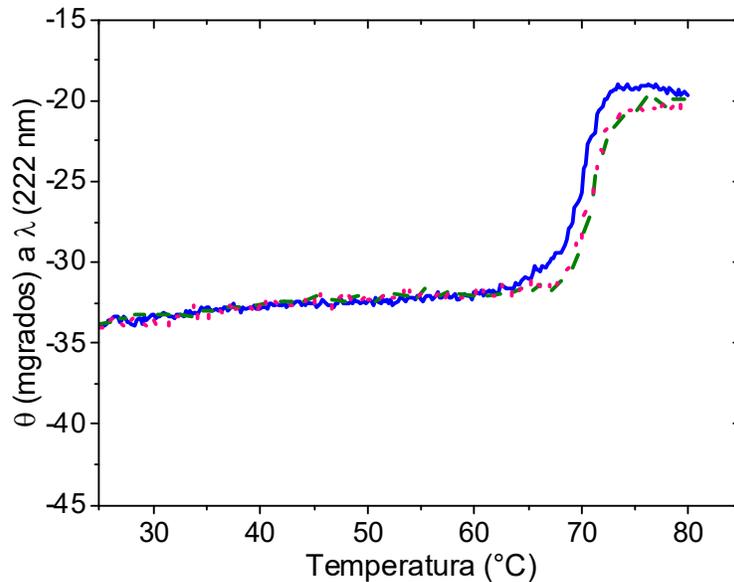
### 3.2.4 Efecto de algunos iones en la estabilidad térmica del fago M13

Los resultados obtenidos en el estudio de la desnaturalización térmica del fago fueron alentadores para proponer un método de estudiar la interacción de ciertos iones con la partícula viral. Este método consiste en determinar el efecto de los iones en la estabilidad térmica del fago, siguiendo el proceso de desnaturalización por medio de DC o DSC.

En este trabajo se hizo un estudio preliminar usando la técnica de DC para monitorizar la transición térmica del fago en presencia de compuestos iónicos (en un medio que contenía etanol al 30 %). Se eligió esta técnica por ser más sencilla de aplicar y porque se requiere menor cantidad de muestra. En la Figura 27 puede observarse que conforme aumenta la relación  $[Ag^+NO_3^-]/[residuo\ medio]$  las transiciones del fago se desplazan a temperaturas considerablemente menores y se vuelven menos cooperativas (a juzgar por el intervalo de temperatura en el que ocurre la transición). En comparación, la presencia de  $Na^+NO_3^-$  tiene un efecto mucho menor tanto en la  $T_m$  como en la cooperatividad de la transición (Figura 28).



**Figura 27:** Barridos térmicos a 1 °C/min del fago M13 0.01 mg/mL en medio agua-etanol al 30 % (V/V) en presencia de iones plata con diferentes relaciones molares donde (□) representa una relación molar  $R = 0$  con pH 7.37, (○)  $R = 0.5$ , pH 7.89, (△)  $R = 1.0$ , pH 7.53 y (▽)  $R = 5.0$ , pH 6.70.



**Figura 28:** Barridos térmicos a 1 °C/min del fago M13 (0.01 mg/mL) en medio agua-etanol al 30 % (V/V) en presencia de iones sodio, donde (—) representa una relación molar  $R = 0$  con un pH 7.37, (---)  $R = 1.0$ , pH 8.46 y (···)  $R = 2.0$ , pH 7.54.

De reconocerse que el pH aparente de las soluciones puede tener cierta influencia en los resultados mostrados en las figuras anteriores, ya que esta variable no fue controlada completamente. Sin embargo, es evidente que el tipo de sustancia iónica presente tiene el efecto más importante en las características observadas en las transiciones térmicas. Específicamente, puede señalarse que el catión  $Ag^+$  desestabiliza significativamente la partícula viral, mientras que el catión  $Na^+$  tiene muy poco efecto en la estabilidad. En efecto, tanto  $Na^+$  como  $NO_3^-$  ocupan posiciones medias en la serie de Hofmeister, lo que significa que no afectan significativamente ni la solubilidad ni la estabilidad de las proteínas<sup>71,72</sup>. En cambio, se sabe que el ion  $Ag^+$  tiene gran afinidad por varios tipos de cadenas laterales de aminoácidos y por ácido nucleicos<sup>73</sup>. Entonces nuestros resultados pueden explicarse proponiendo que al formarse el estado de transición en la reacción de desnaturalización algunos residuos de aminoácidos y porciones de la hebra de ADN son “expuestos” al solvente, lo que permitiría su interacción con el ion  $Ag^+$ . Esto ocasionaría una estabilidad del estado de transición con respecto al estado nativo del fago y, por lo tanto, una disminución de la barrera de activación y un aumento de la constante de velocidad.

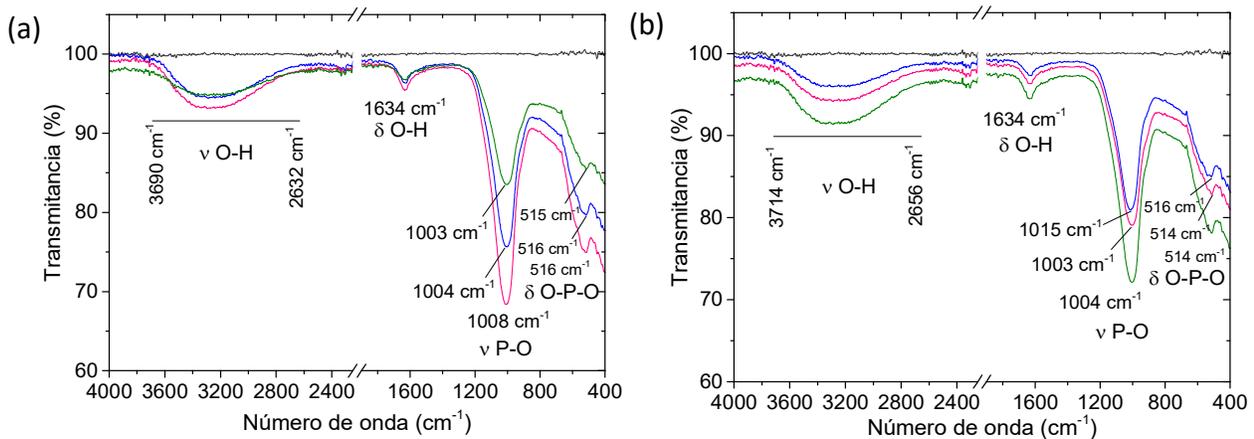
### 3.3 Síntesis y caracterización del FePO<sub>4</sub>

#### 3.3.1 Caracterización del FePO<sub>4</sub> sintetizado

##### 3.3.1.1 Espectroscopía infrarroja FTIR-ATR.

En todas las síntesis se obtuvo un polvo de color amarillo. En la Figura 29 se muestran los espectros de infrarrojo del material obtenido con los diferentes péptidos (plantilla) y para efectos de comparación también se muestra el espectro del control (reacción sin péptido). Se puede observar que los espectros son muy similares, sólo distinguibles en la intensidad de las bandas. Es importante notar que en ningún caso se observan las bandas típicas de péptidos<sup>45,74</sup>. La banda amplia alrededor de 3260 cm<sup>-1</sup> corresponde a la vibración de estiramiento del enlace O-H del agua, la banda en 1634 cm<sup>-1</sup> corresponde a la flexión del enlace O-H-O, lo que indica que el material contiene moléculas de agua absorbidas en la superficie.

La banda estrecha alrededor de 1004 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento del enlace P-O y esta banda sufre un ligero corrimiento (4 a 11 cm<sup>-1</sup> en función de las condiciones de reacción) en presencia de jho1, sin embargo, todas las bandas corresponden a vibraciones de material amorfo. Finalmente, la banda a 516 cm<sup>-1</sup> corresponde a la flexión del enlace O-P-O.

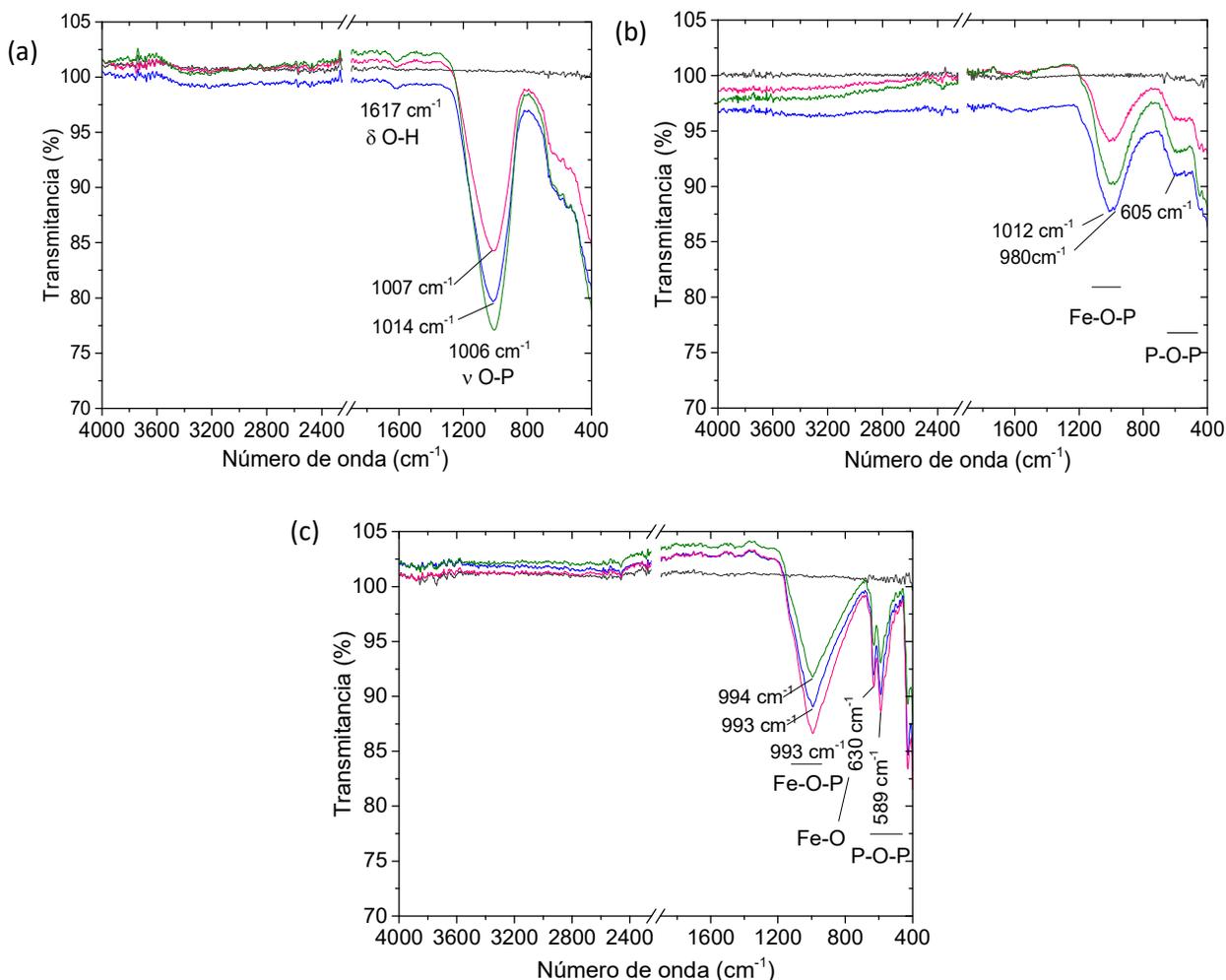


**Figura 29:** Espectros de infrarrojo del FePO<sub>4</sub> obtenido y secado a 37 °C. En la Figura (a) se muestra el material sintetizado con la relación molar 1/10/10 y (b) 1/100/100. Código de colores: sintetizado con la plantilla jho1 (rosa), jho2 (verde) y control (azul).

Debido a la falta de cristalinidad del material, se eligieron las muestras sintetizadas con la relación molar 1/100/100 y se calcinaron a diferentes temperaturas. En la Figura 30 (a) se muestran los espectros de infrarrojo de las muestras calcinadas a 400 °C, en los cuales se observa que las bandas alrededor de 1006 cm<sup>-1</sup> se hacen más amplias e intensas, lo que indica un reordenamiento debido a la pérdida de moléculas de agua fisisorbidas, lo que concuerda con el desvanecimiento de las bandas a 3260 cm<sup>-1</sup> y 1634 cm<sup>-1</sup>. Este resultado confirma que el porcentaje de masa perdido observado hasta 400 °C por TGA, corresponde a la pérdida de moléculas de agua y grupos hidroxilo, como se discutirá más adelante.

