



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**

Unidad Iztapalapa

**Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa  
División de Ciencias Básicas e Ingeniería  
Departamento de Química**

**Diseño de bioplantillas  
para la síntesis de  $\text{TiO}_2$**

Tesis que presenta:  
**Q. Armin Hernández Gordillo**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias**

**Dirigida por:**

**Dra. Liliana Fraix Vera Robles**

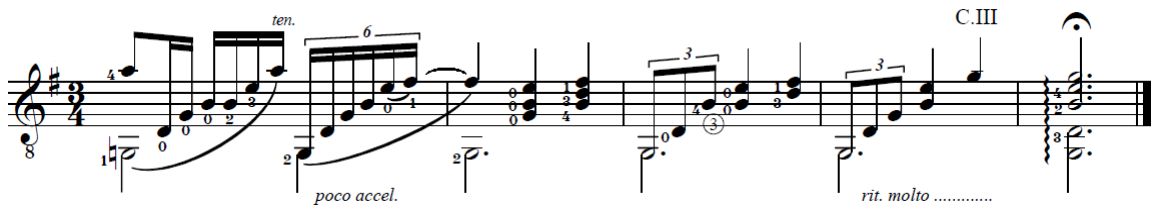
**Dr. Antonio Campero Celis**

**México, D.F., Junio 2013**

"La ciencia es una escuela de modestia, de valor intelectual y de tolerancia: muestra que el pensamiento es un proceso, que no hay gran hombre que no se haya equivocado, que no hay dogma que no se haya desmoronado ante el embate de los nuevos hechos".

Ernesto Sabato, Uno y el Universo

*A la memoria de mi abuelo, Rubén.*



Lilium (final), J. A. (Ñico) Rojas.

## **Agradecimientos**

Agradezco todo el apoyo brindado por mis asesores:

Dr. Antonio Campero Celis

Dra. Iraís Vera Robles

Cuya sinergia de experiencia y juventud fue imprescindible para este trabajo.

Al jurado:

Dra. Lena Ruiz Azuara

Dr. Andrés Hernández Arana

Dr. Michel Picquart

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de la tesis de maestría (Becario: 265459).

**-A mi inquebrantable familia-**

**Gracias**

## Índice General

	Página
<b>Índice de Tablas y Figuras</b>	<b>i</b>
<b>Resumen</b>	<b>iv</b>
<b>Capítulo 1 Antecedentes</b>	<b>1</b>
1.1 Introducción.....	1
1.2 Dióxido de titanio.....	5
2.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	5
1.3 Biomimética.....	8
1.3.1 Síntesis de autoensamble.....	8
1.3.2 Biomimética en el proceso sol-gel.....	10
1.3.3 Biomineralización con péptidos.....	14
1.3.3.1 Selección de péptidos con interacción específica.....	15
1.3.3.2 Biomineralización usando péptidos específicos.....	17
<b>Capítulo 2 Planteamiento del problema</b>	<b>22</b>
2.1 Planteamiento del problema.....	22
2.2 Hipótesis.....	22
2.3 Objetivos.....	22
<b>Capítulo 3 Materiales y Metodología</b>	<b>23</b>
3.1 Biomineralización.....	23
3.2 Pruebas fotocatalíticas de TiO <sub>2</sub> .....	24
3.3 Simulaciones por dinámica molecular.....	25
3.4 Técnicas de caracterización.....	26
<b>Capítulo 4 Resultados y discusión</b>	<b>28</b>
4.1 Características fisicoquímicas de los péptidos.....	28

4.2	Síntesis de $\text{TiO}_2$ por biomineralización.....	30
	4.2.1 Síntesis con propóxido de titanio.....	30
	4.2.2 Síntesis con isopropóxido de titanio.....	32
4.3	Síntesis de $\text{SiO}_2$ por biomineralización.....	44
4.4	Actividad fotocatalítica de $\text{TiO}_2$ .....	49
4.5	Simulaciones por dinámica molecular.....	51
<b>Capítulo 5 Conclusiones y perspectivas</b>		<b>55</b>
5.1	Conclusiones.....	55
5.2	Perspectivas.....	56
<b>Capítulo 6 Referencias</b>		<b>57</b>
<b>Apéndices</b>		<b>61</b>
	Apéndice 1 Tabla de aminoácidos.....	61
	Apéndice 2 Método sol-gel.....	63

## Índice de Tablas y Figuras

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1.1 Datos de las principales estructuras cristalinas para TiO <sub>2</sub> .....	6
3.1 Péptidos propuestos para biomineralización.....	23
4.1 Péptidos utilizados para biomineralizar.....	29
4.2 Resumen de reacciones de biomineralización con Ti(PrO <sup>i</sup> ) <sub>4</sub> .....	43
4.3 Reacciones con el péptido H en diferentes amortiguadores con una relación molar péptido:TEOS de 1:50.....	44
4.4 Pruebas de biomineralización de SiO <sub>2</sub> con los péptidos en amortiguador TRIS 50mM.....	48
<b>Figura</b>	
1.1 Ejemplos de materiales complejos sintetizados biológicamente.....	2
1.2 Micrografías de varias especies de diatomeas.....	3
1.3 Estructuras cristalinas de rutilo y anatasa.....	7
1.4 Celda unidad de la fase brookita.....	7
1.5 Estructuras de SiO <sub>2</sub> sintetizadas con el péptido R5.....	12
1.6 Esquema del mecanismo de reacción propuesto para la biomineralización de SiO <sub>2</sub> catalizada por una silicateína a partir de tetraetilortosilicato (TEOS)...	13
1.7 Capacidades potenciales de los péptidos para materiales.....	15
1.8 Pasos para realizar un <i>biopanning</i> .....	16
1.9 Imágenes de TEM de nanopartículas de Pd.....	17
1.10 Imágenes de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido dTi-1(H/K).....	19
1.11 Imágenes de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con –CHRRPSRSC- y –CHKKPSKSC-.....	20
1.12 Modelo de interacción del péptido RKLPDA con una superficie de TiO <sub>2</sub> .....	21
3.1 Reactor para fotocatalisis usado para degradar AM.....	25
4.1 Carga total de los péptidos respecto al pH.....	29
4.2 Imágenes de TEM de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido H en agua a una concentración de 4 mg/mL con relación molar Ti:PrOH:H <sub>2</sub> O 1:50:40.....	31

<b>4.3</b> Imágenes de TEM de TiO <sub>2</sub> : a) y b) biomineralizado con el péptido H a una concentración de 2 mg/mL en amortiguador de boratos usando acetil acetona; c) Control negativo.....	31
<b>4.4</b> Imágenes de TEM de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido H con una concentración de 2 mg/mL en amortiguador de PBS usando acac.....	32
<b>4.5</b> Imágenes de HRTEM de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido control [4 mg/mL] en agua con relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:66:5. Imagen del patrón de difracción de electrones.....	33
<b>4.6</b> Imágenes de TEM de la segunda muestra preparada de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido control H en agua 4 mg/mL con relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:66:5. Imagen del patrón de difracción de electrones.....	34
<b>4.7</b> Imágenes de TEM de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido el péptido: a) HH; b) R; c) KK; d) HK; e) L. En agua [4 mg/mL] con relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:66:5.....	36
<b>4.8</b> Espectros de infrarrojo de TiO <sub>2</sub> usando una relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:66:5.....	37
<b>4.9</b> Difractogramas de rayos X de algunas muestras de TiO <sub>2</sub> .....	38
<b>4.10</b> TGA y DSC de TiO <sub>2</sub> del control negativo usando la relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:66:5.....	39
<b>4.11</b> TGA y DSC de TiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido H [4 mg/mL] usando la relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:66:5.....	40
<b>4.12</b> Resultado final de la reacción con relación molar Ti:iPrOH:H <sub>2</sub> O 1:145:10.....	40
<b>4.13</b> Imágenes de TEM del TiO <sub>2</sub> sintetizado usando la relación molar 1:145:10.....	42
<b>4.14</b> Imágenes de TEM de SiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador de fosfatos (PBS).....	45
<b>4.15</b> Imágenes de TEM de SiO <sub>2</sub> biomineralizado con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador TRIS.....	45
<b>4.16</b> Imágenes de TEM de SiO <sub>2</sub> sintetizado con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador de boratos.....	46

<b>4.17</b> Espectros de IR de las muestras de SiO <sub>2</sub> preparadas con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador PBS.....	47
<b>4.18</b> Espectros de absorción UV-vis de AM respecto al tiempo de irradiación UV.....	50
<b>4.19</b> Porcentaje de AM degradado respecto al tiempo de la fotocatalisis....	50
<b>4.20</b> Desviación de la media cuadrática (RMSD) de los péptidos en los últimos 5ns de simulación.....	51
<b>4.21</b> Fluctuación de la media cuadrática por residuo en los últimos 4ns de simulación.....	52
<b>4.22</b> Estructura secundaria de cada péptido simulado alineadas. Izquierda: de N-terminal a C-terminal.....	52
<b>4.23</b> Representación del puente de hidrógeno formado por los residuos K y S.....	53
<b>4.24</b> Representación del péptido H con el carboxilo de la serina C-terminal ligado a Ti(OPr <sup>i</sup> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup> .....	54
<b>4.25</b> Modelo de complejación de titanio con grupos amino.....	54



## Resumen

Existen numerosos ejemplos en la naturaleza de organismos que son capaces de sintetizar materiales inorgánicos con estructuras complejas. Este proceso de biomineralización es posible gracias a moléculas muy específicas que controlan la formación de estas estructuras tales como, carbohidratos, lípidos, péptidos y proteínas.

En este trabajo se emplean heptapéptidos, para formar estructuras de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  en condiciones suaves de reacción (pH neutro, soluciones acuosas, temperatura ambiente), tratando de imitar la síntesis biológica. Partiendo de la secuencia HKKPSKS que presenta afinidad a anatasa, se proponen algunas mutaciones de ésta para estudiar los efectos que provocan las mutaciones puntuales, el cambio de pH, relación molar alcóxido:péptido y el tipo de precursor. Además se realizaron simulaciones por dinámica molecular para dilucidar la conformación de los péptidos usados y tener una idea más clara del proceso de biomineralización.

Entre los resultados más relevantes está la obtención a temperatura ambiente de redes nanométricas de  $\text{TiO}_2$  con regiones cristalinas y nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  con tamaño promedio de 30 nm. La síntesis de estos óxidos nanoestructurados se logró únicamente usando el péptido de referencia, lo que demuestra la gran especificidad de las secuencias peptídicas.

Por otro lado, la fotocatalisis de la degradación de azul de metileno con el  $\text{TiO}_2$  obtenido resultó tan eficiente como con las nanopartículas de anatasa comercial <25 nm.

## Capítulo 1 Antecedentes

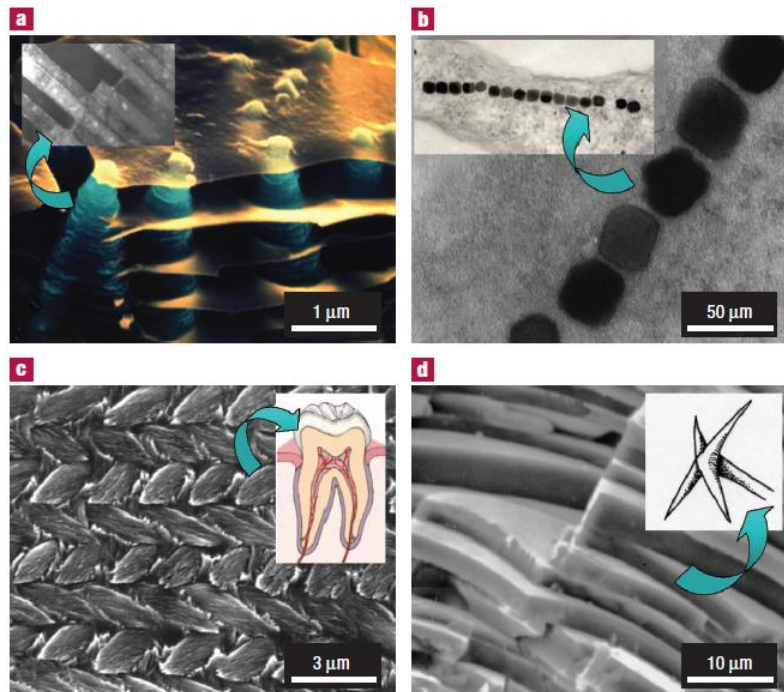
### 1.1 Introducción

El dióxido de titanio,  $\text{TiO}_2$ , es un material multifuncional de bajo costo, no es tóxico y tiene una gran estabilidad termodinámica.<sup>1</sup> Sus aplicaciones van desde la fabricación de celdas solares, sensores, pinturas, cosméticos hasta su uso en el tratamiento de aguas residuales y como agente fotosensible para terapias contra el cáncer.<sup>2, 3</sup> Actualmente el  $\text{TiO}_2$  es el más prometedor fotocatalizador, con expectativas para ser un material fundamental en la solución de los problemas ambientales y también en la ayuda de la crisis energética con la utilización efectiva de la energía solar a través de dispositivos fotovoltaicos y de producción de hidrógeno.<sup>3</sup> Es por ello que se han realizado enormes esfuerzos en la investigación de  $\text{TiO}_2$ , lo que ha permitido muchas nuevas aplicaciones en distintas áreas científicas y tecnológicas.

Para continuar explorando todas las ventajas que ofrece el  $\text{TiO}_2$  resulta obligatorio el diseño y elaboración de materiales avanzados exhibiendo estructuras o arquitecturas únicas, nuevas, y muchas veces complejas, en donde es imprescindible tener un elevado control no sólo sobre la estructura y la presencia de defectos, impurezas y/o determinados grupos funcionales que garanticen determinadas propiedades, sino también sobre la textura o porosidad (a nivel micro-, meso- y macroporoso). Por lo tanto, se necesita de una nueva era en la química centrada en el reconocimiento a nivel molecular, con superficies accesibles e interfaces bien definidas que determinan la función y utilidad. Esta estrategia debe ser altamente multidisciplinar y entran en juego conceptos propios de química supramolecular, diseño molecular, autoensamble, biomimetismo, entre otros.<sup>4, 5</sup>

Actualmente, las rutas de síntesis para producir  $\text{TiO}_2$  y en general óxidos metálicos funcionalizados implican tiempos largos de reacción, altas temperaturas y gran cantidad de energía. Técnicas como la ablación láser, técnicas por sol-gel, métodos hidrotérmicos, deposición química de vapor (CVD), electrodeposición, fotolitografía u oxidación directa implican altos costos monetarios pero sobre todo ambientales, pues se utilizan sustancias químicas peligrosas.<sup>3, 6</sup> Debido a las desventajas de estos métodos de síntesis tradicionales y a la insaciable demanda de nuevos materiales para tecnologías emergentes, es muy clara la necesidad de proponer un cambio en las rutas de síntesis.

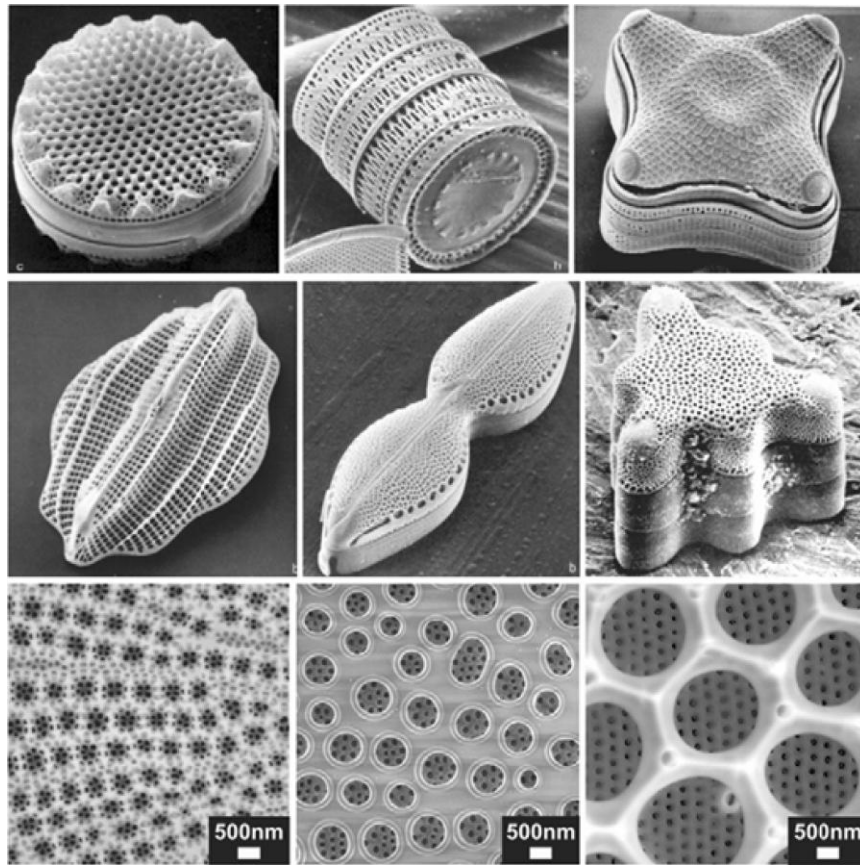
Paradójicamente, desde hace cientos de años, la naturaleza ha tenido la solución para los problemas en la síntesis de materiales multifuncionales. Muchas estructuras complejas con un control a nivel molecular en condiciones ambientales son sintetizadas por organismos incluso unicelulares. Los ejemplos de las síntesis inorgánica en la naturaleza son muy variados, por ejemplo: dientes, huesos, conchas de mar, cáscaras de huevo, magnetosomas, exoesqueletos, etcétera<sup>4, 7</sup> (Figura 1.1). A este tipo de síntesis de estructuras inorgánicas dirigidas por biomoléculas se le conoce como biomineralización.