Al calcinar la muestra a 600 °C, Figura 30 (b), se puede observar que la banda que corresponde al estiramiento del enlace P–O disminuye en intensidad y se desplaza a 1012 cm<sup>-1</sup>, característico de la vibración de estiramiento del grupo Fe–O–P. La disminución en la intensidad podría atribuirse a la pérdida de los grupos sulfato remanentes del precursor. Se observa claramente la aparición de una banda a 605 cm<sup>-1</sup>, que corresponde a la flexión del enlace O–P–O<sup>75,76</sup>.

El espectro de infrarrojo de la Figura 30 (c) corresponde a las muestras calcinadas a 830 °C, en general se observa que las bandas se definen mejor y son más agudas, esto ocurre debido a la transición de FePO<sub>4</sub> amorfo a su forma cristalina. Las bandas a 589, 630 y 933 cm<sup>-1</sup> corresponden a la flexión del grupo O–P–O, el estiramiento del enlace Fe–O y la flexión del grupo Fe–O–P respectivamente, las cuales son características del FePO<sub>4</sub> cristalino<sup>77,78</sup>.

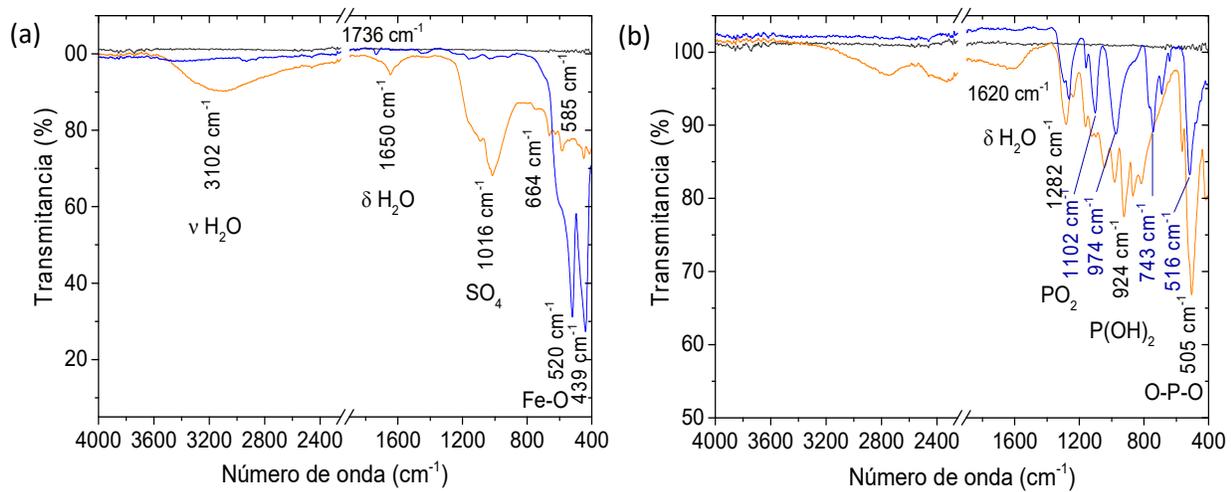


**Figura 30:** Espectros de IR del FePO<sub>4</sub> sintetizado con la relación molar 1/100/100. Plantilla jho1 (rosa), jho2 (verde), control (azul). En (a) se muestra el material calcinado a 400 °C durante 3 horas, (b) calcinado a 600 °C durante 4 horas y (c) calcinado a 830 °C.

Se hizo un estudio preliminar de los precursores antes y después de ser calcinados a 700 °C. En la Figura 31 se muestran los espectros de IR, en la primera se muestra el espectro del Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> antes de calcinar se puede observar la banda a 1016 cm<sup>-1</sup> característica del grupo sulfato y las bandas a

3102 y 1650  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a las moléculas de agua fisisorbidas. Después de calcinar, estas bandas desaparecen debido a la pérdida de moléculas de agua y a la descomposición del compuesto para formar la especie  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  debido a que en el espectro aparecen dos bandas a 520 y 439  $\text{cm}^{-1}$  características del estiramiento del enlace Fe–O. Esto indica que el grupo sulfato no es estable a 700  $^\circ\text{C}$ <sup>79</sup>.

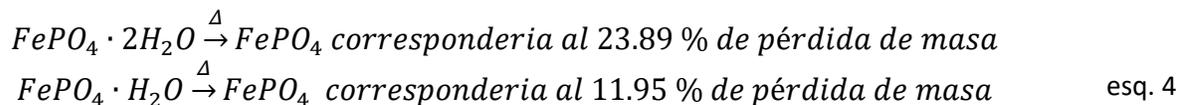
En la Figura 31 (b) se muestra el espectro de IR del  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , antes de calcinar se observan las diferentes bandas en el intervalo de 500 a 1300  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a los diferentes tipos de enlace P–O. Después de calcinar la muestra a 700  $^\circ\text{C}$  se puede observar que algunas bandas sufren corrimiento lo que nos indica la formación de nuevos enlaces correspondientes a la formación del meta fosfato de sodio, ver esquema 5. Este indica que los grupos fosfato son estables al menos hasta 700  $^\circ\text{C}$ <sup>80</sup>.

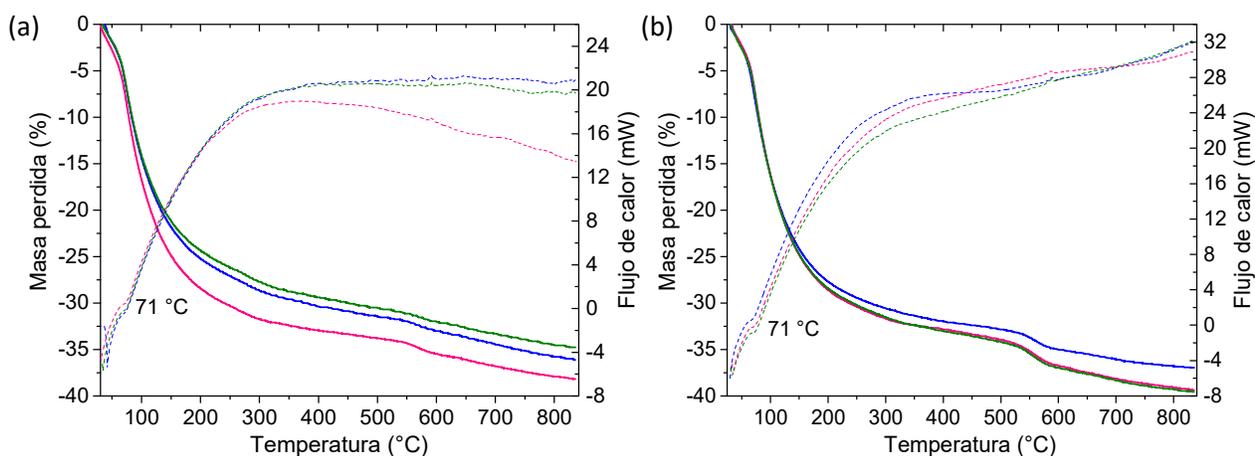


**Figura 31:** Espectros de IR del  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  antes (naranja) y después de calcinar (azul) a 700  $^\circ\text{C}$  y (b) Espectros de IR del  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  antes (naranja) y después de calcinar (azul) a 700  $^\circ\text{C}$ .

### 3.3.1.2 Análisis termogravimétrico y análisis térmico diferencial (TG/DTA)

En la Figura 32 se observan las curvas de porcentaje de masa perdida y las curvas de flujo de calor de los sólidos obtenidos con las diferentes relaciones molares y plantillas. Las curvas presentan un comportamiento similar en presencia o ausencia de péptidos. De acuerdo a lo reportado por Saccia *et al.*<sup>81</sup> el porcentaje de masa perdida entre 25–130  $^\circ\text{C}$  y el pico endotérmico a 71  $^\circ\text{C}$  se debe a la desorción de dos moléculas de agua enlazada físicamente, ver esquema 4 y Tabla 9. El porcentaje de masa perdida entre 130–400  $^\circ\text{C}$  corresponde a la pérdida de grupos hidroxilos presentes en la superficie del material<sup>82</sup>.



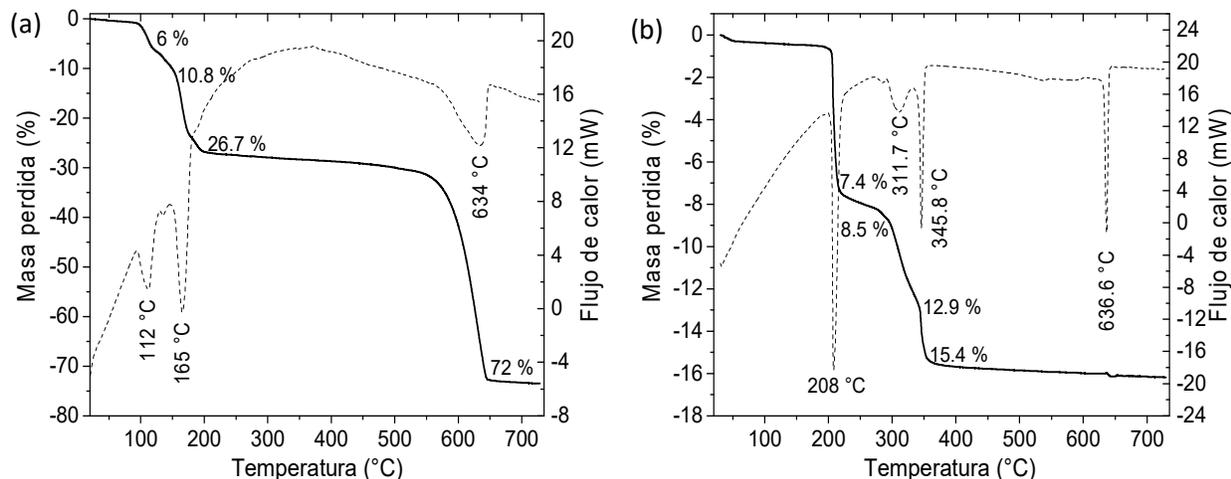


**Figura 32:** Curvas de TG (línea continua) y DTA (línea discontinua) del  $\text{FePO}_4$  sintetizado con la plantilla jho1 (rosa), jho2 (verde) y el control (azul). En (a) se muestran los termogramas de  $\text{FePO}_4$  sintetizado con la relación molar 1/10/10 y (b) con la relación molar 1/100/100.

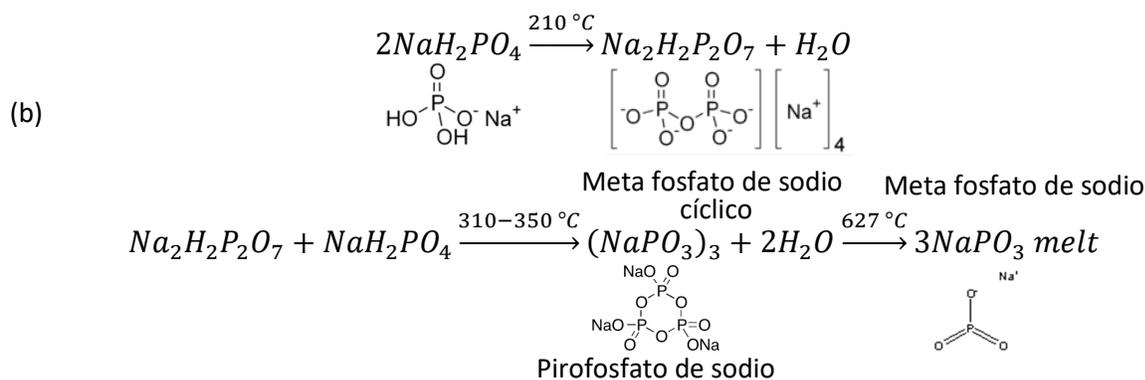
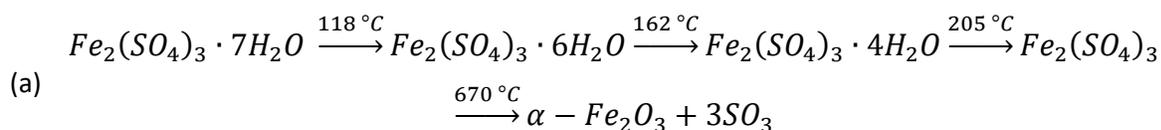
**Tabla 9:** Porcentaje de pérdida de masa medido en tres diferentes intervalos de temperatura para cada una de las muestras sintetizadas.

Relación molar	1/10/10			1/100/100			
	Temperatura (°C)	25-130	130-400	500-700	25-130	130-400	500-700
control		19.57	10.79	2.99	21.81	10.17	3.25
jho1		22.48	10.42	3.02	22.26	10.60	4.20
jho2		19.05	10.33	2.79	22.22	10.79	4.19

A altas temperaturas entre 500 – 700 °C se observa una pérdida de masa, ver Tabla 9, asociada a la descomposición del sulfato remanente del precursor de hierro empleado en la síntesis. Este resultado concuerda con el estudio preliminar de los precursores que se muestra en la Figura 33 (a). El termograma del  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  muestra una pérdida de masa del 43 % en peso que inicia alrededor de 500 °C hasta 650 °C, que está asociado a la pérdida de los grupos sulfato y la formación de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  de acuerdo con los espectros de infrarrojo<sup>79</sup>. En contraste el perfil térmico observado para el  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  muestra que en ese intervalo de temperatura ya no hay pérdida de masa, ver Figura 33 (b)<sup>80</sup>. Para ambos precursores a temperaturas menores se observa que la cantidad de masa pérdida está asociada a la liberación de moléculas de agua, de acuerdo con el esquema 5.



**Figura 33:** Análisis termogravimétrico (TG/DTA) de los precursores (a)  $Fe_2(SO_4)_3$  y (b)  $NaH_2PO_4$ .



Esquema de descomposición térmica: (a)  $Fe_2(SO_4)_3$  y (b)  $NaH_2PO_4$  esq. 5

Finalmente, el análisis térmico diferencial de todas las muestras (con y sin péptido) mostró un pico exotérmico alrededor de 590 °C, ver Tabla 10, debido a que no se observó un cambio de masa este pico indicaría la transición de amorfo a cristalino en concordancia con los resultados de infrarrojo<sup>81</sup>.

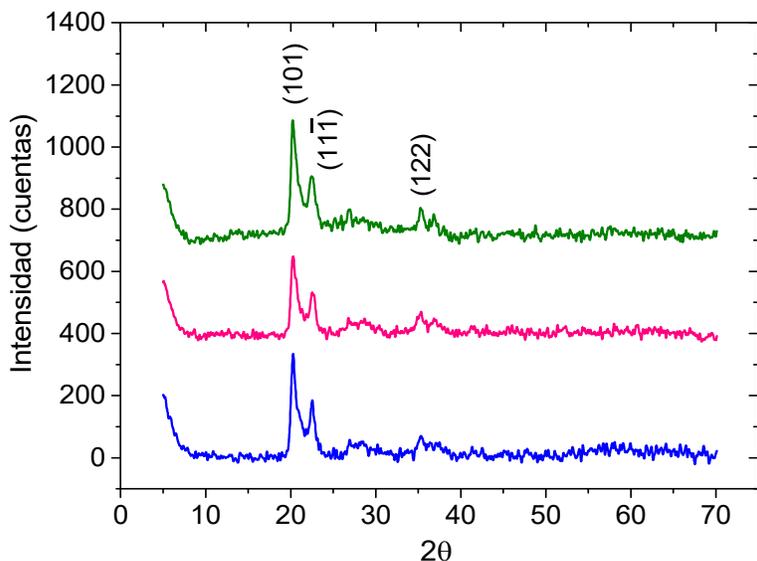
**Tabla 10:** Temperatura donde aparece el pico exotérmico observado en las curvas de DTA.

Relación molar	Temperatura °C	
	1/10/10	1/100/100
control	591	588
jho1	592	587
jho2	593	587

En base a estos resultados se decidió calcinar el material obtenido a 200, 400 y 600 °C para poder caracterizar los cambios estructurales del material.

### 3.3.1.3 Difracción de rayos X de polvos

Las muestras resultantes de las reacciones con relación molar 1/100/100 fueron analizadas por DRX. Las muestras tratadas a 400 °C no mostraron ninguna reflexión. Las reflexiones aparecieron en las muestras calcinadas a 600 °C. En la Figura 34 se observan señales a 20.3, 22.5 y 35.3 en  $2\theta$  que corresponden a los planos (101), (11 $\bar{1}$ ) y (122) de la estructura cristalina tipo monoclinica de FePO<sub>4</sub> (PDF Card No 00-056-0140). Este resultado confirma que el pico exotérmico observado en las curvas de DTA, se debe a una transición de fase. Este comportamiento es similar con ambos péptidos.



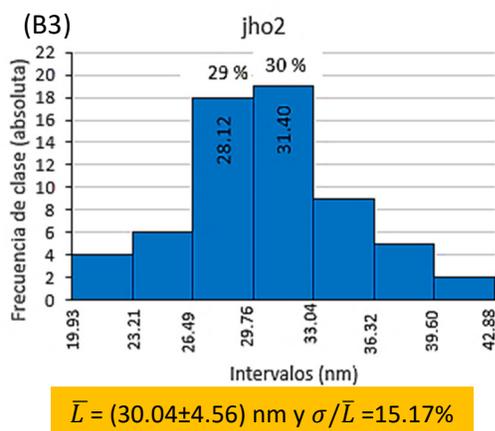
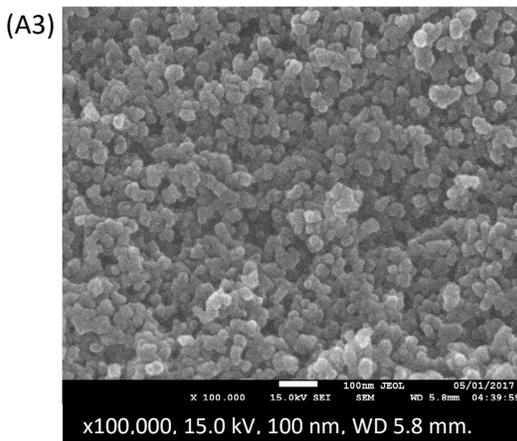
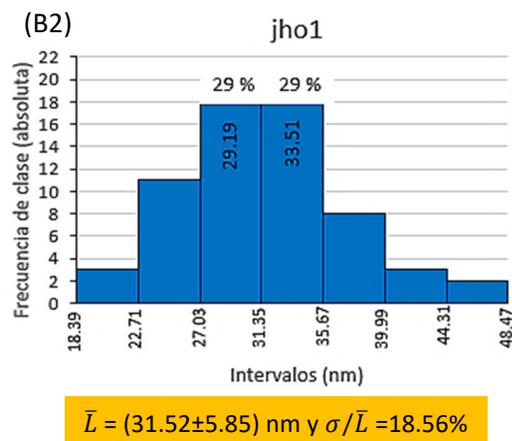
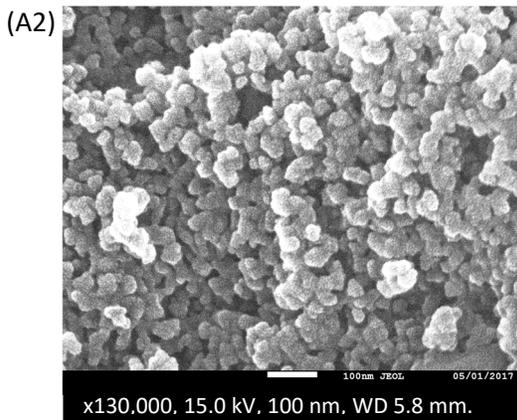
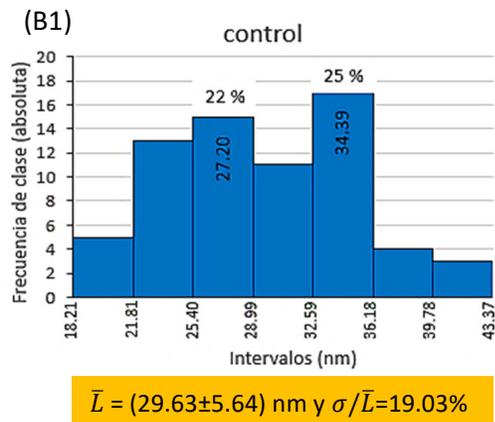
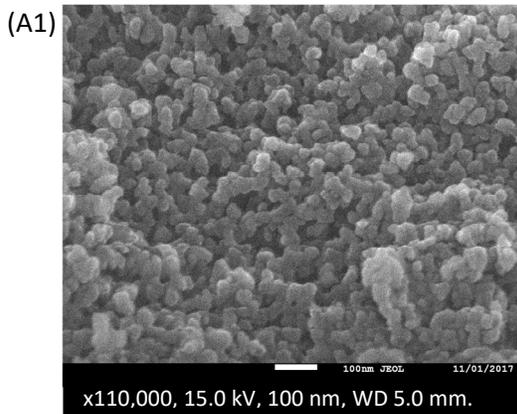
**Figura 34:** Diffractogramas del FePO<sub>4</sub> sintetizado con la relación molar 1/100/100 y calcinado a 600 °C durante 4 horas. La síntesis se realizó con el péptido jho1 (rosa), péptido jho2 (verde) y control (azul).

### 3.3.1.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM), muestras tratadas a 37 °C

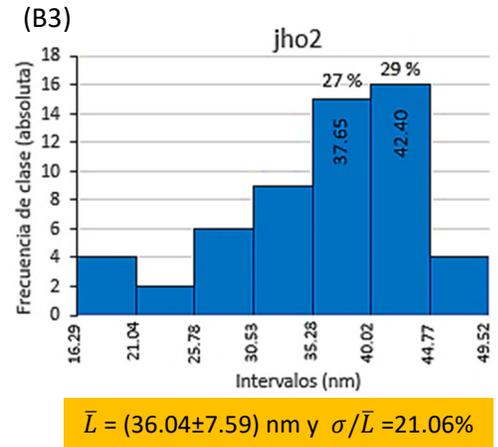
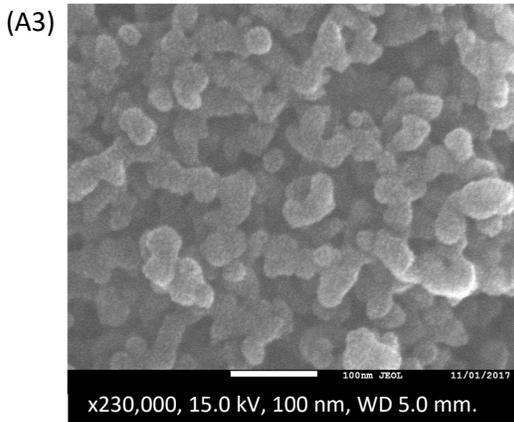
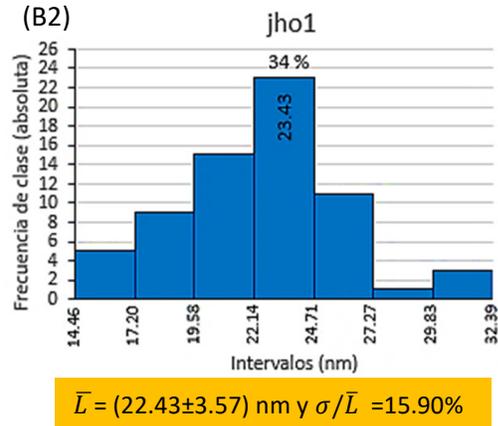
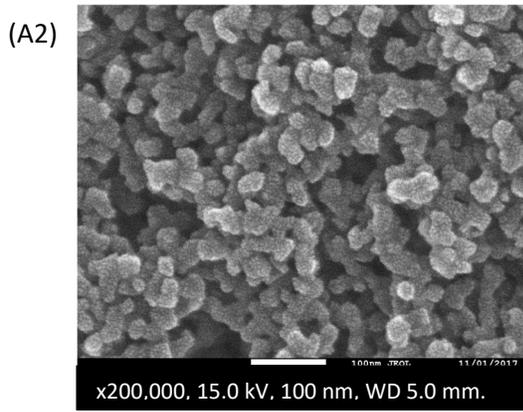
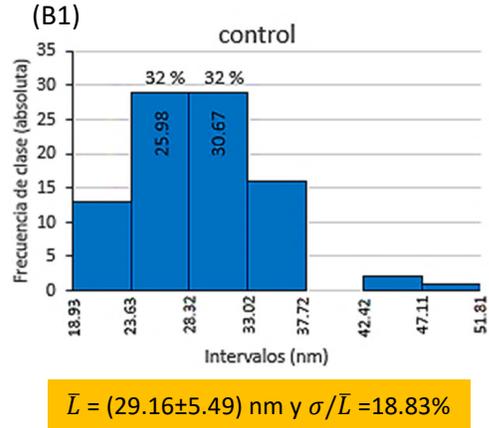
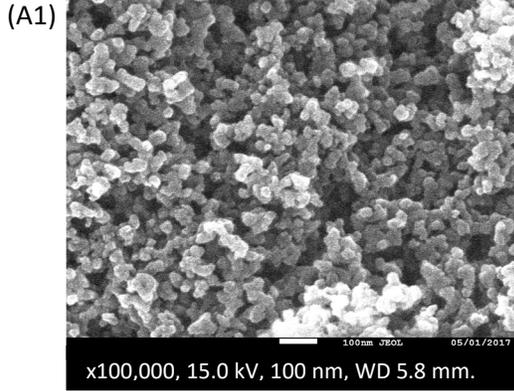
La morfología y el tamaño de partícula se determinaron mediante SEM. En la Figura 35 se muestra que el material obtenido con la relación molar 1/10/10 produce NPs esféricas. Sin embargo, en presencia del péptido jho2, la distribución del tamaño de partícula es ligeramente más estrecha respecto a las otras muestras (se ajusta mejor a una distribución gaussiana), con un tamaño de partícula promedio de  $(30.04 \pm 4.56 \text{ nm})$  y una dispersión del 15.17 % (ver Figura 35, B3), esto nos indica que la presencia del péptido podría mejorar la homogeneidad de la distribución de tamaño de partícula en comparación con la plantilla jho1 (18.56 %) y el control (19.03 %).