**Figura 1.1** Ejemplos de materiales complejos sintetizados biológicamente, a) Imagen de microscopía electrónica de barrido (SEM) del borde de un abulón compuesto por placas de aragonito (azul) separadas por una capa orgánica que eventualmente se vuelve nácar. b) nanopartículas de magnetita monocristalina formadas por una bacteria magnetotáctica. c) El esmalte de los dientes es un material duro, resistente al desgaste con una arquitectura altamente micro/nano organizada, consistente en cristales de hidroxiapatita que se ensamblan en una estructura tejida. d) La espícula de una esponja Rosella tiene óxido de silicio laminado con excelentes propiedades ópticas y mecánicas, una fibra óptica biológica.<sup>4</sup>

Estas síntesis biológicas complejas se logran a través de macromoléculas como carbohidratos, lípidos, péptidos y proteínas, entre otros. Por ejemplo, se ha encontrado que en la biomineralización de espículas silíceas en esponjas y frústulas de diatomeas están asociadas pequeñas proteínas llamadas *silafinas* y *silicateínas* que interactúan con ácido silícico para formar estructuras bien organizadas de óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), Figura 1.2.<sup>8, 9</sup> Tal perfección en la síntesis

inorgánica motiva a los científicos a lograr imitar el laboratorio químico de la naturaleza, acuñando un nuevo campo en la ciencia: la biomimética.



**Figura 1.2** Micrografías de varias especies de diatomeas. La pared celular está compuesta por sílice.<sup>7</sup>

Entre los materiales biomimetizados están por ejemplo la síntesis de nanopartículas arregladas helicoidalmente usando ADN como bioplantilla,<sup>10</sup> aerogel de óxido de silicio con ayuda de polisacáridos<sup>11</sup> y también biomineralización con silafinas para la autoorganización de  $\text{SiO}_2$  como sucede en las diatomeas.<sup>12</sup> En especial, las proteínas proveen una ventaja única: la posibilidad de regular la biomineralización por medio de cambios de su carga neta y su estructura (secundaria y terciaria) por medio del pH y la temperatura.

De esta manera, la biomimética a través de las proteínas ofrece simultáneamente tres soluciones al desarrollo de nanoestructuras multifuncionales: La primera es que las proteínas usadas como plantillas pueden ser diseñadas a nivel molecular por medio de la manipulación genética. Esto garantiza un control completo de la estructura molecular de la proteína base (tecnología basada en ADN). La segunda es que las superficies específicas de las proteínas pueden ser usadas como

conectores para unir entidades sintéticas, incluyendo nanopartículas, polímeros u otras nanoestructuras sobre la superficie de las proteínas, es decir, las plantillas moleculares (reconocimiento molecular y a nanoescala). La tercera solución aprovecha la habilidad de las moléculas biológicas para auto- y coensamblarse a nivel nanométrico. Esto asegura un proceso robusto de ensamblaje para lograr nanocomplejos y posiblemente estructuras jerárquicas similares a las que se encuentran en la naturaleza.<sup>4</sup>

Las interacciones entre proteínas con superficies inorgánicas han sido estudiadas con el objetivo de predecir y entender la conformación de la proteína, determinar el sitio activo, la estructura del complejo y los detalles cinéticos.<sup>13</sup> Además se han utilizado para la síntesis de algunos materiales inorgánicos como el SiO<sub>2</sub> variando el tipo de proteína<sup>14</sup> y el pH<sup>15</sup>. Sin embargo, debido a la complejidad de las proteínas, es aún muy difícil explicar de manera detallada la forma en que éstas interaccionan y guían la síntesis. Por ello, las investigaciones sobre biomateriales en su mayoría se han enfocado en péptidos pequeños.<sup>16, 17</sup>

Existen algunos trabajos que han dado propuestas de cómo los péptidos pueden interaccionar con los materiales,<sup>18-20</sup> los cuales demuestran que la naturaleza de los residuos en los péptidos confiere selectividad a compuestos inorgánicos. Y al igual que con las proteínas, los péptidos se han utilizado para biomineralizar desde metales hasta óxidos.<sup>21-26</sup>

No obstante, hace falta investigar más sobre la interacción de proteínas o péptidos con superficies de óxidos metálicos, especialmente a nivel molecular e indagar otros aspectos más puntuales como el camino de reacción en la síntesis biomimética.<sup>17</sup> Si se logran tales objetivos, podrían diseñarse *ab initio* péptidos que controlen específicamente la síntesis de cierto material, pues actualmente las propuestas de esas secuencias peptídicas para biomateriales son en su mayoría empíricas.

De los resultados y conclusiones actualmente reportados para la biomineralización aún no se tiene claro qué factores son los determinantes para obtener una biomineralización *ad hoc*. Por lo tanto, hacen falta estudios sistemáticos que expliquen los principios generales relacionados con la composición química y arreglo espacial de éstos para las funciones de interfase y especificidad tales como:<sup>16</sup>

1. ¿Qué grupos funcionales en los aminoácidos son suficientes para enlazar péptidos de cadena corta en la superficie de materiales inorgánicos?

2. De qué manera proponer la secuencia de aminoácidos más adecuada para obtener un arreglo espacial adecuado para una interacción mayor con un material en particular.
3. ¿Qué tipo de interacciones son las que dirigen la biomineralización?

## 1.2 Dióxido de titanio

El dióxido de titanio ( $\text{TiO}_2$ ) es un material muy bien conocido por su gran número de aplicaciones debido a sus propiedades ópticas, químicas y mecánicas.<sup>27</sup> Desde su producción comercial a inicios del siglo XX, el  $\text{TiO}_2$  ha sido utilizado como pigmento y en bloqueadores solares, pinturas, pasta dental, etc. En 1972 Fujishima y Honda descubrieron el fenómeno de fotólisis del agua sobre un electrodo de  $\text{TiO}_2$  bajo radiación ultravioleta (UV).<sup>28</sup> A partir de esto, se han realizado enormes esfuerzos en la investigación de este óxido y actualmente es el monocristal más estudiado en la ciencia de superficies.<sup>29</sup> Esto ha generado muchas aplicaciones prometedoras desde fotovoltaicas y fotocatalíticas hasta fotoelectrocromáticas y sensores.<sup>3</sup>

### 2.1.1 Propiedades fisicoquímicas

El  $\text{TiO}_2$  es un óxido semiconductor de tipo n de marcado carácter iónico, por lo que se puede considerar formado por iones  $\text{Ti}^{4+}$  y  $\text{O}^{2-}$ . Este óxido puede presentarse con estructura amorfa o cristalina. Las tres principales fases cristalinas son: anatasa, rutilo y brookita (Tabla 1.1) con una banda prohibida (*bandgap*) de 3.2, 3.02 y 2.96 eV respectivamente.<sup>29</sup>

El rutilo tiene una estructura tetragonal y contiene 6 átomos en su celda unidad, el octaedro  $\text{TiO}_6$  está ligeramente distorsionado. El rutilo es una estructura muy estable a altas temperaturas y presiones de hasta 60 kbar. Las estructuras de anatasa y brookita pueden transformarse a la fase de rutilo a temperatura elevada y también después de cierto tamaño de partícula, siendo el rutilo más estable que anatasa para tamaños de partícula mayores a 14 nm. La actividad fotocatalítica del rutilo es en general muy pobre, aunque podría activarse dependiendo de las condiciones de preparación.<sup>29</sup>

La anatasa también tiene una estructura tetragonal pero la distorsión de los octaedros de  $\text{TiO}_2$  es ligeramente mayor para esta fase, como se muestra en la Figura 1.3. En la anatasa las distancias Ti-Ti son mayores que en el rutilo mientras que las distancias Ti-O son menores. La estructura de anatasa es la preferida para aplicación en celdas solares y fotocatalisis por su alta movilidad de electrones, baja constante dieléctrica y menor densidad. El incremento en la fotoreactividad en

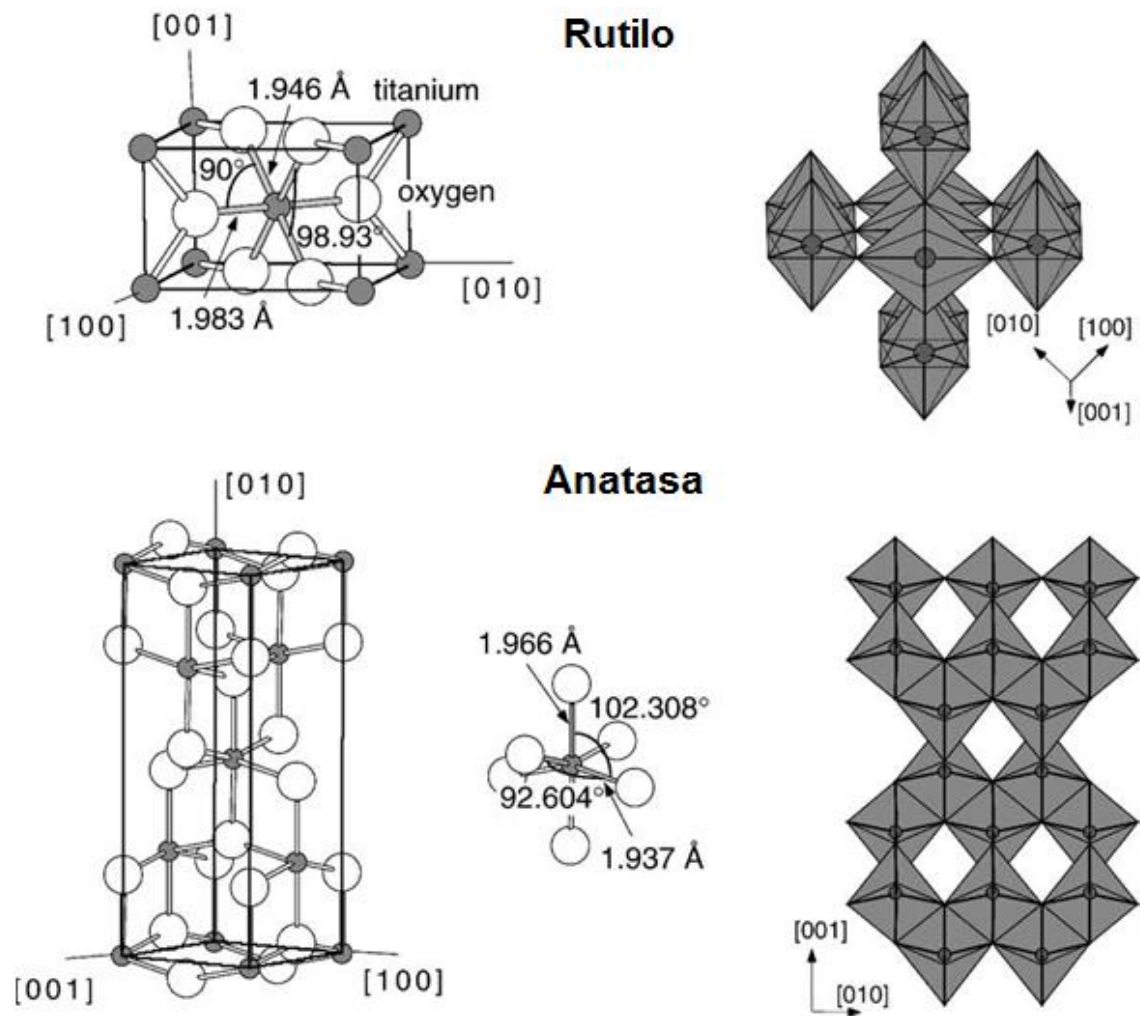
la fase anatasa es debida al alto nivel de Fermi, baja capacidad para adsorber oxígeno y alto grado de hidroxilación. Hay cierta evidencia de que incluso la disposición de los planos cristalinos en la superficie del  $\text{TiO}_2$  afecta la reactividad.<sup>30</sup>

La brookita pertenece al sistema cristalino ortorrómbico. Su celda unidad está compuesta de 8 unidades fórmula de  $\text{TiO}_2$  y se forma por aristas compartidas de los octaedros  $\text{TiO}_6$  (Figura 1.4). Esta estructura es más complicada, tiene un gran volumen de celda y no es utilizada comúnmente para investigaciones experimentales.

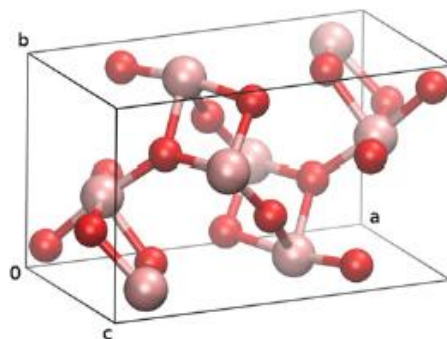
Las propiedades del  $\text{TiO}_2$  dependen de la estructura, forma y tamaño; por ejemplo, nanopartículas de anatasa son frecuentemente elegidas para fotocatalisis, mientras que el rutilo posee alto índice de refracción y se prefiere para aplicaciones ópticas (pigmentos, bloqueadores solares).<sup>9</sup>

**Tabla 1.1** Datos de las principales estructuras cristalinas para  $\text{TiO}_2$ .<sup>29, 31</sup>

<b>Propiedades</b>	<b>Rutilo</b>	<b>Anatasa</b>	<b>Brookita</b>
Estructura cristalina	Tetragonal	Tetragonal	Ortorrómbica
Parámetros de red	a=4.5936 c=2.9587	a=3.784 c=9.515	a=9.184 b=5.447 c=5.154
Grupo espacial	$P4_2/m$	$I4_1/amd$	Pbca
Moléculas (celda)	2	2	4
Volumen/molécula ( $\text{Å}^3$ )	31.2160	34.061	32.172
Densidad ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )	4.13	3.79	3.99
Longitud de enlace Ti-O ( $\text{Å}$ )	1.949 1.980	1.937 1.965	1.87-2.04
Ángulo de enlace O-Ti-O	81.2° 90.0°	77.7° 92.6°	77.0°-105°



**Figura 1.3** Estructuras cristalinas de rutilo y anatasa.<sup>31</sup>



**Figura 1.4** Celda unidad de la fase brookita.<sup>32</sup>



### 1.3 Biomimética

Existe una larga e inspiradora historia que describe el diseño de materiales tomada de la naturaleza. Sin embargo, la naturaleza sigue siendo aun muy superior a lo que nosotros somos capaces de hacer o adaptar. La precisión de la naturaleza en la síntesis, molécula por molécula, va desde nanoestructuras altamente ordenadas hasta sitios reactivos genéticamente controlados. Los materiales hechos por el hombre requieren técnicas complicadas, temperaturas y presiones altas. En contraste, la síntesis biológica ocurre a condiciones ambientales y produce mínimos remanentes no contaminantes y biodegradables.<sup>4, 8, 33</sup>

Por otra parte, los sistemas biológicos siempre han demostrado su habilidad para hallar soluciones en múltiples facetas dentro del mundo real de problemas, usando un riguroso proceso de selección natural. Esta gran versatilidad de la biología anima a los investigadores a desarrollar síntesis híbridas derivadas de la naturaleza.<sup>6</sup> Surge de esta manera la tendencia a imitar las síntesis de sistemas biológicos dando como resultado un nuevo campo en la ciencia: la biomimética.

Esta ciencia representa el estudio e imitación de los métodos, diseños y procesos de la naturaleza para lograr nuevos y mejores materiales.<sup>34</sup> Algunas estructuras biológicas han sido utilizadas para la construcción de materiales inorgánicos jerárquicos, que incluyen ADN, polisacáridos, proteínas, virus, diatomeas y placas óseas, alas de mariposa, conchas, fibras de seda, cabello, madera y plantas (hojas, granos de polen), etc.<sup>14, 25, 35-39</sup>

Generalmente en las síntesis biológicas, las proteínas son las responsables del alto control en la formación de los materiales inorgánicos con tamaño, estructura, forma, orientación espacial y organización bien definida; así como de las propiedades mecánicas que superan a los materiales sintéticos del mundo inorgánico.<sup>15, 25, 40</sup>

#### 1.3.1 Síntesis de autoensamble

El autoensamble molecular representa un tema central en la nanotecnología moderna.<sup>41</sup> El término *autoensamble* se define como la organización autónoma de estructuras altamente ordenadas a partir de elementos de bajo orden.<sup>34, 42</sup> El autoensamble es la base de las estructuras de todos los organismos vivos, los cuales generan estructuras tridimensionales con precisión a nanoescala, por ejemplo las membranas celulares. Como resultado, muchos órdenes de magnitud en tamaño pueden diferenciar a los elementos iniciales del sistema final formado.

Esta característica biológica ha sido propuesta como una herramienta en el desarrollo y diseño de estructuras, dispositivos y sistemas. Los progresos usando la técnica de autoensamble han permitido el ajuste dirigido de microdispositivos en sustratos o arreglos bi- y tri-dimensionales de cristales.<sup>34, 43</sup> Desafortunadamente poco se conoce sobre los mecanismos detallados de los procesos de autoensamble que incluso, en algunos casos, moléculas que no constituyen la estructura final están involucradas.<sup>44</sup>

Hay dos principales tipos de autoensamble: estático y dinámico.<sup>42</sup> El autoensamble estático implica sistemas que están en un equilibrio global o local y no disipan energía. Por ejemplo, los cristales moleculares se forman por autoensamble estático. En este caso, la formación de las estructuras ordenadas puede requerir energía (por ejemplo en forma de agitación), pero una vez formadas, son estables. La mayor parte de la investigación en autoensamble se ha enfocado a este tipo en particular.

En el autoensamble dinámico, las interacciones responsables de la formación de estructuras o patrones entre componentes solamente ocurren si el sistema disipa energía. Los patrones formados por competencia entre reacción y difusión en las reacciones químicas oscilantes son ejemplos simples; las células son un tipo más complejo. El estudio de este tipo de autoensamble está apenas comenzando y se espera que en un futuro sea uno de los métodos de síntesis más eficientes y permita un mayor desarrollo de materiales novedosos.

Los componentes que se autoensamblan deben ser capaces de moverse respecto a otros para que las atracciones y repulsiones sean balanceadas por sus estados estacionarios. El autoensamble molecular implica interacciones débiles o no covalentes (van der Waals, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno) y enlaces de coordinación.<sup>42</sup> Debido a que el autoensamble requiere que los componentes sean móviles, usualmente se lleva a cabo en fluidos o sobre superficies blandas. El ambiente puede modificar las interacciones entre los componentes, el uso de fronteras físicas u otras restricciones en el autoensamble es particularmente importante, porque éstas pueden reducir defectos y controlar las estructuras.

El equilibrio es requerido para obtener estructuras ordenadas. Si los componentes se enlazan irreversiblemente cuando colisionan, pueden formar un vidrio en vez de un cristal u otra estructura regular. Por ello, resulta necesario que los componentes estén en equilibrio entre el estado agregado y libre o ajustar sus posiciones relativas a alguna otra una vez agregadas.

Específicamente, los péptidos son en gran medida los elementos de construcción (*building blocks*) para autoensamble biológico y bio-inspirado. La secuencia de aminoácidos provee diferentes propiedades fisicoquímicas lo que les confieren actividad catalítica y pueden enlazarse a metales o a otros materiales inorgánicos.<sup>41</sup> Por lo tanto, el autoensamble provee una solución a la fabricación de estructuras ordenadas de componentes con tamaños de nanómetros hasta micrómetros. Este intervalo de tamaños será importante para el desarrollo de la nanotecnología (y la expansión de microtecnología en áreas distintas a la microelectrónica). También el entendimiento de las estructuras y procesos biológicos será determinante para lograr la mímica sintética de éstos, los cuales ofrecerán oportunidades para construir sistemas con nuevos tipos de función.<sup>42</sup>

### 1.3.2 Biomimética en el proceso sol-gel

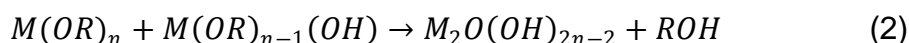
El autoensamble en un sistema acuoso es usualmente dirigido por factores entrópicos, donde la asociación de módulos está acompañada de una exclusión de moléculas ordenadas de agua.<sup>45</sup> Al parecer el método más factible para lograr una réplica de la síntesis biológica de autoensamble parece ser la técnica de sol-gel.

El método sol-gel es utilizado para la síntesis de óxidos metálicos. Consiste en reacciones de hidrólisis y condensación que se llevan a cabo de manera consecutiva. La síntesis por sol-gel puede partir de precursores inorgánicos (sales inorgánicas) u orgánicos (alcóxidos metálicos). Las reacciones principales de hidrólisis y condensación a partir de cierto alcóxido  $M(OR)_n$  son

Hidrólisis:



Condensación:



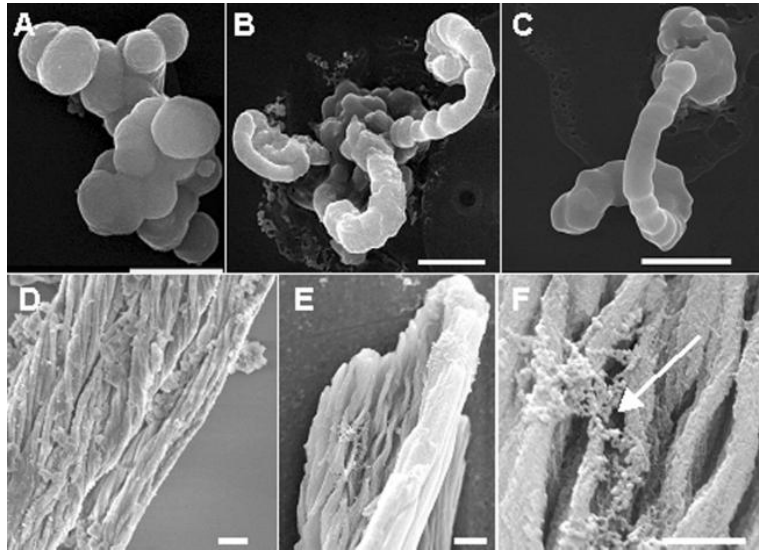
La inspiración del método sol-gel para biomimetizar surge del descubrimiento del proceso natural de la síntesis inorgánica en las diatomeas y esponjas. Estos organismos usan la síntesis sol-gel para formar su exoesqueleto, siendo las silafinas las moléculas que interaccionan con el ácido silícico (el producto de hidrólisis del sol-gel) para luego formar la red de  $SiO_2$  (condensación)<sup>46</sup>.

El proceso sol-gel ofrece varias ventajas sobre otros métodos, pues implica un procedimiento simple, a baja temperatura y con gran homogeneidad<sup>14</sup>. Una vez que las bioplantillas se introducen en el sol, una serie de intrincadas reacciones de

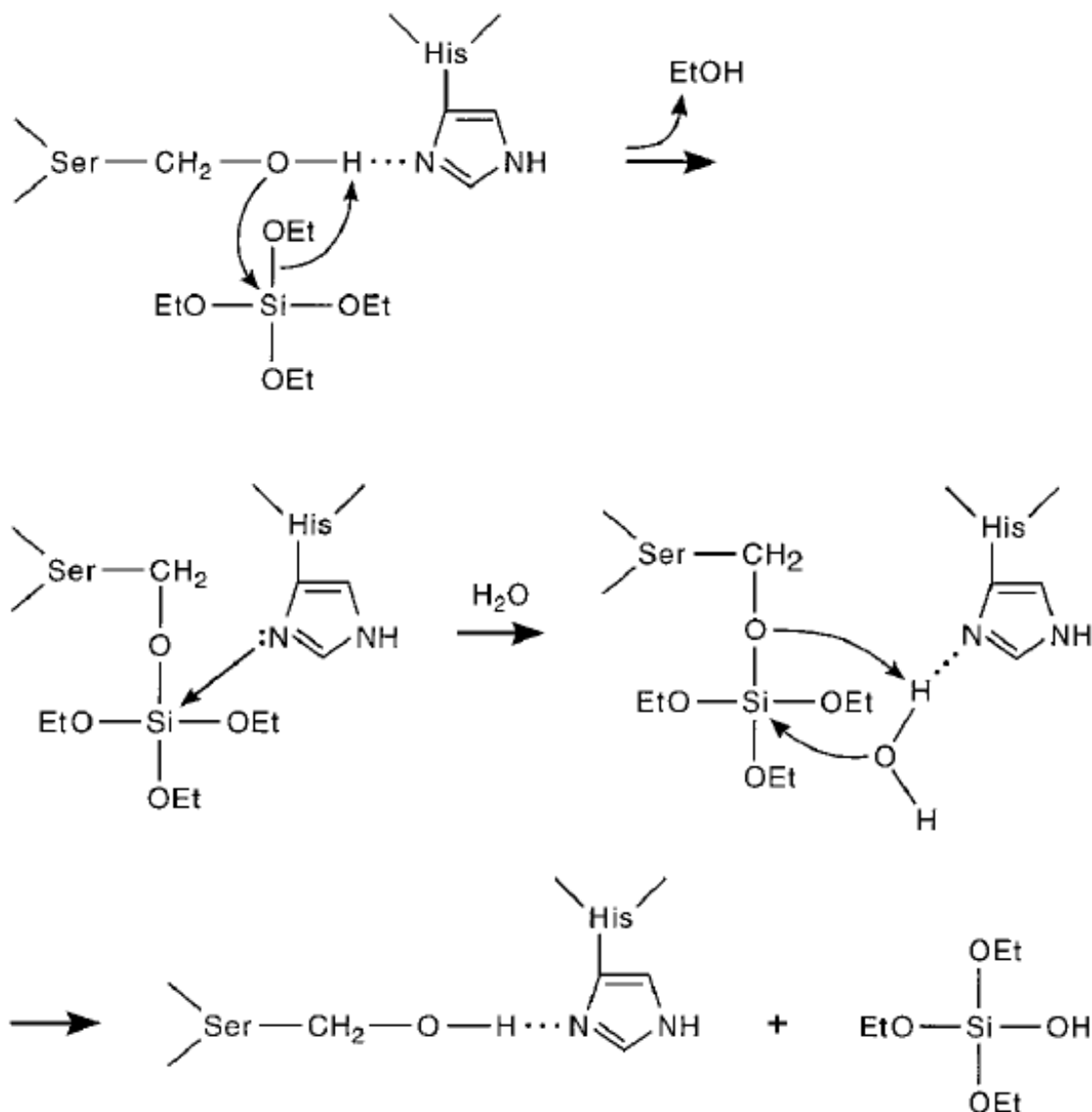
hidrólisis y condensación suceden durante la transición sol-gel y cuyo resultado son estructuras más o menos ordenadas. Esto podría permitir fácilmente la preparación de óxidos metálicos jerarquizados tales como  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{ZrO}_2$ , etc. Además, de acuerdo a Dong *et al.*<sup>14</sup> la síntesis biomimética asociada con el proceso sol-gel sería la técnica ideal para el diseño y fabricación de materiales funcionales con propiedades físicas y químicas predeterminadas.

En el caso de óxido de silicio, se han probado dos rutas del método sol-gel: la primera fue usar biomoléculas extraídas de organismos que controlan la formación de  $\text{SiO}_2$  (*silafinas*). En general, estas bioplantillas han mostrado ser eficientes en la formación de  $\text{SiO}_2$  activado además de controlar su morfología a nanoescala. Un buen ejemplo es el uso del péptido R5, el cual es el encargado de activar la formación de  $\text{SiO}_2$  en las diatomeas.<sup>47</sup> Este péptido se ha utilizado para formar nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ <sup>48</sup> e incluso para la síntesis de  $\text{TiO}_2$ <sup>49</sup>. Estas pruebas se han realizado imitando la dinámica de los compartimientos celulares donde la deposición de  $\text{SiO}_2$  ocurre, perturbaciones externas tales como fuerzas de corte también se usaron para inducir nuevas morfologías de  $\text{SiO}_2$  (Figura 1.5).<sup>50</sup> Sin embargo, existen muchas diferencias en cuanto a la naturaleza y composición de las biomoléculas extraídas de diferentes organismos. En consecuencia, el modo de interacción con los precursores de silicio puede ser muy distinto. La segunda ruta implica el uso de moléculas modelo que comparten características estructurales y funcionales similares a las extraídas de la naturaleza. En particular, se observó que estas biomoléculas son ricas en grupos amino, lo que condujo a muchas investigaciones sobre las interacciones entre precursores de silicio y polipéptidos ricos en grupos amino, tales como polilisina, poliarginina o polietilenimina. Estos sistemas mostraron la habilidad de las poliaminas para activar la formación de  $\text{SiO}_2$ .

La habilidad de las moléculas extraídas y sus mutantes poliamínicas para inducir la formación de  $\text{SiO}_2$  en condiciones que son compatibles con la preservación de su actividad biológica, abre la posibilidad de desarrollar nuevos procesos de biosíntesis.<sup>46</sup> Las silafinas en general tienen un comportamiento tipo enzimático debido a la presencia de una triada de aminoácidos (serina, histidina y asparagina) que actúan como sitio activo para la hidrólisis de alcóxidos de silicio, los cuales actúan como especies donadoras-aceptoras.<sup>51</sup> La propuesta del mecanismo de reacción de estas silafinas se muestra en la Figura 1.6. En primer lugar, ocurre un ataque nucleofílico del oxígeno del grupo alcohol de la serina del sitio activo hacia el alcóxido, formando un intermediario proteína-sustrato que es estabilizado por el par de electrones disponibles del grupo imidazol de la histidina. Después de esto, una hidrólisis de este intermediario catalizada por la histidina da como resultado un silanol y regenera el par serina-histidina.



**Figura 1.5** Imágenes de SEM de estructuras de  $\text{SiO}_2$  obtenidas usando el péptido R5. (A) estructuras esféricas de  $\text{SiO}_2$  obtenidas bajo condiciones de reacción estáticas. (B) y (C) morfologías arqueadas obtenidas burbujeando nitrógeno gaseoso en la mezcla de reacción. (D) y (E) morfologías fibrilares obtenidas aplicando corte mecánico a la mezcla de reacción. (F) aglomerados rugosos de esferas de  $\text{SiO}_2$  (flecha). Escala  $1\mu\text{m}$ .<sup>50</sup>



**Figura 1.6** Esquema del mecanismo de reacción propuesto para la biomineralización de  $\text{SiO}_2$  catalizada por una silicateína a partir de tetraetilortosilicato (TEOS).<sup>51</sup>

Otros estudios sobre síntesis de  $\text{SiO}_2$  biomimética realizados por Shchipunov y Shipunova, utilizan técnicas de sol-gel junto con polisacáridos<sup>11, 35</sup> y proteínas<sup>15</sup> como bioplantillas. Estos experimentos revelaron dos características por las cuales la formación de hidrogeles híbridos bioplantilla-sílice pueden ser distinguidos del proceso común de sol-gel.

1.- La condensación se lleva a cabo en condiciones a las cuales no se logra en ausencia de las biomoléculas, por ejemplo a pH neutros. Esto sugiere que las bioplantillas tienen un efecto catalítico sobre el proceso sol-gel.

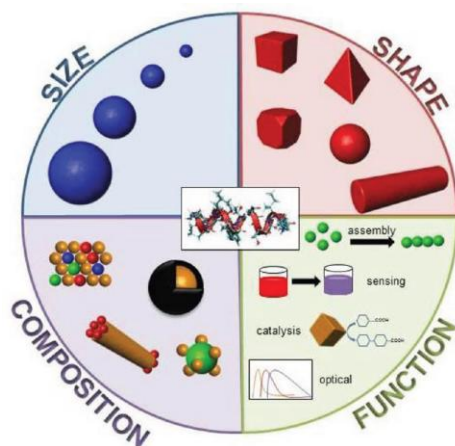
2.- Al utilizar proteínas, el hidrogel formado fue un monolito. No se observó precipitación o separación de fases, lo que difiere con otros métodos donde la sílice formada precipita.

Estas conclusiones prometen múltiples opciones para la síntesis por autoensamble. Un punto importante es que el efecto guía de la estructura está basado en los cambios conformacionales de las bioplantillas. Especialmente, en las proteínas estos cambios pueden ser regulados por una simple variación del pH o la temperatura. Además, por técnicas de biología molecular son posibles las modificaciones puntuales en la secuencia de residuos y su bioconjugación. De esta manera, las vías para regular la estructura proteica y así la morfología de los nanomateriales son ampliamente diversas.

Y, es mencionado por J. Livage,<sup>46</sup> debido a las enormes potencialidades de materiales biomiméticos y su popular incremento “los enfoques de biomimetismo en el campo de los materiales sintetizados por sol-gel se pueden prever”.

### **1.3.3 Biomineralización con péptidos**

La biomineralización es la formación de minerales ocurrida naturalmente en organismos vivos. Este proceso es biológicamente inducido y controlado. Como se ha mencionado, algunas secuencias peptídicas pueden tener especificidad a ciertos materiales inorgánicos (óxido metálicos principalmente). En organismos vivos los péptidos juegan papeles importantes en el control de la biomineralización de nanoestructuras inorgánicas y en la dirección de la organización de materia blanda, ya que éstos poseen una gran diversidad química de grupos funcionales (-COO<sup>-</sup>, -SH, -OH, -NH<sub>2</sub>), aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos, diferentes estructuras secundarias (cadenas aleatorias, alfa hélice, hélice 3<sub>10</sub>, hojas beta) y patrones de bio-reconocimiento. Además los péptidos son fáciles de sintetizar, relativamente baratos y pueden ser fácilmente decorados con modificaciones químicas o biológicas.<sup>41</sup> Todas esas características, además de la secuencia de aminoácidos pueden contribuir a la actividad de biomineralización<sup>25</sup> lo cual promete una gran versatilidad del uso de péptidos para las síntesis de nuevos materiales, Figura 1.7.