En la Figura 36 se puede observar que las NPs obtenidas con la relación molar 1/100/100 tienen una morfología esférica y están ligeramente aglomeradas. La síntesis hecha con la plantilla jho1 muestra la distribución de tamaño de partícula más estrecha con un tamaño de partícula promedio de  $(22.43 \pm 3.57) \text{ nm}$  y una dispersión del 15.90 %, respecto a la síntesis con la plantilla jho2 (21.06) y el control (18.83 %), ver Figura 36, B2. Estos resultados coinciden con los reportados previamente por Boonchom *et al.*, pero a diferencia de ellos las partículas aquí obtenidas presentan un intervalo más estrecho de tamaño de partícula<sup>83</sup>.

En base a estos resultados podemos observar que la plantilla modifica el tamaño de partícula dependiendo de la relación molar empleada en la síntesis y mejora la homogeneidad de la muestra.



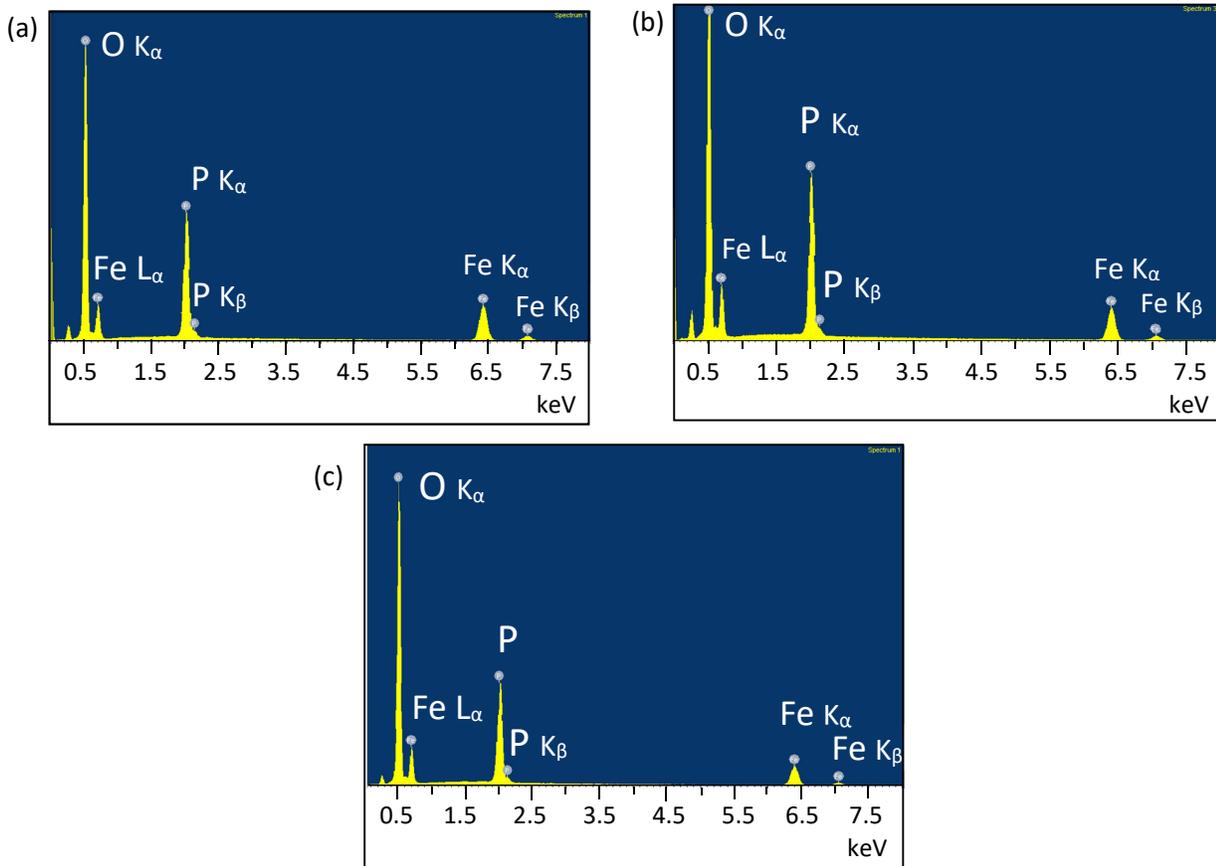
**Figura 35:** Las Figuras tipo A corresponden a las micrografías de SEM y las figuras tipo B corresponden a la distribución de tamaño de partícula de las muestras obtenidas con la relación molar 1/10/10 sin calcinar, donde L representa longitud de la partícula. El número de la figura indican con que plantilla se sintetizaron (1) corresponde al control, (2) con la plantilla jho1 y (3) jho2.



**Figura 36:** Las Figuras tipo A corresponden a las micrografías de SEM y las figuras tipo B corresponden a la distribución de tamaño de partícula de las muestras obtenidas con la relación molar 1/100/100 sin calcinar, donde  $L$  representa la longitud de la partícula. El número de la figura indican con que plantilla se sintetizaron (1) corresponde al control, (2) a la plantilla jho1 y (3) jho2.

### 3.3.1.5 Espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (EDS), muestras calcinadas a 600 °C

En la Figura 37 se muestran los espectros de EDS donde podemos observar la composición química local del material sintetizado. Los resultados cuantitativos se presentan en la Tabla 11. Los espectros nos indican que nuestro material principalmente contiene hierro (Fe), fósforo (P) y oxígeno (O). De esta forma podemos confirmar la presencia de los elementos que componen el  $\text{FePO}_4$ <sup>84</sup>.



**Figura 37:** Espectros de EDS de las muestras calcinadas a 600 °C durante 4 horas, sintetizadas con la relación molar 1/100/100, (a) control, (b) jho1 y (c) jho2.

**Tabla 11:** Datos obtenidos del espectro de EDS de la Figura 37, (a) porcentaje en masa y (b) porcentaje atómico de los elementos presentes en la muestra. Los datos mostrados corresponden al valor promedio de dos mediciones.

(a)	% masa		
	Fe	P	O
control	27.16 ± 2.73	16.64 ± 1.12	56.22 ± 3.83
jho1	27.49 ± 9.03	18.10 ± 1.03	54.43 ± 10.06
jho2	19.85 ± 0.11	16.97 ± 0.01	63.19 ± 0.08

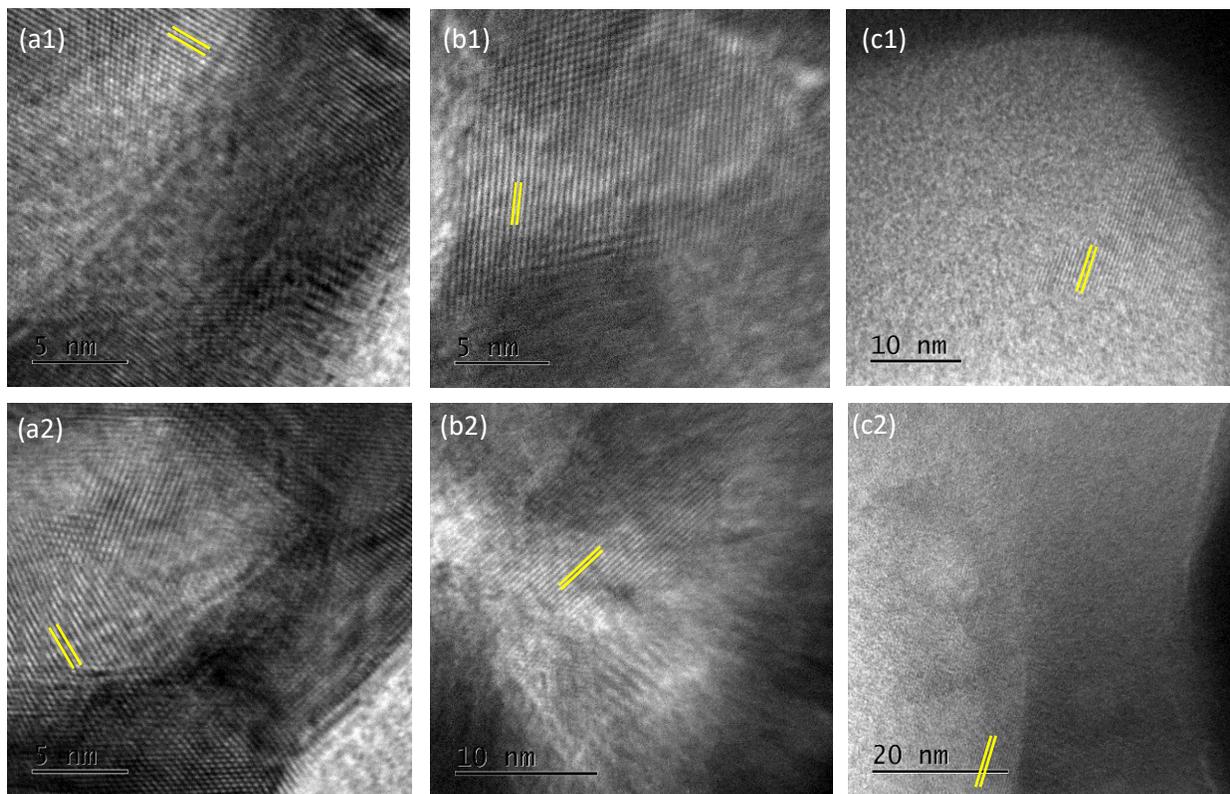
(b)

	% atómico		
	Fe	P	O
control	10.74 ± 1.44	11.86 ± 1.20	77.41 ± 2.64
jho1	11.22 ± 4.70	13.14 ± 2.01	75.65 ± 6.71
jho2	7.320 ± 0.042	11.29 ± 0.00	81.390 ± 0.042

### 3.3.1.6 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En la Figura 38 se pueden observar las imágenes de TEM de alta resolución de las muestras sintetizadas con la relación molar 1/100/100 y calcinadas a 600 °C. Las muestras no son totalmente cristalinas, se pueden observar zonas amorfas, lo cual concuerda con los resultados de difracción de rayos-X. En la Tabla 12 se muestran las distancias interplanares con su respectivo error relativo porcentual medidas con el programa ImageJ y la asignación de los índices de Miller correspondientes a la estructura cristalina tipo monoclinica. Estas distancias encontradas son el resultado de haber medido entre 4-5 imágenes por cada muestra.

La muestra sintetizada con el péptido jho2 muestra distancias interplanares más grandes a comparación de la muestra control y con el péptido jho1. De acuerdo con el difractograma de rayos-X del péptido jho2 es el más definido, por lo que este péptido podría estar modificando la cristalinidad de los cristales de FePO<sub>4</sub>.