**Figura 1.7** Capacidades potenciales de péptidos para el control de diferentes características de nanomateriales inorgánicos, como son tamaño, forma, composición y función.<sup>52</sup>

El aislamiento de péptidos capaces de biomineralizar naturalmente y el estudio de sus estructuras y funciones *ex vivo* ha permitido una mejor comprensión de algunos procesos de mineralización inorgánica. En muchos casos, estos péptidos son usados para sintetizar nuevos materiales inorgánicos.<sup>53</sup>

### 1.3.3.1 Selección de péptidos con interacción específica

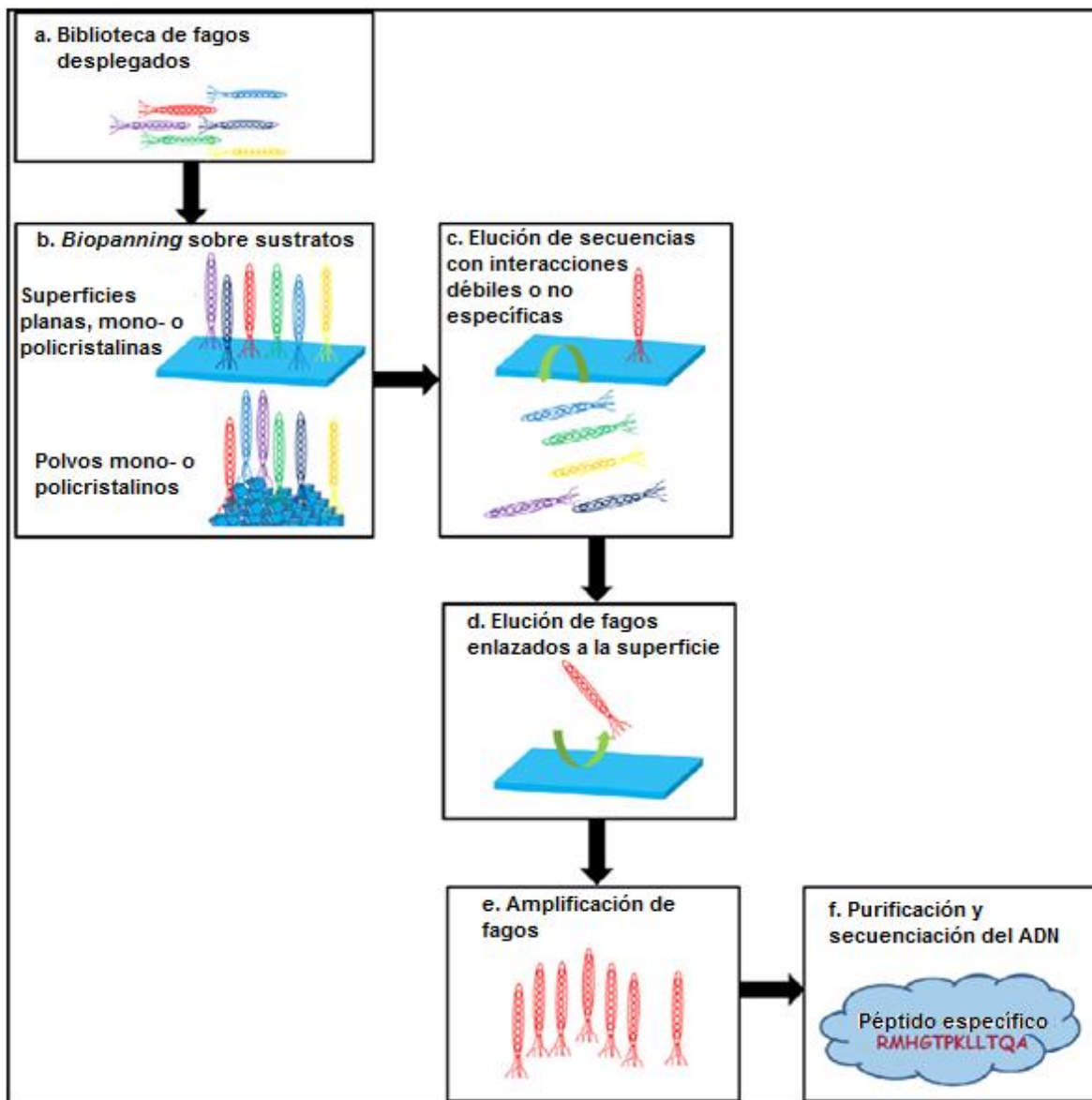
La principal limitante que tiene la biomimética es el reducido número de biomoléculas conocidas capaces de biomineralizar. En principio, únicamente los materiales inorgánicos que se sabe que son sintetizados por organismos vivos podrían sintetizarse por biomineralización en condiciones *in vitro*. Por esta razón se han buscado métodos que logren predecir qué biomoléculas serían capaces de tener actividad en la síntesis de materiales inorgánicos.

En la última década, una técnica combinatoria de biología molecular ha comenzado a utilizarse como herramienta en la búsqueda de secuencias peptídicas capaces de inducir la biomineralización. Esta técnica llamada biblioteca de fagos desplegados<sup>54</sup> (*phage display library*) consiste en una colección de variantes de un péptido que se expresa en la superficie de fagos (virus que infectan a bacterias). Generalmente se utiliza el fago filamentoso M13, el cual se modifica su genoma para codificar cada variante dentro de ellos y expresarlo en su superficie.<sup>55</sup> Esto permite tener en cada fago secuencias aleatorias de cadenas polipeptídicas (casi las  $20^n$  secuencias diferentes posibles,  $n$  es el número de residuos) que sirven como puente físico para enlazarse con otro material. Inicialmente esta técnica fue utilizada para la búsqueda de anticuerpos y, debido a que no se necesita un conocimiento *a priori* sobre la secuencia de aminoácidos



deseada, ha resultado una técnica muy útil en otras áreas de la ciencia, tal como la biomimética.<sup>4</sup>

Para seleccionar los péptidos desplegados en fagos que presentan afinidad a cierto material a partir de las secuencias aleatorias se realiza un barrido<sup>56</sup> (*biopanning*) donde la biblioteca de fagos desplegados se pone en contacto con el material de interés (Figura 1.8 a, b) y posteriormente se realizan lavados para eliminar los fagos con secuencias no específicas (Figura 1.8 c, d). Por último los fagos que se enlazaron específicamente al material (química o estructuralmente) son amplificados para su posterior secuenciación (Figura 1.8 e, f).



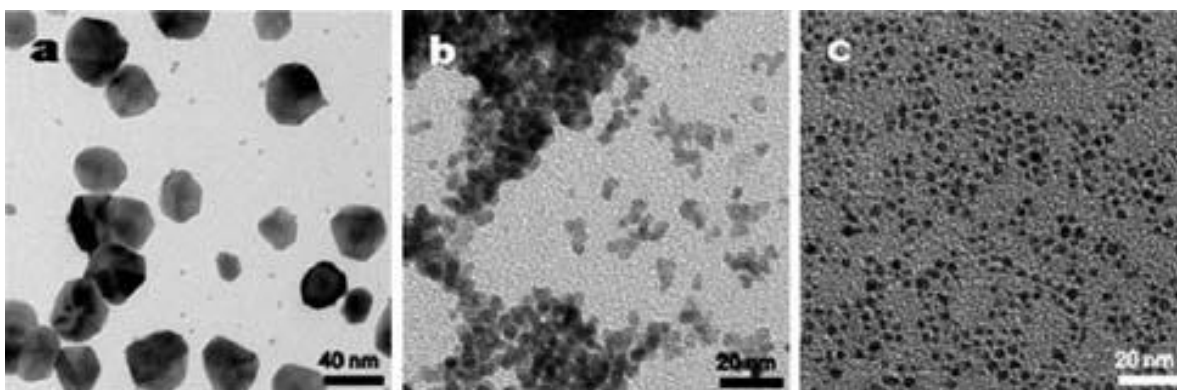
**Figura 1.8** Pasos para hallar secuencias específicas a materiales por medio de un *biopanning*.<sup>57</sup>

Sin embargo, hallar secuencias peptídicas con afinidad específica al material de interés no asegura que sea capaz de inducir la formación de éste, pero una interacción fuerte entre el péptido y el material inorgánico motiva la posibilidad de que éste pueda dirigir en buena manera la biomineralización. Por lo tanto resulta una buena guía para la síntesis de materiales pues es una técnica relativamente sencilla para seleccionar secuencias particulares, de las  $20^n$  posibles, con mayor probabilidad de actividad biomineralizadora. Actualmente existen reportes de varias secuencias peptídicas específicas a metales, óxidos metálicos, sales metálicas, semiconductores, etcétera.<sup>4, 25, 53, 57, 58</sup>

### 1.3.3.2 Biomineralización usando péptidos específicos

La biomineralización con péptidos surgió del descubrimiento de los polipéptidos de diatomeas y esponjas involucrados en la síntesis de  $\text{SiO}_2$ . Los resultados positivos han dado pie a la búsqueda de síntesis *in vitro* de muchos otros materiales inorgánicos por ejemplo metales, óxidos metálicos y semiconductores.

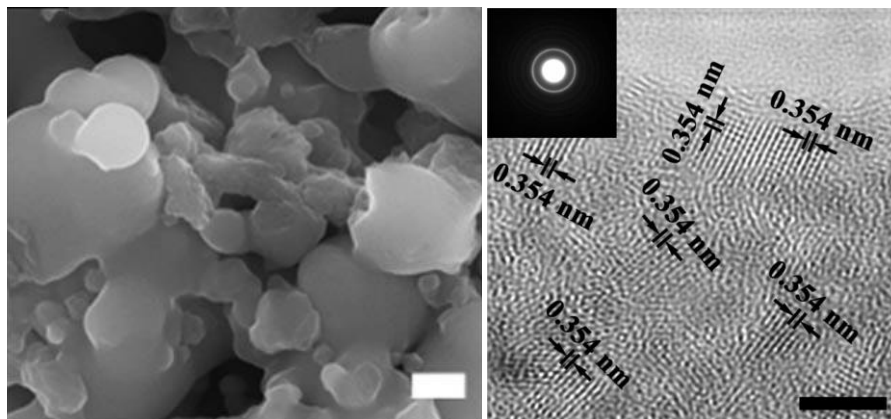
En el caso de biomineralización de metales, se han probado péptidos con afinidad a éstos para sintetizar nanopartículas de manera controlada.<sup>21-24</sup> Entre los resultados más interesantes están los reportados por Huang *et al.*<sup>22</sup> quienes aislaron de una biblioteca de fagos desplegados de 7 residuos la secuencia Q7 (QQSWPIS) con afinidad al paladio (Pd). Ellos usaron este péptido para la síntesis de nanocristales de Pd y observaron que éste actúa controlando la formación de las nanopartículas, Figura 1.9. Para comprobar la selectividad del péptido también usaron un péptido no específico, con el cual el efecto del control sobre el tamaño y forma fue prácticamente nulo.



**Figura 1.9** (a-c) Imágenes de TEM de nanopartículas de Pd sintetizadas: a) en ausencia de péptido, b) Usando un péptido no específico, c) Usando el péptido específico Q7.<sup>22</sup>

Los óxidos metálicos también han llamado la atención a los científicos para lograr síntesis controladas por medio de péptidos específicos. Particularmente en el caso del óxido de titanio no se conoce todavía ningún organismo donde el titanio sea esencial, lo que implica que no hay biomoléculas que estén implicadas en la biosíntesis de compuestos de titanio.<sup>2</sup> Un estudio del año 2003 reveló por primera vez la posibilidad de utilizar silicateínas para inducir la síntesis de óxido de titanio.<sup>59</sup> A partir de éste, han sido probadas otras silafinas y algunas mutantes<sup>49, 59-61</sup> para lograr una síntesis controlada como las ya mencionadas.

Sin embargo, para el caso de óxido de titanio actualmente no se conoce ningún organismo capaz de biosintetizarlo, ni siquiera se conocen biomoléculas que interaccionen con algún precursor de titanio.<sup>2</sup> Para resolver este problema, a partir de bibliotecas de fagos desplegados se han hallado algunas secuencias con afinidad a  $\text{TiO}_2$ . Dickerson *et al.*<sup>56</sup> utilizaron una biblioteca de fagos desplegados de 12 residuos y realizaron un barrido (*biopanning*) sobre rutilo para seleccionar las secuencias que presentaban afinidad a dicho material. De esta manera, encontraron secuencias de péptidos con posibilidad de tener capacidad biomineralizante. Posteriormente, usando lactatodihidroxidotitanato(IV) de bisamonio (TiBALDH) como precursor, probaron la eficiencia de las secuencias peptídicas encontradas en el *biopanning* en la biomineralización de  $\text{TiO}_2$ . La secuencia llamada dTi-1(H/K) (RKKRTKNPTRKL) fue capaz de inducir la formación de nanocristales dentro de la fase amorfa del óxido, Figura 1.10. Por otra parte, observaron que el rendimiento en la síntesis de  $\text{TiO}_2$  se incrementó en proporción al número de cargas positivas de los residuos. Observaron también que los péptidos con mejor afinidad al  $\text{TiO}_2$  tenían residuos de arginina (R), lisina (K) e histidina (H) en mayor proporción que otros, lo que simplifica las posibilidades de mutaciones que pudieran incrementar la capacidad biomineralizadora de los péptidos y el rendimiento. En otro estudio posterior, obtienen otras secuencias que presentan afinidad a  $\text{TiO}_2$  (rutilo), pero no muestran afinidad a  $\text{SiO}_2$ , de esta manera comprobaron la especificidad de los péptidos hacia  $\text{TiO}_2$ .<sup>26</sup> En este caso utilizaron como precursores bisoxalatooxotitanato de potasio  $\text{K}_2[\text{TiO}(\text{C}_2\text{O}_4)_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y tetraetilortosilicato (TEOS) para  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  respectivamente. Con las secuencias previamente seleccionadas no obtuvieron fases cristalinas de  $\text{TiO}_2$  pero sí partículas nanoestructuradas de  $\leq 100$  nm en tamaño. Al probar dichas secuencias con TEOS, no presentaron actividad para la biomineralización de  $\text{SiO}_2$  lo cual evidenció la selectividad de las secuencias de los péptidos.



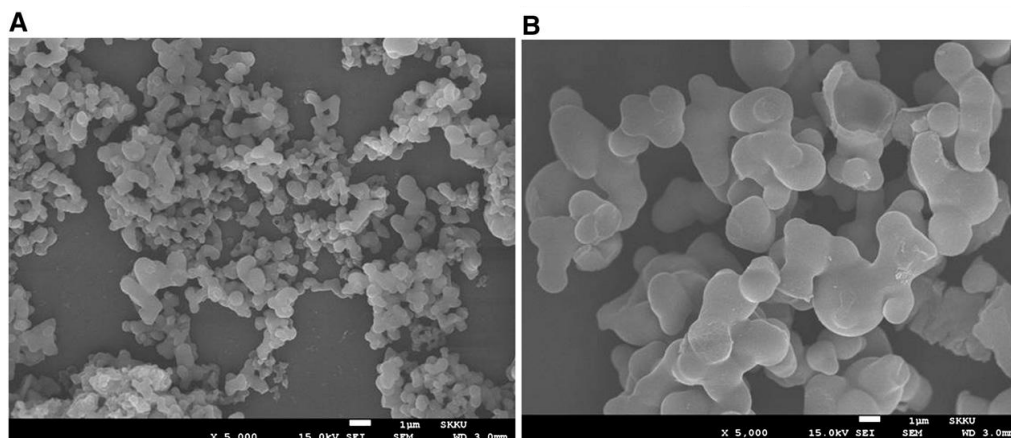
**Figura 1.10** Imágenes de  $\text{TiO}_2$  biomineralizado por el péptido dTi-1(H/K). Izquierda, con microscopía electrónica de barrido, escala 400 nm. Derecha, con microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, el recuadro muestra el patrón de difracción de electrones, escala 5 nm.

Chen *et al.*<sup>62</sup> realizaron un barrido con una biblioteca de péptidos cíclicos de 7 residuos -CXXXXXXC- (los cuales forman un *loop* debido al puente disulfuro entre las cisteínas de los extremos) sobre anatasa y nanopartículas de  $\text{SiO}_2$  hallando repetidamente la secuencia -CHKKPSKSC- (TBP-1) en ambos casos. Ellos también compararon la fuerza de unión entre  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  y la secuencia TBP-1 en su forma cíclica, la cual tiene poca movilidad en su estructura, y en su forma lineal AHKKPSKSA.<sup>63</sup> De este modo, determinaron la influencia de la movilidad del péptido en la interacción sobre los materiales. Adicionalmente, para conocer la estructura y confirmar la movilidad del péptido realizaron una simulación por dinámica molecular, llegando a las siguientes conclusiones:

- La flexibilidad estructural le permite al péptido lineal adoptar un mayor número de conformaciones logrando una mejor interacción electrostática con los óxidos. Esto concuerda con la afinidad del péptido lineal para ambos óxidos y, por el contrario, el péptido cíclico tuvo menor afinidad a ellos.
- La flexibilidad estructural de péptidos y sus grupos laterales parecen ser factores claves para regular su afinidad de enlace y/o selectividad a los materiales inorgánicos. Además esto es esencial para entender las interacciones péptido-sustrato y su posterior implementación a las aplicaciones de diseño de bioplantillas.

Un estudio sobre la secuencia TBP-1 y su capacidad de biomineralizar  $\text{TiO}_2$  a partir de TiBALDH también fue realizado por el mismo grupo de investigadores. Allí concluyen que la afinidad del péptido TBP-1 al  $\text{TiO}_2$  es necesaria pero insuficiente para lograr una buena biomineralización, pues no observan fases

cristalinas ni un control de la forma o tamaño, Figura 1.11.<sup>64</sup> También mencionan que la eficacia está gobernada por intrincadas interacciones electrostáticas y cinéticas las cuales dependen fuertemente de la secuencia, conformación y rigidez del péptido.