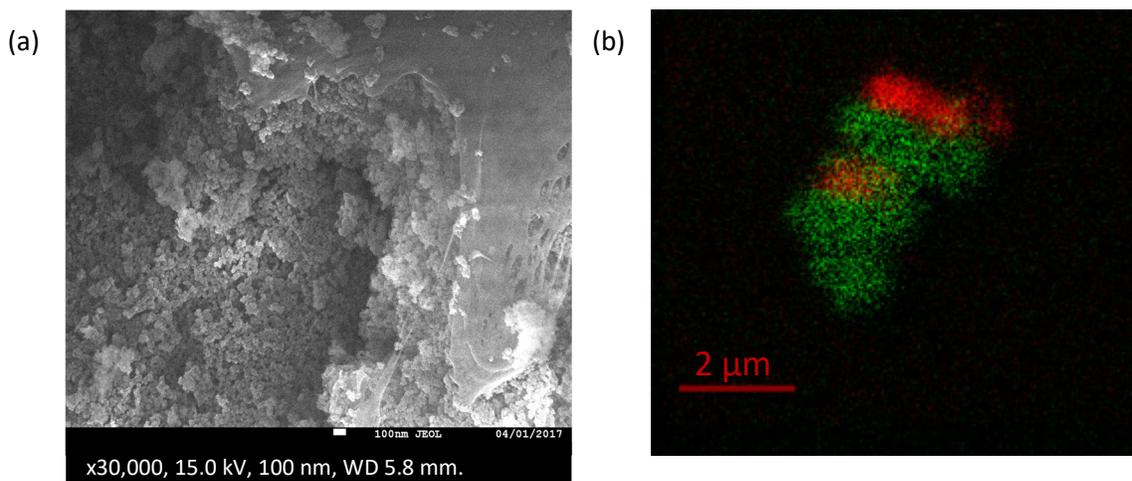
**Figura 38:** Imágenes de TEM de alta resolución de las muestras calcinadas a 600 °C y sintetizadas con la relación molar 1/100/100, (a) se muestra el control, (b) empleando la plantilla jho1 y (c) jho2. Por cada muestra se muestran dos imágenes.

**Tabla 12:** Distancias interplanares medidas y sus correspondientes índices de Miller.

Muestra	Imagen	Distancia Interplanar medida (Å)	Distancia interplanar reportada (Å)	Error relativo %	Índices de Miller
control	a1	3.398 ± 0.029	3.38916	0.261	0 2 1
	a2	3.461 ± 0.019	3.53206	-2.012	0 1 2
jho1	b1	3.334 ± 0.022	3.38916	-1.628	0 2 1
	b2	3.571 ± 0.022	3.53206	1.121	0 1 2
jho2	c1	4.619 ± 0.015	4.73253	-2.392	-1 0 1
	c2	4.240 ± 0.036	4.31318	-1.697	1 0 1

### 3.3.1.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión con filtrado energético (EFTEM)

En este trabajo se hizo un estudio preliminar de EFTEM de la muestra sintetizada con la relación molar 1/100/100 y con el péptido jho2. En la Figura 39 (a) se muestra una micrografía de SEM de la muestra calcinada a 400 °C; durante el análisis se observó una estructura tipo película que se encuentra encima de las partículas de FePO<sub>4</sub> lo que podría ser el péptido. En base a estos resultados se decidió hacer un mapeo elemental de la muestra calcinada a 200 °C para asegurarnos que el péptido (C, N, P) estuviera presente en la superficie de las NPs. En la Figura 39 (b) se puede observar el mapa elemental obtenido por EFTEM de un pequeño cúmulo de partículas de FePO<sub>4</sub> donde podemos observar que el nitrógeno (color rojo) proveniente del péptido (Tabla 13) no se encuentra distribuido homogéneamente, pero de cierta forma interactúa con las nanopartículas de FePO<sub>4</sub> resultado que concuerda con la micrografía de SEM.



**Figura 39:** Muestra sintetizada con la relación molar 1/100/100 y el péptido jho2. (a) micrografía de SEM de la muestra calcinada a 400 °C y (b) mapa elemental de la muestra calcinada a 200°C donde el color rojo representa nitrógeno y el color verde representa hierro.

**Tabla 13:** Composición elemental del péptido jho2:

Elemento	No de átomos
Carbono	36
Hidrogeno	56
Nitrógeno	12
Oxigeno	9

### 3.4 Modelo teórico

#### 3.4.1 Modelo del bulto de LiFePO<sub>4</sub>

En la Tabla 14 se muestran los pseudopotenciales elegidos para cada elemento presente en el LiFePO<sub>4</sub> con su respectivo corte en la energía, el cual presenta una energía relativa menor a 0.5 kcal/mol. Se puede observar que cada pseudopotencial tiene un corte en la energía diferente por lo que se eligió trabajar con 750 eV para describir el sistema.

En la Tabla 15 se muestran los parámetros geométricos de las moléculas modelo calculados con los pseudopotenciales elegidos. Se puede observar que los errores relativos son menores al 3 %. En el caso del átomo de Fe el pseudopotencial se evaluó con el LiFePO<sub>4</sub>, en la sección siguiente se muestran los parámetros de red obtenidos.

**Tabla 14:** Pseudopotenciales elegidos para cada elemento.

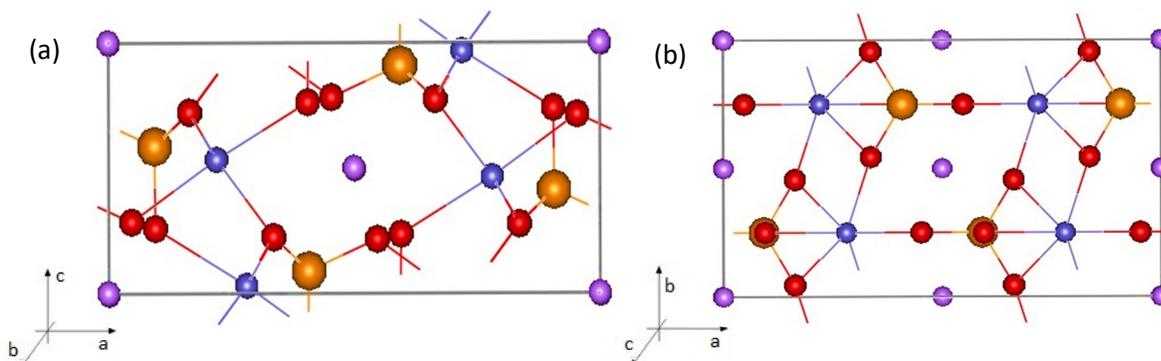
Átomo	Pseudopotencial	Corte en la energía (eV)
Litio	Li_sv	700
Hierro	Fe_sv	750
Fósforo	P	400
Oxígeno	O	400

**Tabla 15:** Parámetros geométricos de los modelos calculados con los pseudopotenciales elegidos.

Modelo		Experimental (Å)	Parámetro Calculado (Å)	Error relativo %
P <sub>2</sub>	P≡P	1.893 <sup>85</sup>	1.901	0.40
O <sub>2</sub>	O=O	1.207 <sup>85</sup>	1.234	2.23
Li <sub>2</sub> O (fluorita)	a=b=c	4.606 <sup>86</sup>	4.617	0.24
	α=β=γ	90 °		

En la Figura 40 se muestra el modelo del bulto optimizado con los parámetros mencionados anteriormente. Después, se calibró el tamaño de la malla de punto k (resultados mostrados en la Tabla 16), en base a estos resultados se eligió una malla 1x2x3 de puntos k.

En la Tabla 17 se muestran las energías relativas obtenidas para cada uno de los posibles estados de espín, donde se puede observar que la configuración de menor energía es Fe<sub>1</sub>(↑), Fe<sub>2</sub>(↓), Fe<sub>3</sub>(↓) y Fe<sub>4</sub>(↑) la cual concuerda con el resultado experimental reportado por Rouse *et al.*<sup>62</sup>.



**Figura 40:** Modelo del bulto de  $\text{LiFePO}_4$  orientado en el plano 010 (a) y 001 (b). Con el siguiente código de colores: litio (morado), hierro (azul), fósforo (amarillo) y oxígeno (rojo).

**Tabla 16:** Energía relativa en  $\text{LiFePO}_4$  obtenida de todas las posibles combinaciones de tamaño de malla de puntos  $k$ .

Puntos $k$	$E_{relativa}$ (kcal/mol)
1,1,3	-11.71
3,2,2	1.91
2,2,2	1.90
3,3,2	1.54
3,3,3	0.73
3,2,3	0.66
2,3,3	0.65
1,2,3	0.08
1,3,3	0.00

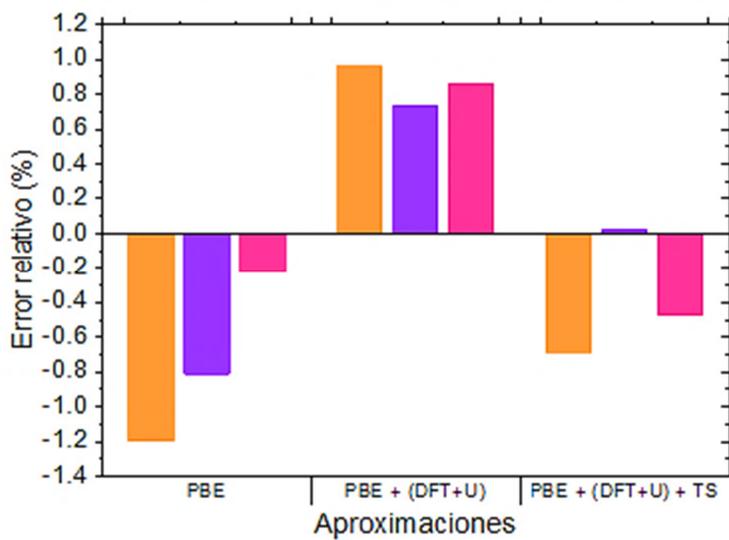
**Tabla 17:** Energía relativa en  $\text{LiFePO}_4$  de los diferentes estados de espín.

Momento magnético $\text{Fe}_1 \text{ Fe}_2 \text{ Fe}_3 \text{ Fe}_4$	$E_{relativa}$ (kcal/mol)	Magnetización total ( $\mu_B$ )
$\uparrow \uparrow \downarrow \downarrow$	72.09	0.0
$\downarrow \downarrow \uparrow \uparrow$	72.09	0.0
$\downarrow \uparrow \uparrow \downarrow$	70.90	0.0
$\downarrow \uparrow \downarrow \uparrow$	0.71	0.5
$\uparrow \downarrow \uparrow \downarrow$	0.70	-0.5
$\uparrow \downarrow \downarrow \uparrow$	0.00	0.0

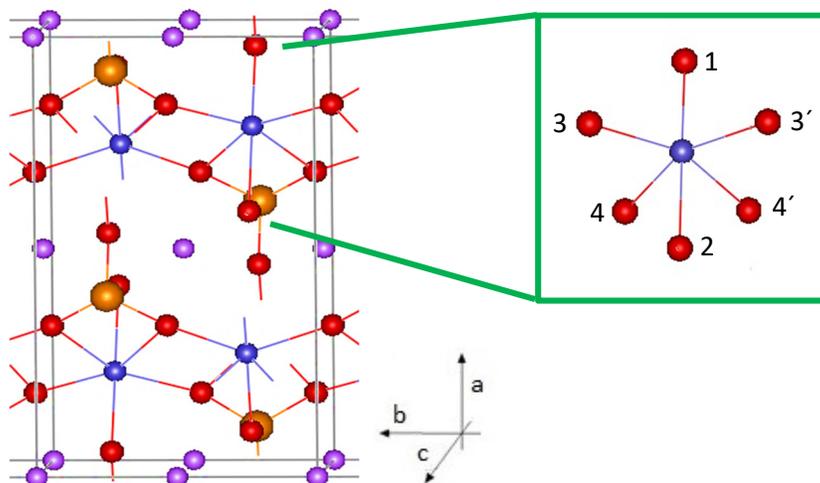
Se puede observar en la Figura 41 como disminuye el error relativo porcentual de los parámetros de red para el  $\text{LiFePO}_4$  respecto a los valores experimentales al adicionar las diferentes aproximaciones. Al adicionar la corrección DFT+U se puede observar que la celda se expande y el error relativo de los parámetros de red es menor al 1 %. Por otro lado, al adicionar las interacciones tipo Van der Waals hay un reacomodo y mejora los parámetros de red con un error relativo menor al 0.7 %.