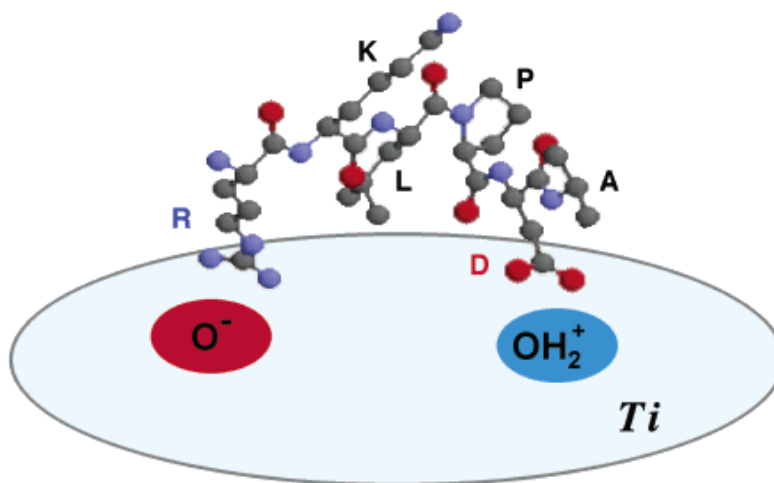
**Figura 1.11** Imágenes de SEM de  $\text{TiO}_2$  biomaterializado. A) Usando el péptido –CHRRPSRSC–, B) usando el péptido –CHKKPSKSC–.<sup>64</sup>

En un estudio reciente sobre la adsorción de péptidos a superficies de nanopartículas de  $\text{SiO}_2$ , Perry *et al.*<sup>18</sup> identificaron el mecanismo por el cual se enlazan los péptidos a la superficie de las nanopartículas, donde principalmente están involucrados pares iónicos y puentes de hidrógeno, complementados por uniones ion-dipolo, dipolo-dipolo e interacciones de Van der Waals. El grado de ionización de la superficie de la nanopartícula también resulta crítico para la adsorción selectiva.

A nivel molecular, la adsorción es dirigida por los grupos amonio del N-terminal y los residuos de lisina (K) y está modulada por los residuos de arginina (R) por medio de la formación de pares iónicos con los grupos silóxido superficiales y también por serina (S), histidina (H) y asparagina (N) a través de puentes de hidrógeno e interacciones polares. Por último, la velocidad del proceso de biomaterialización con precursores de silicio disminuye a medida que se incrementa la fuerza de interacción entre las nanopartículas, dando la posibilidad de controlar de manera definida la morfología de la partícula.

En cuanto a la unión péptido- $\text{TiO}_2$  hay algunos estudios similares para dilucidar esta interacción.<sup>17</sup> En un primer estudio, utilizan el péptido RKLPGA para explorar experimentalmente las interacciones péptido- $\text{TiO}_2$ <sup>65</sup>. Estudios posteriores donde utilizan dos dipéptidos AE y AK para estudiar de forma experimental y teórica sus interacciones con rutilo (110) coinciden que el grupo carboxilo del C-terminal y los

grupos amino se coordinan con la superficie de rutilo.<sup>20, 66</sup> Un estudio teórico sobre la adsorción del péptido RGD, un promotor de adhesión celular, con diferentes planos cristalográficos de  $\text{TiO}_2$  por dinámica molecular también concluyen, de manera similar a los anteriores, que existen interacciones entre los átomos de oxígeno de los residuos de aspartato y los átomos de Ti cargados en la superficie.<sup>67</sup> El esquema propuesto de la unión péptido- $\text{TiO}_2$  se muestra en la Figura 1.12.



**Figura 1.12** Modelo de interacción del péptido RKLPGA con una superficie de  $\text{TiO}_2$ .<sup>65</sup>

Desafortunadamente se sabe poco del mecanismo de biomineralización y la mayoría de estudios se enfocan solamente en la interacción péptido-material y no péptido-precursor. Aunque se han dado algunas propuestas, aun no está claro cuáles son los factores determinantes para lograr un buen resultado, pues hasta ahora todo es empírico.<sup>9, 68</sup>

## Capítulo 2 Hipótesis y Objetivos

### 2.1 Planteamiento del problema

La necesidad de síntesis de materiales con estructuras nanométricas en condiciones suaves de reacción ha llevado a los científicos a imitar la síntesis biológica de materiales inorgánicas usando biomoléculas como plantillas. Entonces ¿es posible utilizar heptapéptidos como bioplantillas para nanoestructurar  $\text{TiO}_2$  cristalino en condiciones ambiente?

### 2.2 Hipótesis

Secuencias de péptidos específicas y afines a  $\text{TiO}_2$  podrán ser usadas en síntesis sol-gel para producir nanoestructuras de anatasa con un control preciso en las dimensiones, morfología y organización.

### 2.3 Objetivos

#### General:

Sintetizar y caracterizar  $\text{TiO}_2$  por técnicas de sol-gel usando como bioplantillas péptidos con afinidad a anatasa.

#### Específicos:

- 1.- Obtener y caracterizar nanoestructuras de  $\text{TiO}_2$  por biomineralización usando el péptido H.
- 2.- Estudiar el efecto de mutaciones puntuales en el proceso de biomineralización.
- 3.- Estudiar el proceso de biomineralización, en especial los factores que influyen en éste, como son pH, relaciones molares precursor/péptido y naturaleza química del precursor.

## Capítulo 3 Materiales y Metodología

### 3.1 Biomineralización

Se eligió la secuencia de un heptapéptido con afinidad a nanopartículas de anatasa y sílice hallada por Chen *et al.*<sup>62</sup> como péptido control (control positivo). Dicha secuencia (HKKPSKS) se usó como referencia para las pruebas de biomineralización y además se probaron algunas mutaciones puntuales. Los péptidos seleccionados fueron sintetizados químicamente por GenScript, la secuencia y detalles de éstos se muestran en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1** Péptidos propuestos para la biomineralización de TiO<sub>2</sub>, la mutación se marca en negrita.

Clave	Secuencia	MM/gmol <sup>-1</sup>	pI <sup>a</sup>	% pureza
H	HKKPSKS	810.94	10.30	96.7
R	<b>R</b> KKPSKS	829.94	11.26	99.0
L	<b>L</b> KKPSKS	786.97	10.30	99.8
HH	<b>H</b> HKPSKS	819.91	10.00	99.5
HK	H <b>K</b> HPSKS	819.91	10.00	98.8
KK	H <b>K</b> K <b>P</b> HKS	861.01	10.30	99.8

<sup>a</sup> El punto Isoeléctrico (pI) fue obtenido con el programa *Protein Calculator*.  
<http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>

Los reactivos restantes para la biomineralización fueron los siguientes:

Propóxido de titanio (Ti(PrO)<sub>4</sub>), isopropóxido de titanio (Ti(PrO<sup>i</sup>)<sub>4</sub>), tetraetilortosilicato (TEOS), etanol absoluto, propanol (PrOH), isopropanol (iPrOH), acetil acetona (acac), ácido clorhídrico, agua desionizada estéril. Para preparar los amortiguadores: Acetato de sodio, acetato de bario, citrato de sodio, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES), piperacina-N,N'-bis(2-ácido etanosulfónico) (PIPES), trishidroximetilaminometano (TRIS), fosfato de potasio, fosfato ácido de potasio, borato de sodio, ácido acético, agua desionizada estéril (MiliQ). Adicionalmente se utilizó azul de metileno, nanopartículas de anatasa de tamaño <25 nm y anatasa micrométrica en las pruebas fotocatalíticas.

Todos estos reactivos fueron proveídos por Aldrich y Baker.

La metodología para la biomineralización fue la siguiente:



### **a) Biomineralización de TiO<sub>2</sub>**

En un tubo se mezcla el alcóxido de titanio con su respectivo alcohol y se le agrega lentamente la solución del péptido (2 o 4 mg/mL) con agitación. Los tubos se dejan reposar a temperatura ambiente hasta su precipitación o gelación. Las cantidades varían según la relación molar Ti(OR)<sub>4</sub>:ROH:H<sub>2</sub>O:péptido (Ti:OH:H<sub>2</sub>O:pept). En algunos casos las soluciones peptídicas fueron preparadas con diferentes amortiguadores (a una concentración de 50 mM) para regular el pH y, donde se indique, también se le agregó acetil acetona (acac) a la solución alcóxido-alcohol en una relación molar Ti:acac 1:1 para disminuir la velocidad de hidrólisis.

### **b) Biomineralización de SiO<sub>2</sub>**

Se colocan 25 µL de solución peptídica 4 mg/mL y 25 µL de los diferentes amortiguadores (de concentración 100 mM) en un tubo y posteriormente se le añaden 6.46 µL de TEOS. Se agita en un vórtex y se dejan reposar a temperatura ambiente.

En ambos casos (para TiO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub>), cuando se formaron precipitados se recuperaron por centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos y se lavaron con etanol 3 veces. El producto se dejó secar en una estufa de vacío a 50°C y posteriormente se hacen las pruebas para su caracterización. Todos los materiales usados fueron estériles para evitar cualquier degradación de los péptidos y se hicieron reacciones sin péptido (control negativo) para comparar resultados.

## **3.2 Pruebas fotocatalíticas de TiO<sub>2</sub>**

Se utilizó un reactor UV a microescala (Cat. 7880, Ace glass incorporated) con una lámpara de mercurio de baja presión de 5.5W con longitud de onda de 245 nm y una chaqueta de enfriamiento de cuarzo entre la lámpara y la solución para mantenerla a 25 °C (Figura 3.1). La concentración del catalizador fue de 0.5 mg/mL y se usó azul de metileno 20 mg/mL como molécula a degradar. La actividad fotocatalítica del TiO<sub>2</sub> sintetizado se comparó con las nanopartículas de anatasa <25 nm.



**Figura 3.1** Reactor de fotocatalisis usado para degradar azul de metileno.

El catalizador y la solución de azul de metileno se dejaron en agitación a oscuras por 1 hora para alcanzar el equilibrio de adsorción. Después se irradió con la lámpara de UV manteniendo el sistema en agitación a 25°C. Se tomaron muestras de 250  $\mu\text{L}$  a tiempo cero, y cada 10-20 minutos hasta completar la degradación. Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 3 minutos para separar el catalizador de la solución. Posteriormente se cuantificó la concentración de las muestras obteniendo el espectro de absorción de UV-Vis y tomando la absorbencia a 667 nm.

### 3.3 Simulaciones por dinámica molecular

Utilizando la herramienta *Protein Builder* del software VMD<sup>69</sup> se modeló la estructura de partida de cada péptido. En todos los casos la estructura secundaria fue lineal ( $\Phi=-\Psi=180^\circ$ ) a excepción del enlace de la prolina. Las simulaciones se realizaron en GROMACS 4.5.5,<sup>70</sup> siguiendo el método reportado por Karttunen<sup>71</sup> con ligeras modificaciones:

La parametrización de los péptidos se realizó con el campo de fuerza GROMOS96 43a1<sup>72</sup>, tomando en cuenta los diferentes estados de protonación que predominan en los valores de pH elegidos. Se hizo una previa minimización de energía en vacío con el algoritmo *steepest descend* para luego colocarlo en una caja de solvatación. La solvatación con SPC fue dentro de una caja dodecaédrica con un espaciado de 1 nm con condiciones periódicas. Se le añadió iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en una concentración de 100 mM para neutralizar el sistema (menor número de iones sodio, para compensar las cargas positivas de los péptidos).

Posteriormente se hizo una minimización de la energía utilizando el algoritmo de gradiente conjugado. Después el sistema se acopló a un baño térmico para mantener una temperatura constante de 300K usando el termostado Berendsen durante 100 ps. La presión se mantuvo constante isotrópicamente a 1 bar con el baróstato Parrinello-Rahman por 100 ps. Finalmente, la dinámica molecular se realizó durante 20 ns con un tiempo de integración de 2ps usando el algoritmo leap-frog.

Todas las longitudes de enlace fueron restringidas usando el algoritmo LINCS para el péptido. El límite para las interacciones Lennard-Jones fue de 1.0 nm y se usó el método de Ewald (PME) para calcular las interacciones electrostáticas con un límite de 1.0 nm.

Para conocer si la estructura del péptido convergió durante el tiempo de simulación se calculó la desviación de la media cuadrática (RMSD) con el programa contenido en GROMACS g\_rms. La estructura promedio y la fluctuación cuadrática media (RMSF) se obtiene con el programa de GROMACS g\_rmsf, tomando únicamente las estructuras de los últimos 3ns. Para las visualizaciones de las estructuras finales se utilizó el software VMD.

### **3.4 Técnicas de caracterización**

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

El tamaño y cristalinidad de las partículas de  $\text{TiO}_2$  se estudiaron por microscopía de transmisión electrónica (TEM) y difracción de electrones (ED) usando un microscopio de transmisión electrónica marca JEOL 2010. Las muestras fueron preparadas usando rejillas de cobre con formvar de 300 mesh. Fueron preparadas suspendiendo una pequeña cantidad de la muestra en agua o etanol y añadiendo 2-3 $\mu\text{L}$  de ésta sobre la rejilla y se dejó secar al aire.

#### **Difracción de rayos X**

Para conocer si el  $\text{TiO}_2$  sintetizado fue totalmente cristalino se utilizó la difracción de rayos X. Se utilizó un equipo Siemens D5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda=1.54\text{\AA}$ ) y un paso de  $0.03^\circ$  y  $t=5\text{s}$ , los datos se adquirieron entre  $4-70^\circ$  en  $2\theta$ .

#### **Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier**

Para conocer qué tipos de enlaces o moléculas hay en la muestra, se utilizó la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier. Las muestras se prepararon en pastilla de bromuro de potasio y se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo Spectrum GX. El intervalo de medición fue de  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

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

La pérdida de peso respecto a la temperatura y el comportamiento térmico de las muestras se analizó con ayuda de un equipo de análisis térmico gravimétrico y la calorimetría diferencial de barrido (TGA/DSC) de la marca Perkin Elmer modelo Pyris Diamont. La velocidad de calentamiento fue de 5°C/min de 25°C hasta 800°C con atmosfera de aire usando una celda de platino.

## Capítulo 4

### Resultados y discusión

#### 4.1 Características fisicoquímicas de los péptidos

Aquí se presenta una descripción sobre las diferencias y similitudes de los péptidos utilizados para la biomineralización de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$ . Esto, con el fin de poder explicar los resultados presentados en la siguiente parte. El péptido control H será el punto de referencia para discutir las propiedades de las mutantes.

##### **Péptidos HH y HK**

Por un lado están los péptidos HH y HK los cuales tienen sustituida una lisina por una histidina respecto al péptido control H, Tabla 4.1. De acuerdo al diagrama de cargas-pH mostrado en la Figura 4.1, estos dos péptidos tienen cargas iguales a cualquier pH puesto que tienen los mismos residuos aunque en orden distinto. Así, a  $\text{pH} > 5.5$  los péptidos HH y HK tienen una carga menor a la del péptido control debido a la desprotonación del anillo imidazol de la histidina.

##### **Péptidos R y L**

Por otro lado, en los péptidos R y L ha sido sustituida la histidina N-terminal del péptido control por una arginina y leucina respectivamente, Tabla 4.1. La arginina en el péptido R es un residuo básico (por el grupo lateral guanidino) que a diferencia de la histidina a  $\text{pH} > 5.5$  la carga positiva se conserva, lo que provoca que tenga mayor carga total que el péptido H. Por el contrario, el péptido L tiene la leucina, un residuo neutro, y como consecuencia a  $\text{pH} < 7.5$  tiene una menor carga total que el péptido H.

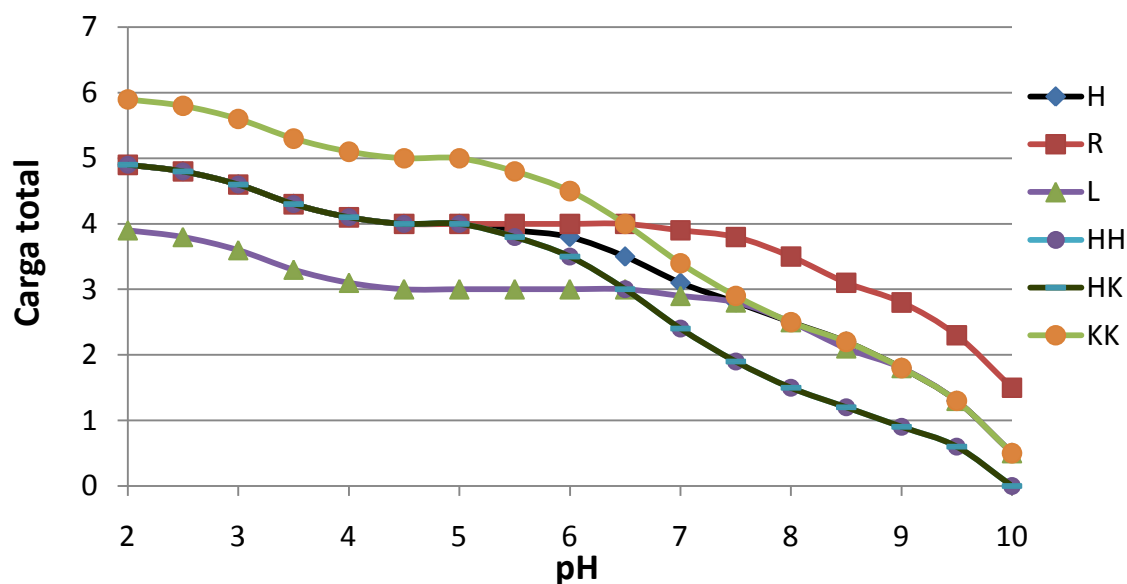
##### **Péptido KK**

En contraste con las demás mutantes donde se sustituyen residuos básicos (H y K), el péptido KK tiene una histidina en el lugar de la serina (5) del péptido control H, Tabla 4.1. Es decir, este péptido tiene un residuo más de carácter básico que el resto e implica que a  $\text{pH} < 6.5$  sea el péptido con la mayor carga total de todos, Figura 4.1.

Hay que resaltar que en el intervalo de pH (5.5, 7.5) el péptido control tiene una carga total distinta a todos los demás péptidos. A  $\text{pH} = 6.5$  el péptido control tiene una carga total de 3.5+ mientras que los péptidos R y KK tienen una carga mayor (4.0+) y los péptidos HH, HK y L menor (3.0+).

**Tabla 4.1** Péptidos utilizados para biomineralizar.

Péptido	Secuencia
H	HKKPSKS
HH	HHKPSKS
HK	HKHPSKS
R	RKKPSKS
L	LKKPSKS
KK	HKKPHKS



**Figura 4.1** Carga total de cada péptido en función del pH. Calculadas con el programa *Protein Calculator* : <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>.

El estudio del mecanismo de la formación de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{SiO}_2$  se ha centrado principalmente en la interacción de la secuencia del péptido y el óxido. Una vez que se encuentra un péptido específico que presenta afinidad a un material en particular, éste es utilizado en la síntesis del material, usando algún precursor adecuado. Mutantes de dicho péptido también han sido empleadas en experimentos de biosíntesis con el objetivo de determinar la influencia de la estructura del péptido y como variaciones puntuales afectan sus propiedades, tales como, pH, carga, entre otras y por lo tanto su interacción con el precursor en cuestión. Casi todos los estudios reportados hasta ahora para biomineralización  $\text{TiO}_2$  se han realizado usando como precursor lactatodihidroxidotitanato(IV) de bisamonio (TiBALDH). En este trabajo además de estudiar el efecto de distintas mutantes del péptido también estudiamos el efecto de diferentes precursores en el proceso de biomineralización, como se discutirá a continuación.

## 4.2 Síntesis de TiO<sub>2</sub> por biomineralización

Los resultados se presentan de acuerdo al alcóxido de titanio utilizado como precursor.

### 4.2.1 Síntesis con propóxido de titanio

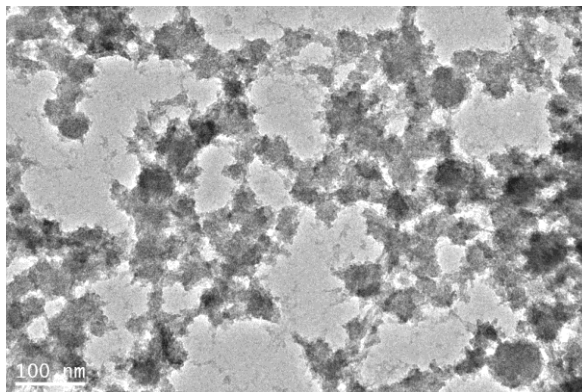
Los alcóxidos de titanio son rápidamente hidrolizables, así que en la síntesis de TiO<sub>2</sub> con propóxido de titanio (Ti(PrO)<sub>4</sub>) se probaron dos rutas. La primera, únicamente se empleó una relación molar alcóxido:propanol (Ti:PrOH) adecuada para controlar la velocidad de reacción (tipo I). En la segunda, se empleó acetil acetona (acac) para controlar la velocidad de hidrólisis del precursor (tipo II). Se probaron varias relaciones molares de Ti:PrOH y de alcóxido:agua, desde 1:15 hasta 1:500 en ambos casos. Únicamente se presentan los resultados representativos.

En las reacciones del tipo I (sin acac), se observa una gran diferencia entre la reacción con la solución peptídica y la reacción únicamente con agua (control negativo). Todos los controles negativos precipitan inmediatamente a excepción de aquellos con relaciones molares de Ti:PrOH superiores a 1:200, pero después de unos minutos la formación de grandes precipitados es evidente. Por otro lado, cuando se utiliza una solución peptídica la reacción es notablemente más lenta y los precipitados blancos de TiO<sub>2</sub> son mucho más pequeños a simple vista. Sin embargo, cuando se utilizan relaciones molares Ti:H<sub>2</sub>O superiores a 1:50, el efecto del péptido en la reacción se ve limitado, pues la gran cantidad de moléculas de agua compiten en la reacción.

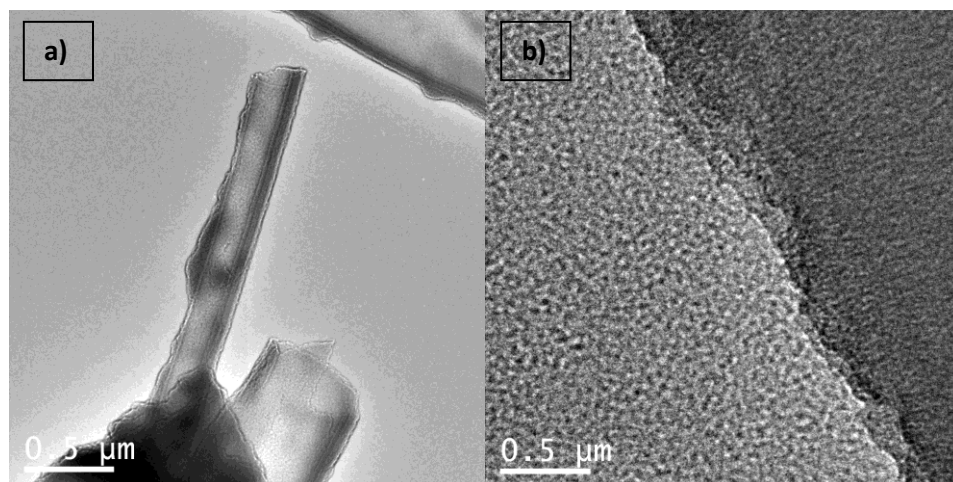
Las soluciones amortiguadoras utilizadas para estudiar la influencia del pH en la biomineralización fueron las siguientes: acetatos, fosfatos y boratos. Sin embargo, al utilizar las soluciones peptídicas con una concentración 2 mg/mL en estos amortiguadores con concentración 50mM, el efecto en la formación de partículas de TiO<sub>2</sub> fue nulo. Los controles negativos (amortiguador sin péptido) incluso provocaron la precipitación más rápidamente que en los experimentos solamente con agua. En la Figura 4.2 se muestra la imagen de TEM de la muestra preparada con el péptido H sin usar acac. La imagen muestra partículas de alrededor de 50 nm aunque no están muy bien definidas. Además en la difracción de electrones (no mostrada) no se observa ningún patrón de cristalinidad. Así, a pesar de haber obtenido nanopartículas de TiO<sub>2</sub> inducidas por el péptido H, no fueron cristalinas.

En el caso de las reacciones de tipo II (con acac), el efecto del péptido de retardar la reacción también se observa. Hay una notable diferencia entre las muestras

preparadas con el péptido H en amortiguador de boratos (Fig. 4.3 a) y el control negativo (Fig. 4.3 b). Usando el péptido control, se obtienen estructuras amorfas en forma de tubos de tamaño entre 300 y 800 nm. El control negativo no muestra ninguna morfología definida y el tamaño de las partículas es superior a  $1\mu\text{m}$ .



**Figura 4.2** Imagen de TEM de  $\text{TiO}_2$  biomaterializado con el péptido H en agua a una concentración de 4 mg/mL con relación molar Ti:PrOH:H<sub>2</sub>O 1:50:40. Escala: 100 nm.



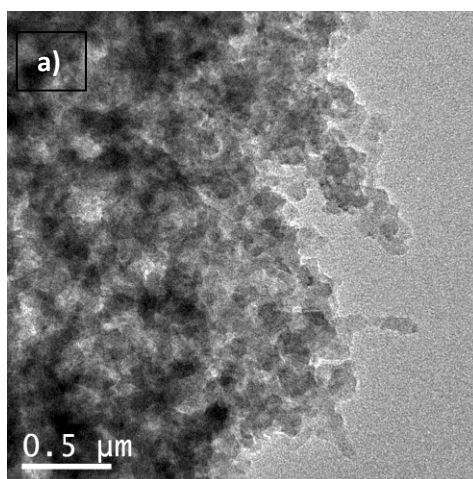
**Figura 4.3** Imágenes de TEM de  $\text{TiO}_2$  sintetizado en presencia de acetyl acetona: a) biomaterializado con el péptido H a una concentración de 2 mg/mL en amortiguador de boratos. b) Control negativo. Relación molar Ti:PrOH:H<sub>2</sub>O:Acac 1:20:500:1. Escala: 500 nm.

A pesar de haber hallado morfologías muy particulares, ninguna mostró cristalinidad. Así que se exploraron reacciones usando otro precursor para probar si existían diferencias en la biomaterialización. Los resultados con isopropóxido de titanio se discuten a continuación.



#### 4.1.2 Síntesis con isopropóxido de titanio

Como referencia para las reacciones de tipo II, se tomó la relación molar encontrada en los experimentos con propóxido de titanio ( $\text{Ti}(\text{PrO})_4$ ) y acac ( $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}:\text{acac}$  1:20:500:1). En ausencia de amortiguador (en agua estéril), las reacciones con el péptido H no se observaron cambios, mientras que los controles negativos mostraron la formación de un precipitado. Esto concuerda con los resultados obtenidos usando el  $\text{Ti}(\text{PrO})_4$ . También se observó correspondencia en las reacciones con amortiguadores, cuya velocidad de reacción aumentó y como resultado se formaron precipitados grandes. En la Figura 4.4 se muestra la imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de  $\text{TiO}_2$  biomineralizado con el péptido H en amortiguador de fosfatos (PBS) donde se observan aglomerados.

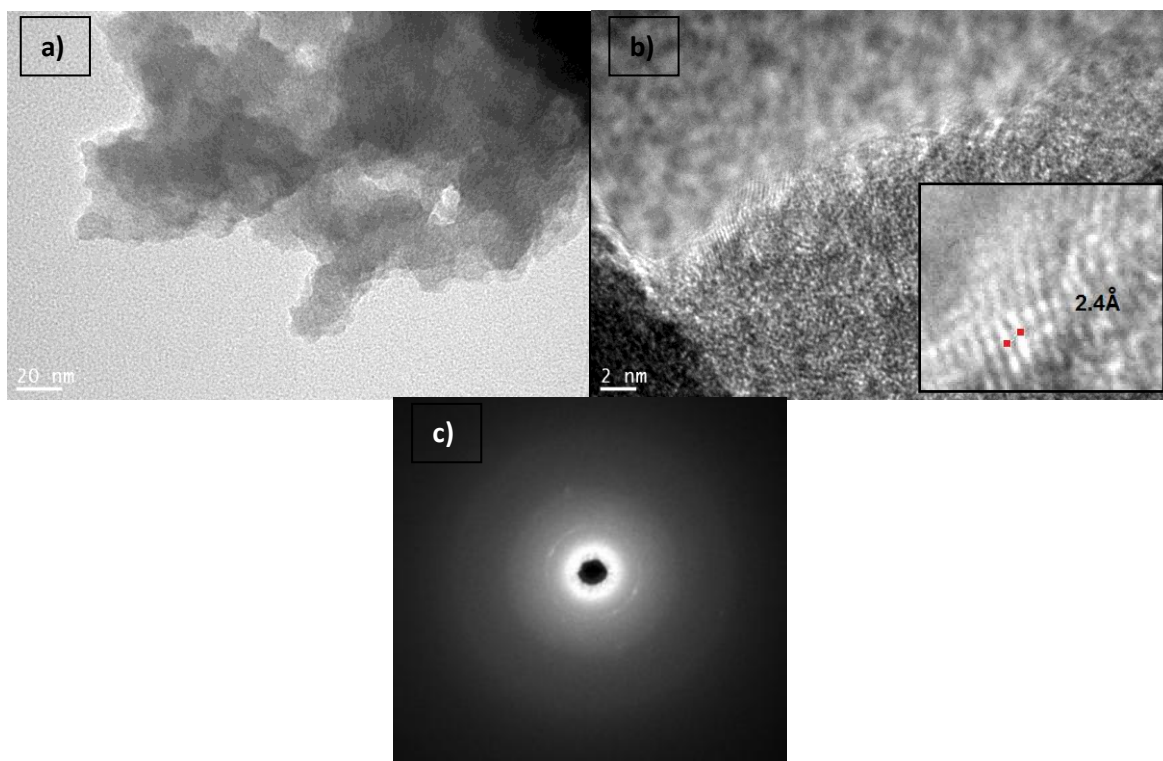


**Figura 4.4** Imagen de TEM de  $\text{TiO}_2$  biomineralizado con el péptido H con una concentración de 2 mg/mL en amortiguador de PBS con  $\text{Ti}(\text{PrO})_4$  en presencia de acac.

Las reacciones de tipo I (sin acac) se realizaron, al igual que las de  $\text{Ti}(\text{PrO})_4$ , con distintas relaciones molares. Debido a que el isopropóxido de titanio ( $\text{Ti}(\text{PrO})_4$ ) reaccionó más rápido que el  $\text{Ti}(\text{PrO})_4$ , las relaciones molares de  $\text{Ti}:\text{H}_2\text{O}$  fueron de 1:5 y 1:10. El efecto del pH utilizando soluciones peptídicas en amortiguadores no fue posible probarlo pues reaccionaban inmediatamente y se formaban precipitados.

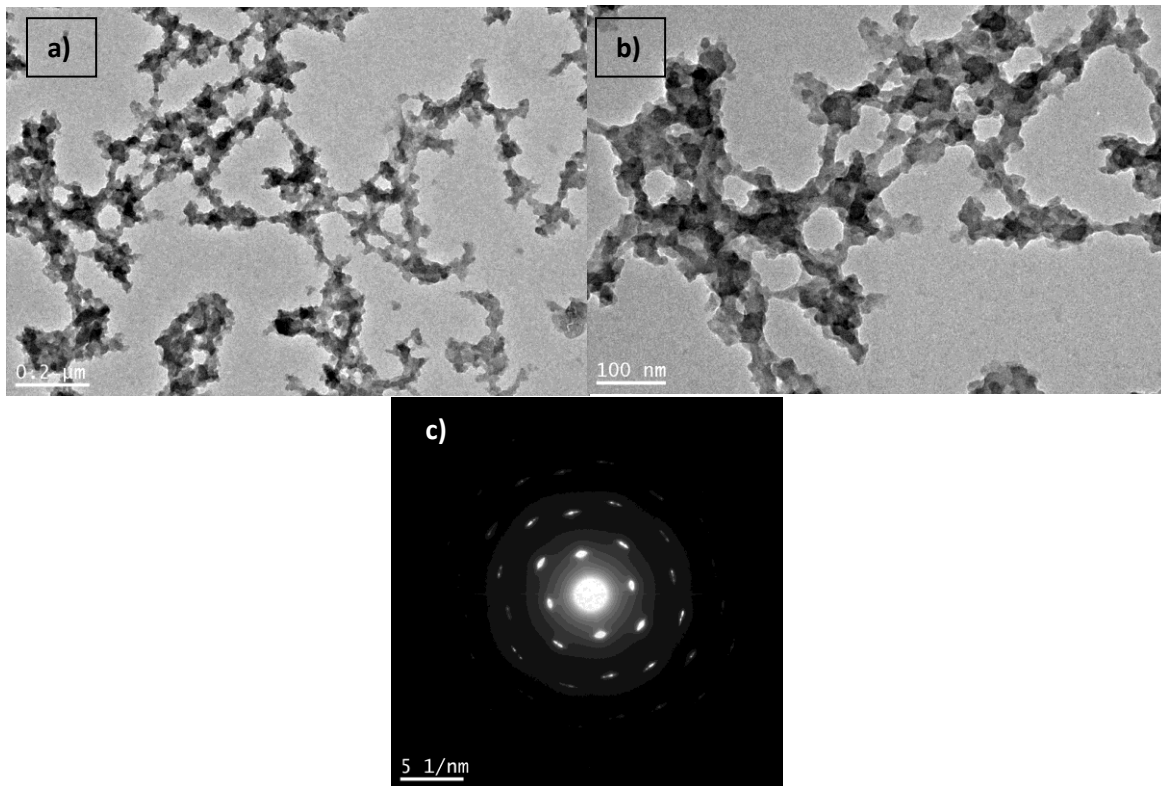
La muestra preparada con el péptido H (control positivo) a una concentración de 4 mg/mL usando una relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  de 1:66:5 formó una suspensión blanca (coloide) sugiriendo la presencia de nanopartículas. En la Figura 4.5a se muestra una imagen de TEM de dicha muestra. El tamaño de las partículas fue mayor a 300 nm. La Figura 4.5b corresponde a una imagen de alta resolución

(HRTEM), en la cual se observan planos cristalográficos separados por una distancia de  $2.4\text{\AA}$ , que corresponde al plano  $(103)$  de la estructura de anatasa. En la Figura 4.5c se muestra la difracción de electrones (ED), el cual es típico de muestras cristalinas, confirmando la formación de pequeñas nanopartículas de anatasa coexistiendo con la fase amorfa.



**Figura 4.5** a) y b) Imágenes de HRTEM de  $\text{TiO}_2$  biomineralizado con el péptido control [4 mg/mL] en agua con relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5. c) Imagen del patrón de difracción de electrones. Escala: a) 20 nm, b) 2 nm.

Para asegurar la reproducibilidad del experimento, la biomineralización con el péptido H con las relaciones molares  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5 se realizó por duplicado, obteniendo morfologías más ordenadas y de menor tamaño, además de tener también fases cristalinas, Figura 4.6. La Figura 4.6c muestra el patrón de difracción de electrones que es más definido e intenso que el de la primera muestra, el cual corresponde a la fase anatasa. La mayor cristalinidad y morfología más definida de la segunda muestra se le atribuye a la menor velocidad a la que se le agregó la solución peptídica, permitiendo una mejor distribución del péptido en la solución antes de ocurrir la condensación de  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 4.6** a) y b) Imágenes de TEM de la segunda muestra preparada de  $\text{TiO}_2$  biomineralizado con el péptido control [4 mg/mL] en agua con relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5 c) Patrón de difracción de electrones correspondientes a anatasa. Escala: a) 200 nm, b) 100 nm.