Otro parámetro geométrico analizado fue las distancias de enlace Fe–O presentes en la coordinación del átomo de hierro, ver Figura 42 y Tabla 18. Se puede observar que el error relativo es menor al 1 %. También es importante hacer notar que el hierro y el litio se encuentran hexa coordinados, y el fósforo tetra coordinado, para posteriormente poder comparar los cambios de estructuras respecto al modelo de superficie. Los resultados obtenidos concuerdan con los

resultados experimentales reportados, por lo que podemos decir que nuestro método esta validado.



**Figura 41:** Error relativo porcentual de los parámetros de red  $a$  (amarillo),  $b$  (morado) y  $c$  (rosa) obtenido con las diferentes aproximaciones.



**Figura 42:** Análisis geométrico de los átomos de hierro del modelo del bulto. Código de colores: litio (morado), hierro (azul), fósforo (amarillo) y oxígeno (rojo).

**Tabla 18:** Comparación de las distancias Fe–O en el  $\text{LiFePO}_4$  respecto a los valores experimentales reportados. Cristal obtenido después de adicional las aproximaciones DFT+U y TS.

Átomo	Distancia experimental (Å)	Distancia calculada (Å)	Error relativo %
Fe–O (1)	2.115 (4)	2.12	0.24
Fe–O (2)	2.199 (4)	2.18	-0.86
Fe–O (3)	2.061 (2)	2.06	-0.05
Fe–O (3')		2.07	0.44
Fe–O (4)	2.253 (3)	2.24	-0.58
Fe–O (4')		2.24	-0.58

### 3.4.2 Modelo de superficie (100) de $\text{LiFePO}_4$

Debido que no convergió el estudio de vacío, se hizo un estudio de convergencia con otra configuración de espín, ferromagnética imponiendo momentos magnéticos de  $5 \mu_B$  y  $4 \mu_B$ .

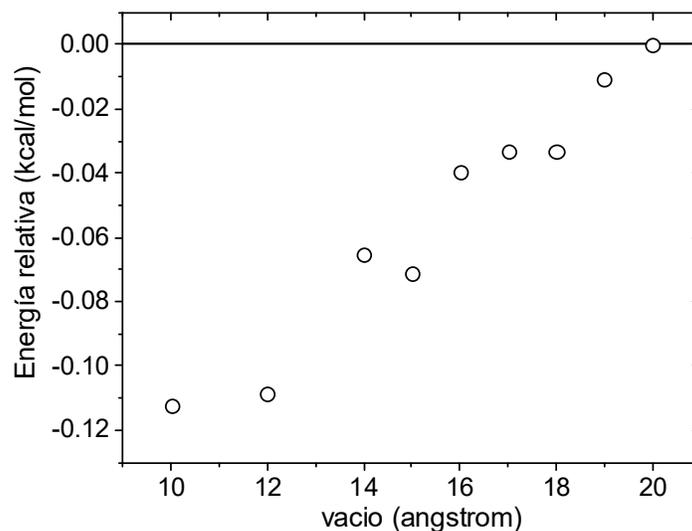
La configuración de espín que convergió fue la ferromagnética con una magnitud de  $4 \mu_B$ . Con esta configuración de espín se hizo el estudio de convergencia con los diferentes tamaños de vacío, ver Figura 43, se puede observar que la energía relativa con un vacío de  $10 \text{ \AA}$  es menor a  $0.2 \text{ kcal/mol}$  y al aumentar el tamaño del vacío la energía relativa disminuye. Considerando que  $0.5 \text{ kcal/mol}$  es un valor que cae dentro del error numérico, podemos considerar que un vacío de  $10 \text{ \AA}$  es suficiente para evitar que las láminas vecinas tengan algún tipo de interacción.

Al hacer el análisis de la superficie respecto al bulto, nos percatamos que la coordinación de los átomos de las dos láminas cambió. En la Figura 44, se muestra el modelo del bulto y la superficie (100), en la superficie se puede observar que el hierro se coordina con cuatro y cinco átomos de oxígeno a diferencia del bulto que está coordinado con seis átomos. Sin embargo, los átomos de litio interlaminares preservan su coordinación al igual que el fosfato.

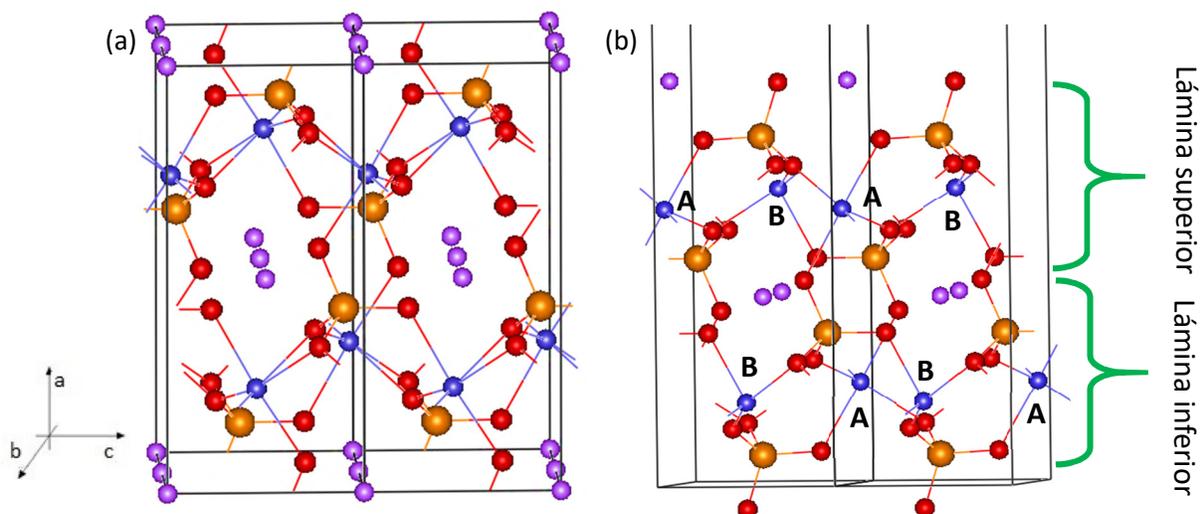
Es importante destacar que, para generar un buen modelo de superficie, este debe contener una parte representativa del bulto, es decir, que conserve la misma coordinación y distancias de enlace de los átomos en el bulto, y una parte representativa de la superficie (el reordenamiento de los átomos debido al corte).

Por lo tanto, en base al análisis de geometría el modelo de superficie generado no cumple con las características mencionadas, indicando que generar la superficie con dos láminas no fue suficientes para conservar parte del bulto y de la superficie.

Para evitar adicionar otra lámina, ya que implicaría más recursos computacionales, decidimos hacer una optimización restringida, es decir, se mantuvo fija la lámina inferior (bulto) y la lámina superior se dejó libre (superficie). De esta forma nuestro modelo cumpliría las características de una superficie.



**Figura 43:** Estudio de convergencia del vacío necesario para generar la superficie.



**Figura 44:** Análisis geométrico para comparar. Se muestra una celda 1x1x2 para esquematizar la coordinación del bulto (a) y de la superficie (100) (b). La letra “A” indica una coordinación con 5 oxígenos y “B” una coordinación con 4 oxígenos.

Con este nuevo modelo de superficie, se consideró que era importante estudiar otras configuraciones de espín, ver Tabla 19, para corroborar que la configuración de espín elegida fuera la de menor energía.

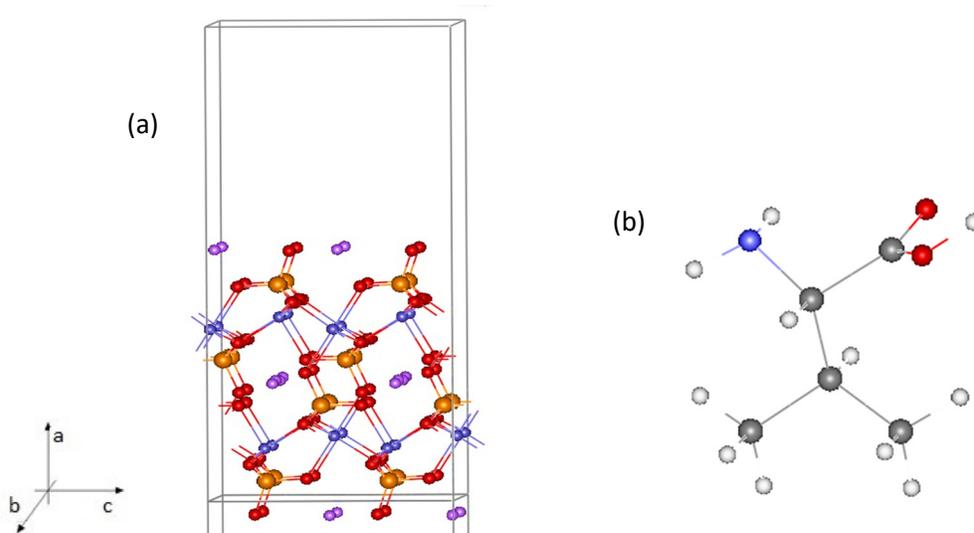
Se puede observar que al usar un estado de espín ferromagnético con un momento magnético de  $5 \mu_B$  la magnetización global resulto ser de  $16 \mu_B$  lo que podría indicar que el sistema prefiere un momento magnético de  $4 \mu_B$ . En contraste las otras configuraciones si conservaron la magnetización global acorde al momento magnético.

Descartando la configuración ferromagnética ( $5 \mu_B$ ), el error relativo entre los otros estados de espín es menor 1.2 kcal/mol; sin embargo, la configuración antiferromagnética ( $5 \mu_B$ ) es la de menor energía. Por lo que se eligió esta última configuración para generar la celda 1x2x2.

**Tabla 19:** Estudio de las diferentes configuraciones de espín, siendo el  $Fe_1$  y  $Fe_2$  los que se encuentran en la lámina inferior y el  $Fe_3$  y  $Fe_4$  en la lámina superior.

Momento magnético $Fe_1$ $Fe_2$ $Fe_3$ $Fe_4$	Magnitud del momento magnético ( $\mu_B$ ) $Fe_1$ $Fe_2$ $Fe_3$ $Fe_4$	$E_{relativa}$ (kcal/mol)	Magnetización total
$\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$	5 5 5 5	21.24	16
$\uparrow \uparrow \uparrow \uparrow$	4 4 4 4	1.13	16
$\uparrow \downarrow \uparrow \uparrow$	5 -5 4 4	0.62	8
$\uparrow \downarrow \downarrow \uparrow$	5 -5 -5 5	0.00	0

Como resultado preliminar, en la Figura 45 se muestra la superficie (100) con una celda 1x2x2 generada a partir de la superficie con una celda 1x1x1 y el modelo de la valina (aislada) optimizados con un grado de libertad.



**Figura 45:** (a) Modelo de superficie con un tamaño de celda 1x2x2, código de colores: litio (*morado*), hierro (*azul*), fósforo (*amarillo*) y oxígeno (*rojo*). (b) valina, código de colores: nitrógeno (*azul*), carbono (*gris*), oxígeno (*rojo*) e hidrógeno (*blanco*).

## 4 Conclusiones y perspectivas

### 4.1 Conclusiones

#### Estabilidad del fago M13

- ✓ De acuerdo con los estudios espectroscópicos el fago M13 no mostró cambios conformacionales importantes al estar expuesto a pH 2.5 y 3.0, durante un tiempo de incubación de 120 min. En contraste, el fago sometido a sonicación (control 1) y expuesto a pH por largo tiempos (1260 min) observó un ligero corrimiento hacia el rojo como consecuencia de la exposición del W26 al solvente.
- ✓ El proceso de sonicación produce cambios conformacionales en la P8 como se observó en los experimentos de DC (disminución del contenido de estructura secundaria alfa-hélice). Sin embargo, este proceso no es suficiente para desensamblar por completo al fago ya que sus propiedades electroforéticas resultaron diferentes respecto de una muestra desnaturalizada (SDS) y una nativa.
- ✓ El fago en solución a pH 5.0 y 10.0 mostró ser termoestable, no observándose transición alguna con los barridos térmicos de DC.
- ✓ Sin embargo, cuando el fago se disolvió en una mezcla etanol-agua (30% V/V) se observó el perfil de desnaturalización característico de un proceso irreversible de una sola etapa. Este perfil depende de la velocidad de calentamiento lo que nos indica que el proceso está controlado cinéticamente.
- ✓ El mecanismo de desnaturalización es función de la composición etanol-agua. A menor cantidad de etanol en el perfil de desnaturalización se observan dos puntos de inflexión, lo que podría estar relacionado a un mecanismo de varias etapas.
- ✓ Los parámetros termodinámicos calculados mediante DSC sugirieron, que en la mezcla etanol-agua al 30 %, en la etapa uno se desnaturalizaron cooperativamente 21 proteínas y en la etapa dos 8 subunidades de la P8. En contraste, el fago en agua perdió 14 y 4 unidades de P8 en la etapa uno y dos, respectivamente.
- ✓ La presencia del catión  $\text{Na}^+$  tiene poco efecto en la estabilidad térmica del fago, mientras que en igual concentración el catión  $\text{Ag}^+$  provoca una desestabilización notable de la partícula viral.

#### Síntesis y caracterización del $\text{FePO}_4$

- ✓ Los péptidos no produjeron material cristalino a temperatura ambiente; sin embargo, al ser calcinados producen estructuras cristalinas.
- ✓ De acuerdo con los espectros de IR y TGA no hay evidencia de la presencia de los péptidos en el material final. Sin embargo, los resultados de SEM y TEM muestran la existencia de material orgánico en la superficie de las NPs indicando su posible capacidad de biomineralización del  $\text{FePO}_4$ .

#### Modelo teórico

- ✓ Se obtuvieron de forma exitosa los parámetros necesarios para generar el modelo del bulto del  $\text{LiFePO}_4$ . Los resultados dieron parámetros de red y distancias Fe-O con errores relativos menores al 1 %.

- ✓ Si bien el primer modelo de superficie generado no cumplió con las características de un modelo adecuado, este problema se resolvió optimizando el movimiento de los átomos más superficiales, mientras que en los átomos más internos se restringió su movimiento.
- ✓ El estado de espín de menor energía resultó ser el mismo para el modelo del bulto y el modelo de superficie.

## 4.2 Perspectivas

### Estabilidad del fago M13

- ✓ Emplear otras técnicas como espectroscopía de fluorescencia y DLS además de DC en el estudio de estabilidad térmica incrementando la cantidad de etanol, para proponer un modelo más completo de la desnaturalización del fago.
- ✓ Estudiar la influencia de la estabilidad del fago en medios básicos.
- ✓ Estudiar otras variables asociadas a la estabilidad del fago. Por ejemplo, estudiar la influencia de la adición de cationes divalentes vs monovalentes, con la intención de proponer una metodología más apropiada para el proceso de biomineralización.

### Síntesis y caracterización del $\text{FePO}_4$

- ✓ Debido a que no se obtuvieron materiales cristalinos, se propone emplear otras relaciones molares. Además, se propone emplear otros precursores con mayor estabilidad química (pH) y solubilidad.
- ✓ Estudiar las propiedades electroquímicas del material, para comparar el efecto de estos péptidos con los ya reportados previamente.
- ✓ Estudiar con más detalle el ordenamiento que adquiere el péptido durante la mineralización mediante DC.

### Modelo teórico

- ✓ Adsorber la valina en dos sitios diferentes de la superficie, una cerca del litio y otra cerca del oxígeno y calcular la energía de adsorción para las dos posiciones.

## 5 Referencias

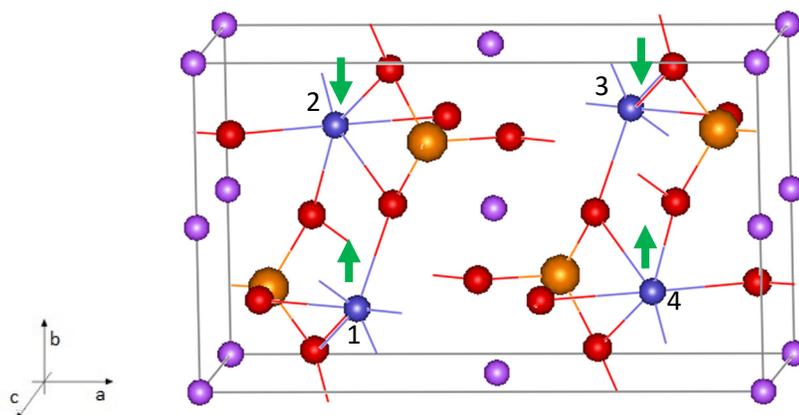
1. Dove, P.M., Yoreo, J.J., and Weiner, S.; Biomineralization, *Reviews in mineralogy & geochemistry*, **2003**, 54.
2. *Trilobites*, Levi-Setti, R.; Eds.; The University of Chicago press, **1995**.
3. *Gravity and the Behavior of Unicellular Organisms*, Häder, D.P.; Hemmersbach, R.; Lebert, M.; Cambridge University press, **2005**.
4. *Biomineralization and biomaterials, Chapter 2*, Aparicio, C.; Ginebra, G.; Elsevier, **2016**.
5. Kirschvink, J.L.; Magnetite Biomineralization and Geomagnetic sensitivity in higher animals, *Bioelectromagnetics*, **1989**, 10, 239-259.
6. Tanaka, M.; Mazuyama, E.; Araki, A.; Matsunaga, T.; MMS6 protein regulates crystal morphology during nano-sized magnetite Biomineralization in vivo, *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (8), 6386-6392.
7. Guerrero, R.; Bacterias magnetotácticas, hoy y hace 3800 millones, *Actualidad SEM*, 29, 14-20.
8. *Bio-inspired nanotechnology: From surface analysis to applications, Chapter 5*, Knecht, M.R.; Walsh, T.R.; Springer, **2014**.
9. Zurzolo, C.; Bowler, C.; Exploring bioinorganic pattern formation in Diatoms, *Plant Physiology*, **2001**, 127, 1339-1345.
10. *Bio-inspired nanotechnology: From surface analysis to applications, Chapter 1*, Knecht, M.R.; Walsh, T.R.; Springer, **2014**.
11. *Biomineralization: Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Mann, S.; Oxford University press, **2001**.
12. Freire, E.; Mayorga, O.L.; Straume, M.; Isothermal titration Calorimetry, *Analytical Chemistry*, **1990**, 62 (18), 950 A-959 A.
13. Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J.F.; Lin, L.N.; Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Analytical biochemistry*, **1989**, 179, 131-137.
14. Limo, M.J.; Perry, C.C.; Thermodynamic Study of Interactions Between ZnO and ZnO Binding Peptides Using Isothermal Titration Calorimetry, *Langmuir*, **2015**, 31, 6814-6822.
15. Miller, E.S.; Kutter, E.; Mosig, G.; Arisaka, F.; Kunisawa, T.; Rügner, W.; Bacteriophage T4 genome, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2003**, 67, 86-156.
16. Dika, C.; Duval, J.F.L.; Chatain, H.M.L.; Merlon, C.; and Gantzer, C.; Impact of internal RNA on aggregation and electrokinetics of viruses: comparison between MS2 phage and corresponding virus-like particles, *Appl. Environ. Microbiol*, **2011**, 77 (14), 4939-4948.
17. Xu, H.; Cao, B.; George, A.; and Mao, C.; Self-assembly and mineralization of genetically modifiable biological nanofibers driven by  $\beta$ -structure formation, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 2193-2199.
18. Glucksman, M.J.; Bhattacharjee, S.; Three-dimensional structure of a cloning vector X-ray diffraction studies of filamentous bacteriophage M13 at 7 Å resolution, *J. Mol. Chem.*, **1992**, 226, 455-470.
19. *Características generales de los bacteriófagos filamentosos, Capítulo 4*, Santiago-Vispo, N.; Dueñas, M.; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.
20. Sidhu, S.S.; Engineering M13 for phage display, *Biomolecular Engineering*, **2001**, 18, 57-63.
21. Makowski, L.; Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages, *Gene*, **1993**, 128, 5-11.
22. Marvin, D.A.; Hale, R.D.; Nave, C.; Citterich, M.H.; Molecular models and structural comparisons of native and mutant class I filamentous bacteriophages Ff (fd, f1, M13), If1 and Ike, *J. Mol. Biol.*, **1994**, 235, 260-286.
23. Papavoine, C.H.M.; Christiaans, B.E.C.; Folmer, R.H.A.; Konings, R.N.H.; Hilbers, C.W.; Solution structure of the M13 major coat protein in detergent micelles: a basis for a model of phage assembly involving specific residues, *J. Mol. Biol.*, **1998**, 282, 401-419.

24. Zatyka, M.; Thomas, C.M.; Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements, *FEMS Microbiology Reviews*, **1998**, *21*, 291-319.
25. Greenwood, J.; Hunter, G.J.; and Perham, R.N.; Regulation of filamentous bacteriophage length by modification of electrostatic interactions between coat protein and DNA, *J. Mol. Biol.*, **1991**, *217*, 223-227.
26. Stopar, D.; Spruijt, R.B.; Wolfs, C.J.A.M.; Hemminga, M.A.; Mimicking initial interactions of bacteriophage M13 coat protein disassembly in model membrane systems, *biochemistry*, **1998**, *37*, 10181-10187.
27. Griffith, J.; Manning, M.; Dunn, K.; Filamentous Bacteriophage contract into hollow spherical particles upon exposure to a chloroform-water interface, *Cell*, **1981**, *23*, 747-753.
28. Olofsson, L.; Ankarloo, J.; Andersson, P.O.; Nicholls, I.A.; Filamentous Bacteriophage stability in non-aqueous media, *Chemistry & Biology*, **2001**, *8*, 661-671.
29. Steven, D.; Branston, E.C. Stanley, John M. Ward, and Eli Keshavarz-Moore; Determination of the survival of Bacteriophage M13 from chemical and physical challenges to assist in its sustainable bioprocessing, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **2013**, *18*, 560-566.
30. Solomon, B.; Filamentous Bacteriophage as a novel therapeutic tool for Alzheimer's disease treatment, *J. Alzheimer's Dis.*, **2008**, *15*, 193-198.
31. Lee, B.Y.; Zhang, J.; Zueger, C.; Chung, W.J.; Yoo, S.Y.; Wang, E.; Meyer, J.; Ramesh, R.; Lee, S.W.; Virus-based piezo-electric energy generation, *Nat. Nanotechnol*, **2012**, *7*, 351-356.
32. Peelle, B.R.; Krauland, E.M.; Wittrup, K.D.; Belcher, A.M.; Design criteria for engineering inorganic material-specific peptides, *Langmuir*, **2005**, *21*, 6929-6933.
33. Vallee, A.; Humblot, V.; Pradier, C.M.; Peptide interactions with metal and oxide Surface, *Accounts of chemical research*, **2010**, *43* (10), 1297-1306.
34. Smith, G.P.; Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **1985**, *228*, 1315-1317.
35. Smith, G.P.; Petrenko, V.A.; Phage Display, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 391-410.
36. *Bio-inspired nanotechnology: From surface analysis to applications*, Chapter 6, Knecht, M.R.; Walsh, T.R.; Springer, **2014**.
37. Ruan, L.; Ramezani-Dakhel, H.; Chiu, C.Y.; Zhu, E.; Li, Y.; Heinz, H.; Huang, Y.; Tailoring molecular specificity toward a crystal facet: a lesson from biorecognition toward Pt {111}, *Nano Lett.*, **2013**, *13*, 840-846.
38. Jayalakshmi, M.; Mohan-Rao, M.; Scholz, F.; Electrochemical behavior of solid lithium manganate (LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) in aqueous neutral electrolyte solutions, *Langmuir*, **2003**, *19*, 8403-8408.
39. Padhi, A.K.; Nanjundaswamy, K.S.; Goodenough, J.B.; Phospho-olivines as positive-electrode materials for rechargeable lithium batteries, *J. Electrochem. Soc.*, **1997**, *144* (4), 1188-1194.
40. Shiraishi, K.; Dokko, K.; Kanamura, K.; Formation of impurities on phosphoolivine LiFePO<sub>4</sub> during hydrothermal synthesis, *J. Power Sour*, **2005**, *146*, 555-558.
41. Islam, M.S.; Driscoll, D.J.; Fisher, C.A.J.; Slater, P.R.; Atomic-scale investigation of defects, dopants and lithium transport in the LiFePO<sub>4</sub> olivine-type battery material, *Chem. Mater.*, **2005**, *17*, 5085-5092.
42. Jayalakshmi, M., Rao, M.M.; Scholz, M.; Electrochemical behavior of solid lithium manganate (LiMn<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) in aqueous neutral electrolyte solutions, *Langmuir*, **2003**, *19*, 8403-8408.
43. Xu, Y.; Lu, Y.; Ying, P.; Yan, L.; Yang, Z.; Yang, R.; A versatile method for preparing FePO<sub>4</sub> and study on its electrode performance in lithium ion batteries, *J. of Materials Processing technology*, **2008**, *204*, 513-519.
44. Song, Y.; Yang, S.; Zavalij, P.Y.; Whittingham, M.S.; Temperature-dependent properties of FePO<sub>4</sub> cathode Materials, *Mat. Research Bulletin*, **2002**, *37*, 1249-1257.