Debido a que la relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5 permitió obtener  $\text{TiO}_2$  parcialmente cristalino con el péptido H (control positivo), los siguientes experimentos de biomineralización con los péptidos mutantes se realizaron bajo estas condiciones.

En la Figura 4.7 se muestran imágenes de TEM de las muestras preparadas con las mutantes. Para el caso del péptido HH (Figura 4.7a) las partículas obtenidas de  $\text{TiO}_2$  son aglomerados mayores a  $1\mu\text{m}$  y no presentaron fases cristalinas.

Con el péptido R (Figura 4.7b) las partículas obtenidas son más pequeñas pero tampoco tienen una morfología definida. El patrón de difracción de electrones es característico de estructuras amorfas (no mostrado).

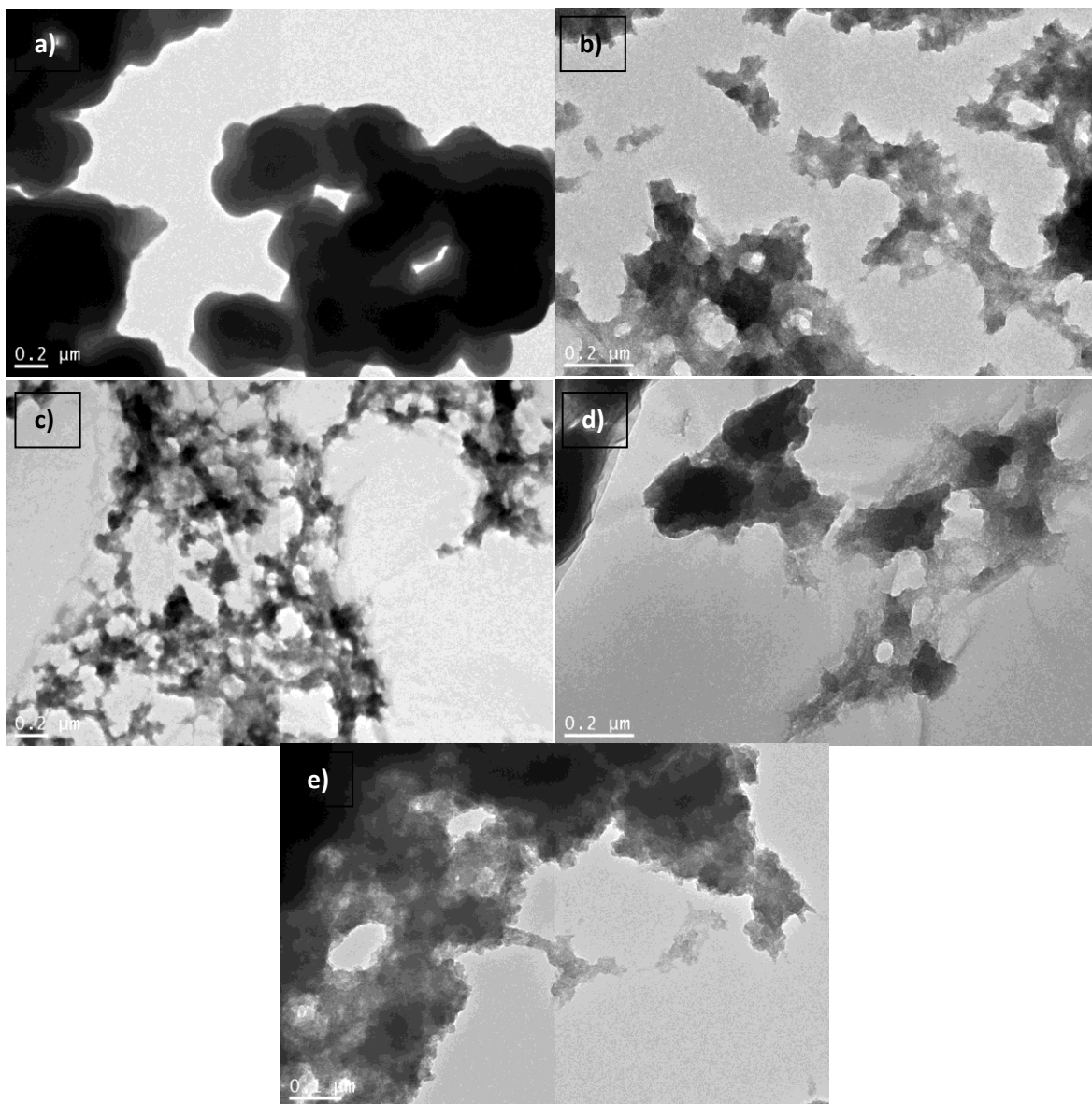
Las partículas obtenidas con el péptido KK (Figura 4.7c) tienen un tamaño menor a las anteriores (alrededor de 100 nm) y se enlazan formando una especie de red similar al  $\text{TiO}_2$  obtenido con el péptido control. Sin embargo no presenta fases cristalinas.

El péptido HK al igual que el KK induce la formación de partículas enlazadas entre sí del orden de 100 nm (Figura 4.7d), sin embargo las partículas muestran menos organización que el caso de las obtenidas con KK.

El péptido L (Figura 4.7e) al igual que los anteriores, induce la formación de partículas sin morfología definida, el tamaño de partícula es del orden de micrómetros y no es cristalina.

A  $\text{pH} > 5.5$  los péptidos HH y HK poseen una carga menor a la del péptido control debido a la desprotonación del anillo imidazol de la histidina (ver Figura 4.1). Esta diferencia podría ser un factor por el cual la biomineralización de fases cristalinas no fue posible con las mutantes. Por otro lado, la histidina desprotonada también puede actuar como ligante. Entonces, los péptidos HH, HK y KK con una histidina más que en el péptido control, pueden incrementar el número de coordinación del Ti y modificar la distribución de las moléculas alrededor de éste, provocando una interacción muy distinta al del péptido control.

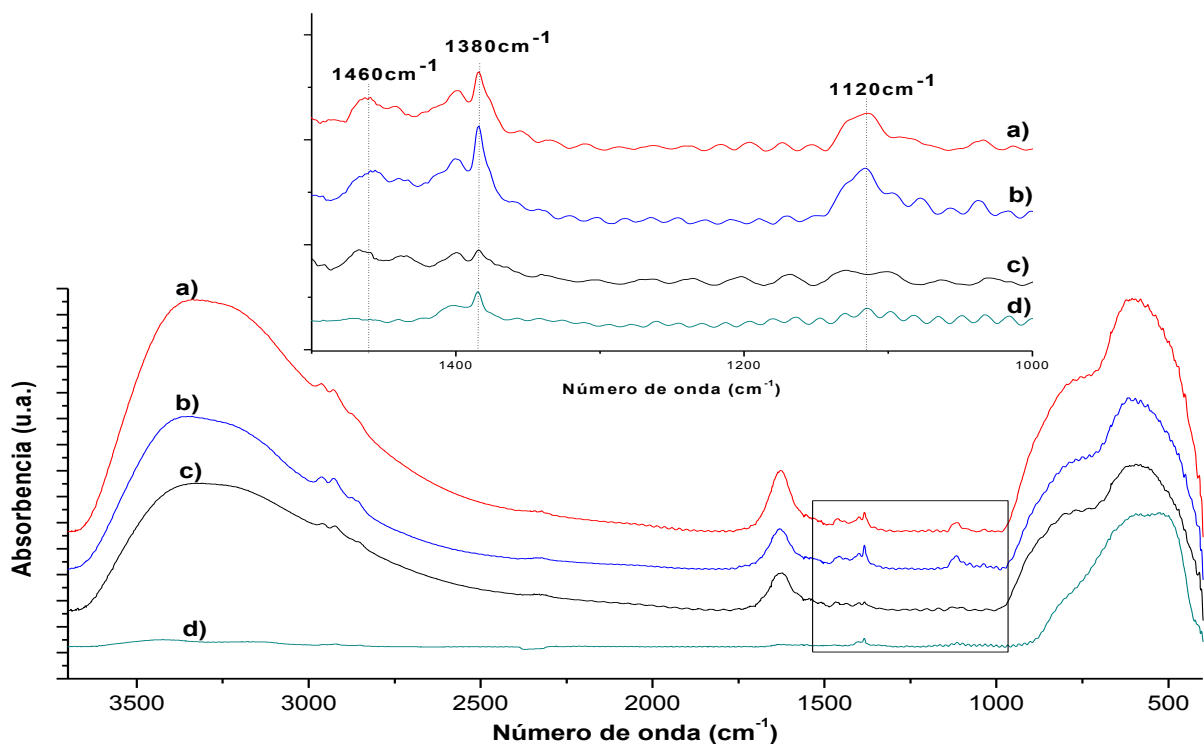
Hay que resaltar que en el intervalo de pH de (5.5, 7.5) el péptido control tiene una carga total distinta a todos los demás péptidos. A  $\text{pH} = 6.5$  el péptido control tiene una carga total de 3.5+ mientras que los péptidos R y KK tienen una carga mayor (4.0+) y los péptidos HH, HK y L menor (3.0+). Estos resultados se correlacionan con el resultado obtenido de fases cristalinas solamente con el péptido control.



**Figura 4.7** Imágenes de TEM de  $\text{TiO}_2$  biominederalizado con el péptido: a) HH; b) R; c) KK; d) HK; e) L. En agua [4 mg/mL] con relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5. Escala: a-d), 200 nm, e) 100 nm.

Las muestras obtenidas con la relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5 se caracterizaron por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). En la Figura 4.8 Se muestran algunos espectros de infrarrojo. En los espectros de las muestras de  $\text{TiO}_2$  secadas a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  (Figuras 4.8a, b y c) se observan tres bandas de transmitancia similares. La banda que aparece alrededor de  $3400\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a vibraciones de estiramientos de los grupos  $-\text{OH}$ , la banda menos intensa en  $1630\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la flexión de  $\text{H-O-H}$ ; Finalmente la banda intensa en  $550\text{ cm}^{-1}$  se relaciona a vibraciones de estiramiento de los enlaces  $\text{Ti-O-Ti}$ . Las muestras preparadas con péptido (Figura 4.8a,b) también presentan

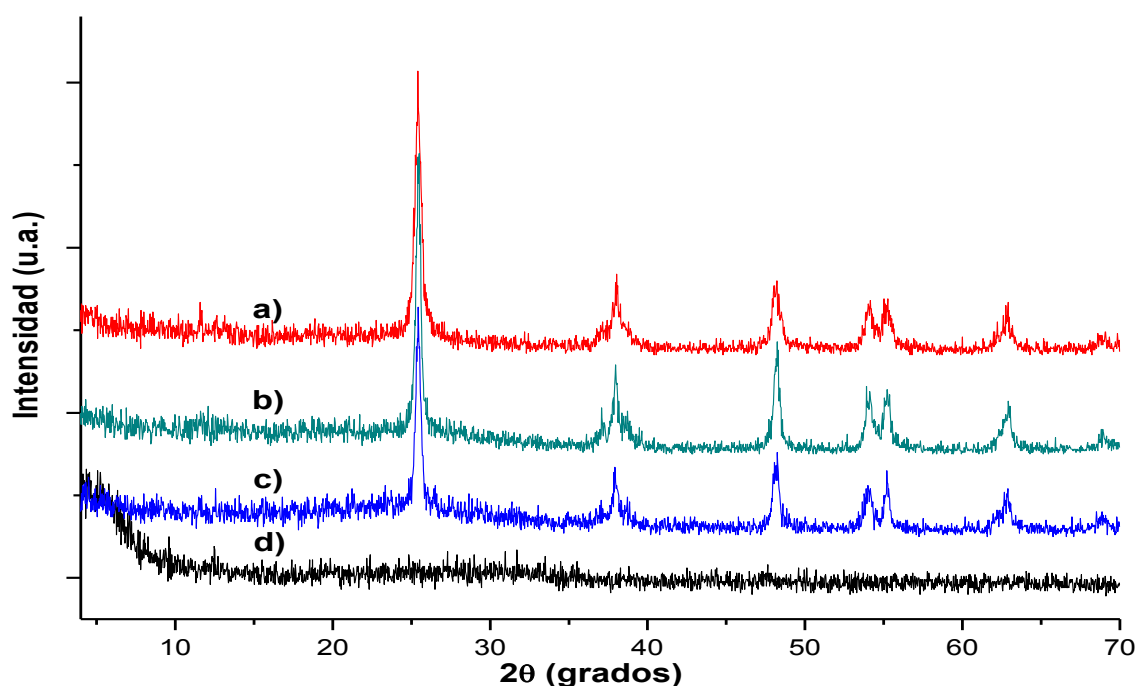
unos pequeños picos en las regiones de 2950-2900, 1460 y 1380  $\text{cm}^{-1}$  que se atribuyen a vibraciones de estiramiento y deformación del enlace C-H y a 1120  $\text{cm}^{-1}$  a la deformación de los enlaces O-C de los remanentes del precursor sugiriendo que la hidrólisis fue incompleta.<sup>73</sup> Debido a que la banda de flexión de los enlaces H-O-H está en la región donde también aparecen las vibraciones de los grupos amida, no es posible asignar las vibraciones de C-H al péptido o al grupo alcoxi. Por último, en la Figura 4.8d se muestra el espectro de infrarrojo de la muestra preparada con el péptido HH después de calcinarla a 500 °C por una hora. En él únicamente se observa la banda característica de los enlaces de Ti-O.



**Figura 4.8** Espectros de infrarrojo de TiO<sub>2</sub> usando una relación molar Ti:iPrOH:H<sub>2</sub>O 1:66:5. a) Con el péptido H; b) Con el péptido HH; c) Control negativo; d) Con el péptido HH después de calcinar a 500 °C. La región de 1500-1000  $\text{cm}^{-1}$  se muestra ampliada para mayor detalle.

Aunque en las muestras observadas por TEM y difracción de electrones mostraron la formación de cristales nanométricos cuando se empleó el péptido control, por difracción de rayos X no fue posible detectar fases cristalinas, Figura 4.9d. Esto probablemente se deba a que el tamaño de los cristales es muy pequeño y/o la cantidad de nanocristales en la muestra es insuficiente para ser detectadas por el equipo de difracción de rayos X. Sin embargo, los nanocristales que coexisten con la región amorfa pueden comportarse como semillas de cristalización (o nucleación) e inducir cambios cristalinos a temperaturas menores que las

reportadas en experimentos de biomineralización donde necesitan temperaturas alrededor de  $700^{\circ}\text{C}$  o mayores para lograr la transición de amorfo a cristalino.<sup>49, 64, 74</sup> Para probar esta hipótesis se realizaron experimentos de calcinación de diferentes muestras, las cuales fueron tratadas térmicamente a  $500^{\circ}\text{C}$  durante una hora. Las Figuras 4.9a, b y c muestran los difractogramas de los sólidos obtenidos después de la calcinación que corresponden al control negativo, la muestra preparada en presencia de HH y al control positivo respectivamente. En todas las muestras calcinadas se observan prácticamente los mismos picos a  $2\theta = 25.3^{\circ}$ ,  $37.9^{\circ}$ ,  $48.1^{\circ}$ ,  $54.0^{\circ}$ ,  $55.1^{\circ}$  y  $62.8^{\circ}$  que corresponden a los planos de anatasa (101), (004), (200), (105), (211) y (204) respectivamente (JCPDS 21-1272). Las muestras calcinadas no presentan diferencias significativas en los difractogramas.

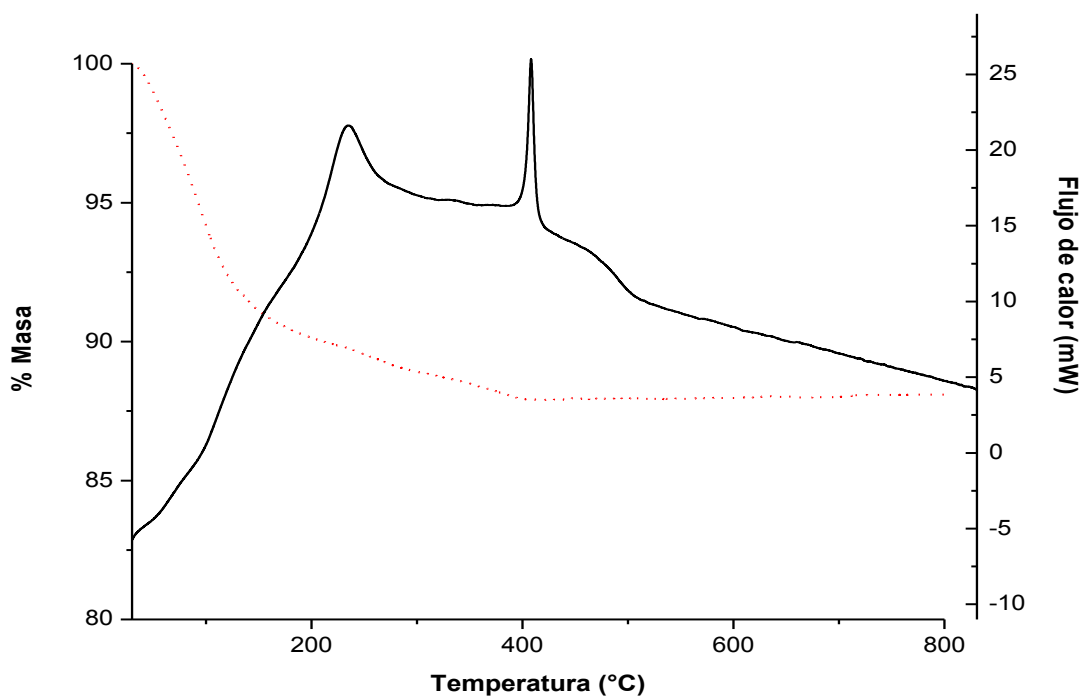


**Figura 4.9** Difractogramas de rayos X de algunas muestras de  $\text{TiO}_2$ . Calcinadas a  $500^{\circ}\text{C}$  a) Control negativo, b) Con el péptido HH, c) Con el péptido H y sin calcinar d) Con el péptido H. Las muestras calcinadas tienen picos de difracción correspondientes a anatasa (JCPDS 21-1272).