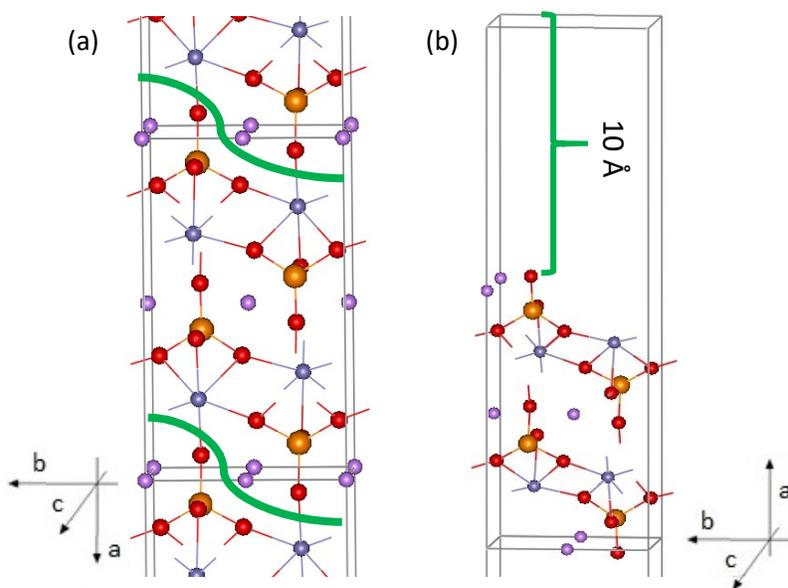
45. Zhou, W.; He, W.; Zhang, X.; Zhao, H.; Li, Z.; Yan, S.; Tian, X.; Sun, X.; Han, X.; Biosynthesis and characterization of mesoporous organic-inorganic hybrid iron phosphate, *Materials Chemistry and Physics*, **2009**, *116*, 319-322.
46. Ryu, J.; Kim, S.W.; Kang, K.; Park, C.B.; Mineralization of self-assembled peptide nanofibers for rechargeable lithium ion batteries, *Adv. Mater.*, **2010**, *XX*, 1-5.
47. Lee, Y.J.; Belcher, A.M.; Nanostructure design of amorphous FePO<sub>4</sub> facilitated by virus for 3 V lithium ion battery cathodes, *J. Mater. Chem.*, **2011**, *21*, 1033-1039.
48. Susapto, H.H.; Kudu, O.U.; Garifullin, R.; Yilmaz, E.; Guler, M.O.; One-dimensional peptide nanostructure templated growth of iron phosphate nanostructures for lithium-ion battery cathodes, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2016**, *8*, 17421-17427.
49. Selección de péptidos específicos para la síntesis de LiFePO<sub>4</sub> a través de una librería de fagos desplegados sobre el virus M13, González-Cansino, J.L.; Vera-Robles, L.I.; Servicio Social UAM-I, **2015**.
50. Preparation of Single-stranded bacteriophage M13 DNA, Sambrook, J.; Russell, D.W.; Cold Spring Harbor Protocols.
51. Rodney, L.; Levien; Quantitation of aromatic residues in proteins: model compounds for second-derivative spectroscopy, *Biochemistry*, **1982**, *21*, 2600-2606.
52. Chung, J.W.; Biomimetic self-templating supramolecular structures, *Nature*, **2011**, *487*, 364-368.
53. Kelly, S.M.; How to study proteins by circular dichroism, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2005**, *1751*, 119-139.
54. Ronhg, J.; Oriented cell growth on self-assembled Bacteriophage M13 thin films, *Chem. Commun.*, **2008**, 5185-5187.
55. Endemann, H.; Model, P.; Location of filamentous Phage minor coat proteins in Phage and in infected cells, *J. Mol. Biol.*, **1995**, *250*, 496-508.
56. *Introduction to Fluorescence*, Jameson, D.M.; CRC Press, **2014**, pp 67.
57. *Methods for protein analysis a practical guide for laboratory Protocols, Chapter 10*, Copeland, R.A.; Springer Science Business Media Dordrecht, **1994**.
58. Li, W.; Suez, I.; Szoka, F.C.; Reconstitution of the M13 major coat protein and its transmembrane peptide segment on a DNA template, *Biochemistry*, **2007**, *46* (29), 8579-8591.
59. Wang, L.; Zhou, F.; Meng, Y.S.; Ceder, G.; First-principles study of Surface properties of LiFePO<sub>4</sub>: Surface energy, and Surface redox potential, *Physical Review B*, **2007**, *76*, 165435(1-11).
60. Tkatchenko, A.; Scheffler, M.; Accurate molecular Van der Waals interactions from ground-state electron density and free-atom, *Phys. Rev. Lett.*, **2009**, *102*, 073005.
61. Rouse, G.; Rodriguez-Carvajal, J.; Patoux, S.; Masqueller, C.; Magnetic structures of the triphylite LiFePO<sub>4</sub> and of its delithiated form FePO<sub>4</sub>, *Chem. Mater.*, **2003**, *15*, 4082-4090.
62. Principles of Physical Biochemistry, Chapter 10, Van-Holde, K.E.; Curtis-Johnson, W.; Shing-Ho, P.; Pearson Prentice Hall, **2006**, pp 482.
63. Ling, M.; Zhu, S.; Tian, Y.; Zhang, W.; Wang, S.; Chen, C.; Wu, L.; Yan, X.; Label-free analysis of single viruses with a resolution comparable to that of electron microscopy and the throughput of flow cytometry, *Angew. Chem. Int.*, **2016**, *55*, 1-6.
64. Day, L.A.; Conformations of single-stranded DNA and coat protein in fd bacteriophage as revealed by Ultraviolet Absorption spectroscopy, *J. Mol. Biol.*, **1969**, *39*, 265-277.
65. Sanchez-Ruiz, J.M.; López-Lacomba, J.L.; Cortijo, M.; Mateo, P.L.; Differential Scanning Calorimetry of the irreversible thermal denaturation of thermolysin, *Biochemistry*, **1988**, *27*, 1648-1652.
66. *Química Física*, Atkins, P.W.; Omega, **1999**, pp 782.
67. Sanchez-Ruiz, J.M.; Theoretical analysis of Lumry-Eyring models in differential scanning calorimetry, *Biophys. J.*, **1992**, *61*, 921-935.

68. Toledo-Nuñez, C.; Vera-Robles, L.I.; Arroyo-Maya, I.J.; Hernández-Arana, A.; Deconvolution of complex differential scanning calorimetry profiles for protein transitions under kinetic control, *Analytical Biochemistry*, **2016**, *509*, 104-110.
69. Robertson, A.D.; Murphy, K.P.; Protein structure and the energetics of protein stability, *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 1251-1267.
70. *Advances in protein physical chemistry, Chapter 8*, Hernández-Arana, **2008**.
71. Zhang, Y.; Cremer, P.S.; Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series, *Current opinion in chemical biology*, **2006**, *10*, 658-663.
72. Tadeo, X.; Méndez, B.L.; Castaño, D.T.; Trigueros; Millet, O.; Protein stabilization and the Hofmeister effect: the role of hydrophobic solvation, *Biophysical Journal*, **2009**, *97*, 2595-2603.
73. Casadevall, A.; Day, L.A.; DNA packing in the filamentous viruses fd, Xf, Pf1 and Pf3, *Nucleic Acids Research*, **1982**, *10* (7), 2467.
74. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, Nakamoto, K.; Wiley New York, **1963**, pp 138.
75. Yin, Y.; Zhang, H.; Wu, P.; Zhou, B.; Cai, C.; Iron phosphate nanostructures synthesized by microwave method and their applications in biosensing, *Nanotechnology*, **2010**, *21*, 425504 (1-10).
76. Shi, Z.C.; Attia, A.; Ye, W.L.; Wang, Q.; Li, Y.X.; Yang, Y.; Synthesis, characterization and electrochemical performance of mesoporous FePO<sub>4</sub> as cathode material for rechargeable lithium batteries, *Electrochimica Acta*, **2008**, *53*, 2665-2673.
77. Zhao, J.; Jian, Z.; Ma, J.; Wang, F.; Hu, Y.S.; Chen, W.; Chen, L.; Liu, H.; Dai, S.; Monodisperse Iron Phosphate nanospheres: preparation and application in energy storage, *Chem. Sus. Chem.*, **2012**, *5*, 1495.
78. Thomas, M.; George, K.C.; Characterization and magnetic properties of nanocrystalline FePO<sub>4</sub>, *Indian J. Pure & Appl. Phys.*, **2010**, *48*, 104-109.
79. Bristoti, A.; Viccaro, P.J.; Kunrath, J.I.; Brandão, D.E.; Mössbauer analysis and thermal decomposition studies of Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·nH<sub>2</sub>O, *Inorg. Nucl. Chem. Letters.*, **1975**, *11*, 253-258.
80. Jager, H.J.; Prinsloo, L.C.; The dehydration of phosphates monitored by DSC/TGA and in situ raman spectroscopy, Jager, H.J.; Prinsloo, L.C.; *Thermochimica Acta*, **2001**, *376*, 187-196.
81. Scaccia, S.; Carewska, M.; Bartolomeo, A.D.; Prosino, P.P.; Thermoanalytical investigation of iron phosphate obtained by spontaneous precipitation from aqueous solutions, *Thermochimica acta*, **2002**, *383*, 145-152.
82. Palacios, E.; Leret, P.; Fernández, J.F.; De Aza, A.H.; Rodríguez, M.A.; Synthesis of amorphous acid iron phosphate nanoparticles, *J. Nanopart. Res.*, **2012**, *14*, 1131.
83. Boonchom, B.; Danvirutai, C.; Thermal Decomposition kinetics of FePO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O precursor to synthesize spherical nanoparticles FePO<sub>4</sub>, *Ing. Eng. Chem. Res*, **2007**, *46*, 9071-9076.
84. Wang, S.; Wang, Q.; Liu, J.; Cheng, Z.; Si, D.; Geng, B.; Kinetic manipulation of the morphology evolution of FePO<sub>4</sub> microcrystals: from rugbys to porous microspheres, *Crys. Eng. Comm.*, **2009**, *11*, 2510-2515.
85. *Tables of Interatomic distances and configuration in molecules and ions*, Sutton, L.E.; London the chemical society Burlington house, **1965**.
86. Long, J.; Yang, L.; Li, D.; First-principles investigations of the physical properties of antiferro Li<sub>2</sub>O under various pressures, *Solid State Sciences*, **2013**, *19*, 12-18.

## 6 Apéndice I: Figuras adicionales



**Figura A1:** Esquema de uno de los posibles estados de espín antiferromagnético ( $Fe_1(\uparrow)$ ,  $Fe_2(\downarrow)$ ,  $Fe_3(\downarrow)$  y  $Fe_4(\uparrow)$ ) del modelo del bulto de  $LiFePO_4$  orientado en el plano (001). Código de colores: litio (morado), hierro (azul), fósforo (amarillo) y oxígeno (rojo).



**Figura A2:** (a) modelo del bulto (1x1x1), de color verde se muestra el corte que se hizo para general la superficie y (b) modelo de superficie (100). Código de colores: litio (morado), hierro (azul), fósforo (amarillo) y oxígeno (rojo).

## 7 Anexo II: Trabajo presentado en congreso nacional e internacional.

### Congreso nacional

- 6-11 noviembre 2016: XXXI Congreso Nacional de Bioquímica llevado a cabo en la Ciudad de Aguascalientes. En la modalidad de poster denominado “Structural Characterization of bacteriophage M13 in acid pH values”.
- 17-19 noviembre 2016: XV Reunión Mexicana de Físicoquímica Teórica llevado a cabo en Yucatán, Mérida. En la modalidad de poster denominado “Estudio teórico de la superficie de  $\text{LiFePO}_4$ ”.

### Congreso internacional

- 6-10 marzo 2017: 5th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials llevado a cabo en Lisboa, Portugal. En la modalidad de poster denominado “Biomineralization of  $\text{FePO}_4$  using a peptide like template”.