Se realizó el análisis térmico gravimétrico (TGA, *thermal gravimetric analysis*) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC, *differential scanning calorimetry*) del  $\text{TiO}_2$  obtenido con el control positivo y el control negativo. En el TGA del control negativo (Figura 4.10) de  $30^{\circ}\text{C}$  a  $100^{\circ}\text{C}$  hay una pérdida de masa alrededor del 4% que corresponde a la evaporación del solvente en la superficie. A temperaturas mayores de  $100^{\circ}\text{C}$  la pendiente de la curva de TGA es menor llegando a un valle a  $400^{\circ}\text{C}$  donde la pérdida de masa total es de 12% que es debida a la materia orgánica (precursor, solvente). El DSC (Figura 4.10) muestra

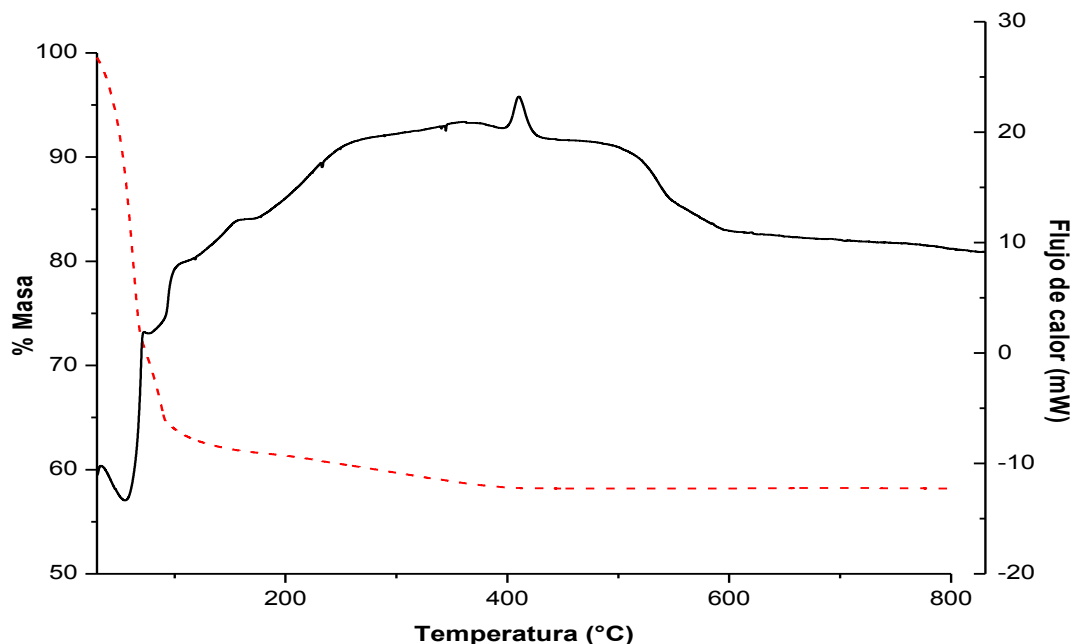
que a 100°C el proceso es endotérmico, después se vuelve exotérmico y aparece un pico debido a la eliminación de materia orgánica a 220°C, y otro pico a 395°C que corresponde a la transición a anatasa.

El TGA del control positivo (Figura 4.11) también muestra una pérdida de masa de 30-100°C que corresponde al 36%, esta pérdida de masa tan grande se debió a la utilización de etanol para trasvasar la muestra del tubo a la celda de platino. Después de 100°C la muestra continúa perdiendo masa para llegar a un porcentaje de masa constante de 58% a 395°C. La pérdida de masa entre 100 y 395°C corresponde a la pérdida de materia orgánica (descomposición del péptido y del precursor) que, comparado con el porcentaje de pérdida del control positivo (22%) respecto a la del control negativo (8%) presenta una mayor pérdida lo que concuerda con la presencia del péptido en la muestra. El DSC del control positivo (Figura 4.11) muestra pequeños picos exotérmicos a 72°C, 100°C y 158°C, el primero correspondiente a la evaporación del etanol y los otros a la desorción de agua; a 250°C hay un pico muy amplio que se debe a la pérdida de materia orgánica, finalmente en 360°C y 395°C dos picos anchos que podrían corresponder a la transición a anatasa de la fase amorfa en la muestra, la anchura de los picos pueden deberse a que la transición de fase se presenta lentamente a temperaturas menores a 395°C y cuando se alcanza esta temperatura, queda poca muestra amorfa lo que explicaría el pequeño pico a 395°C.



**Figura 4.10** TGA (línea punteada) y DSC (línea continua) de  $\text{TiO}_2$  (control negativo) usando la relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5.





**Figura 4.11** TGA (línea punteada) y DSC (línea continua) de  $\text{TiO}_2$  biomaterializado con el péptido H [4 mg/mL] usando la relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:66:5.

A partir de los resultados anteriores, se realizaron reacciones con todos los péptidos empleando la relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  de 1:145:10, con la cual se logró una reacción lenta (alrededor de 2 horas para que aparezcan partículas). En principio, estas condiciones nos permitirían obtener estructuras más cristalinas, pues se lograría un control cinético de la condensación. Al final de las reacciones, aquellas en las que se utilizó algún péptido las partículas blancas de  $\text{TiO}_2$  permanecían suspendidas, lo que sugiere la presencia de partículas nanométricas de  $\text{TiO}_2$ , mientras que en el control negativo las partículas precipitaron completamente, Figura 4.12.

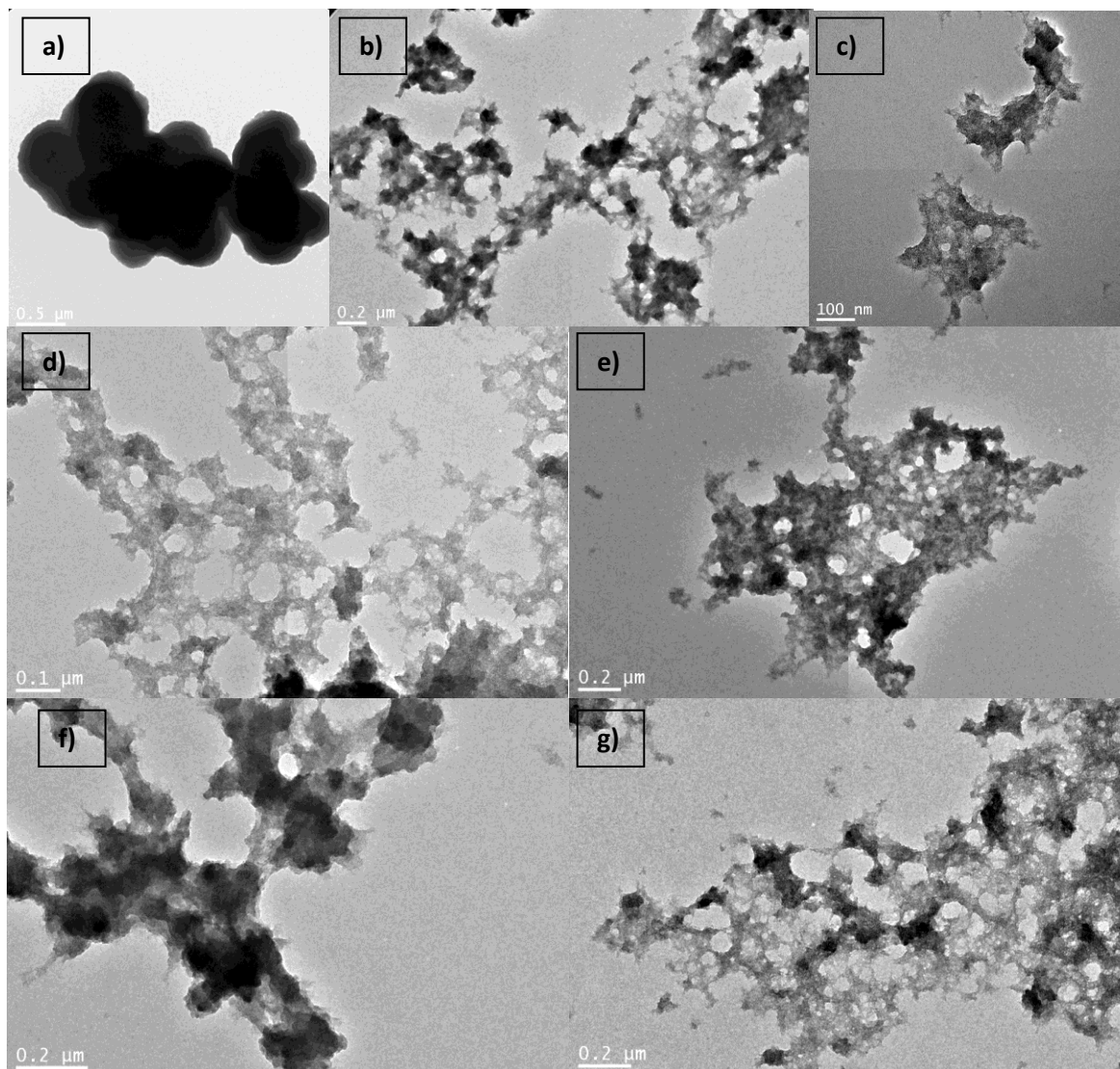


**Figura 4.12** Resultado final de las reacciones con relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:145:10 control negativo (izquierda); control positivo [4 mg/mL] (derecha).

En la Figura 4.13 se muestran las imágenes representativas de TEM de cada una de las reacciones con los diferentes péptidos usando la relación molar Ti:iPrOH:H<sub>2</sub>O 1:145:10. De los patrones de difracción de electrones (no mostrados) ninguna muestra presentó fases cristalinas. Comparando la muestra preparada control negativo (Fig. 4.13a) con aquellas biomineralizadas existe una gran diferencia en tamaño y forma. Mientras que con el control negativo se obtuvieron partículas aglomeradas con tamaño >2µm, con las muestras en presencia de bioplantilla se obtienen redes nanométricas. En concreto, se observa que:

- 1) La velocidad de reacción se controla evitando la formación inmediata de hidro-óxidos.
- 2) La interacción entre el péptido-precursor controla las reacciones de hidrólisis-condensación permitiendo la formación de coloides indicando la presencia de nanopartículas.

Por lo tanto podemos concluir que efectivamente hay un efecto de plantilla cuando se emplea un péptido.



**Figura 4.13** Imágenes de TEM del  $\text{TiO}_2$  sintetizado usando la relación molar 1:145:10: a) Sin péptido; b) L c) HK; d) H; e) KK; f) HH; g) R. Ninguna presenta fases cristalinas. Escala: a) 500 nm; b), e), f) y g) 200 nm; c) y d) 100 nm.

A pesar de que se observó la formación de nanopartículas organizadas en presencia de la bioplantilla, éstas eran amorfas. Así, incrementamos la concentración del péptido para que las probabilidades de las interacciones entre ambas moléculas fueran mayores y por consecuencia el efecto plantilla. Esto con el fin de propiciar la formación de estructuras cristalinas. Cuando se intentó usar una relación mayor de Ti:péptido con soluciones peptídicas con concentración de 4 mg/mL el resultado fueron precipitados grandes, pues la relación  $\text{Ti}:\text{H}_2\text{O}$  incrementó también. Por ello, se utilizó una solución peptídica más concentrada (8 mg/mL) y se probó la relación molar  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:145:50 la cual después de un día gelificó. Adicionalmente se incrementó la relación molar de alcohol, los cuales al usar la relación  $\text{Ti}:\text{iPrOH}:\text{H}_2\text{O}$  1:500:100 con una solución peptídica de 4 mg/mL

el resultado fue la formación de un gel, mientras que si se incrementa la relación molar de isopropanol Ti:iPrOH a 1:1450 no reacciona.

En la Tabla 4.2 se resumen las reacciones realizadas y los resultados obtenidos. A pesar de que la velocidad de reacción disminuye al incrementar la relación molar entre Ti:iPrOH de 1:66 a 1:145 no fue posible obtener fases cristalinas pero sí un tamaño menor de las partículas. Si se incrementa la cantidad de péptido en la relación molar 1:145 el resultado es un gel. Por lo tanto la cristalinidad del producto en la biomineralización no sólo depende de la velocidad, sino de otros factores que pueden estar relacionados con factores estructurales del péptido. Estos resultados muestran la gran versatilidad del proceso sol-gel para la síntesis de óxidos, y esto permitió obtener diversas estructuras y tamaños de TiO<sub>2</sub>.

**Tabla 4.2** Resumen de reacciones de biomineralización con Ti(PrO)<sup>i</sup><sub>4</sub>

<b>Relación molar Ti:iPrOH:H<sub>2</sub>O</b>	<b>Péptido (4 mg/mL)</b>	<b>Resultado</b>
<b>1:66:5</b>	H	Nanopartículas enlazadas. Con sitios cristalinos
	L, HH, HK, KK, R	Estructuras sin morfología ni tamaño definido. Amorfos.
	Sin péptido	Precipitados
<b>1:145:10</b>	H	Redes de TiO <sub>2</sub> amorfo ~50 nm de diámetro
	R, KK, L, HH, HK	Redes de TiO <sub>2</sub> amorfo de tamaño ≥50 nm de diámetro
	Sin péptido	Precipitados >2 μm
<b>1:145:50</b>	H*	Gel (1 día)
	Sin péptido	Precipitados
<b>1:500:100</b>	H	Gel (4 días)
	Sin péptido	Precipitados
<b>1:1450:100</b>	H	No reacciona
	Sin péptido	Precipitados

\*Con una solución peptídica 8 mg/mL

### 4.3 Síntesis de SiO<sub>2</sub> por biomineralización

Como los alcóxidos de silicio reaccionan más lento que los de titanio fue posible estudiar el efecto que tiene el pH sobre la biomineralización utilizando distintos amortiguadores y tetraetilortosilicato (TEOS) como precursor de silicio. La relación molar péptido:TEOS utilizada para la biomineralización de sílice fue de 1:50.

En la Tabla 4.3 se muestran las reacciones de biomineralización realizadas con TEOS y el péptido H (control positivo) a una concentración de 2 mg/mL en diferentes amortiguadores a una concentración de 50mM. El tiempo de gelación fue de tres días al igual que la formación de los coloides.

**Tabla 4.3** Reacciones con el péptido H en diferentes amortiguadores con una relación molar péptido:TEOS de 1:50.

Amortiguador	Sin péptido	Péptido H	pH
MES	Gel	X	3.3
PIPES	Gel	X	- (ácido)
NaCit	Gel	Gel	4.3
NaAc	Gel	Gel	4.4
BaAc	Gel	Gel	4.6
Fosfatos (PBS)	Precipitado	Precipitado	6.5
TRIS	X	Coloide	8.0
Boratos	X	Coloide	9.3

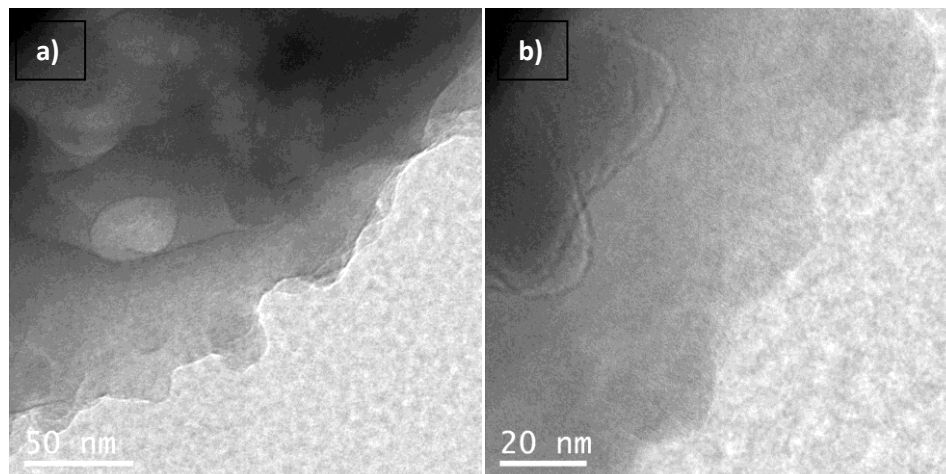
X=Sin cambios

Todas las reacciones control en medio ácido formaron un gel, mientras que las básicas no reaccionaron. Con el péptido H, solamente las reacciones que tenían acetatos o citratos gelaron a pesar de que los amortiguadores MES y PIPES tenían pH ácido, mientras que en amortiguadores básicos se forman coloides lo que sugirió la presencia de nanopartículas. En amortiguador de fosfatos (PBS) el resultado fue similar ambos controles sugiriendo que la precipitación fue inducida por los fosfatos.

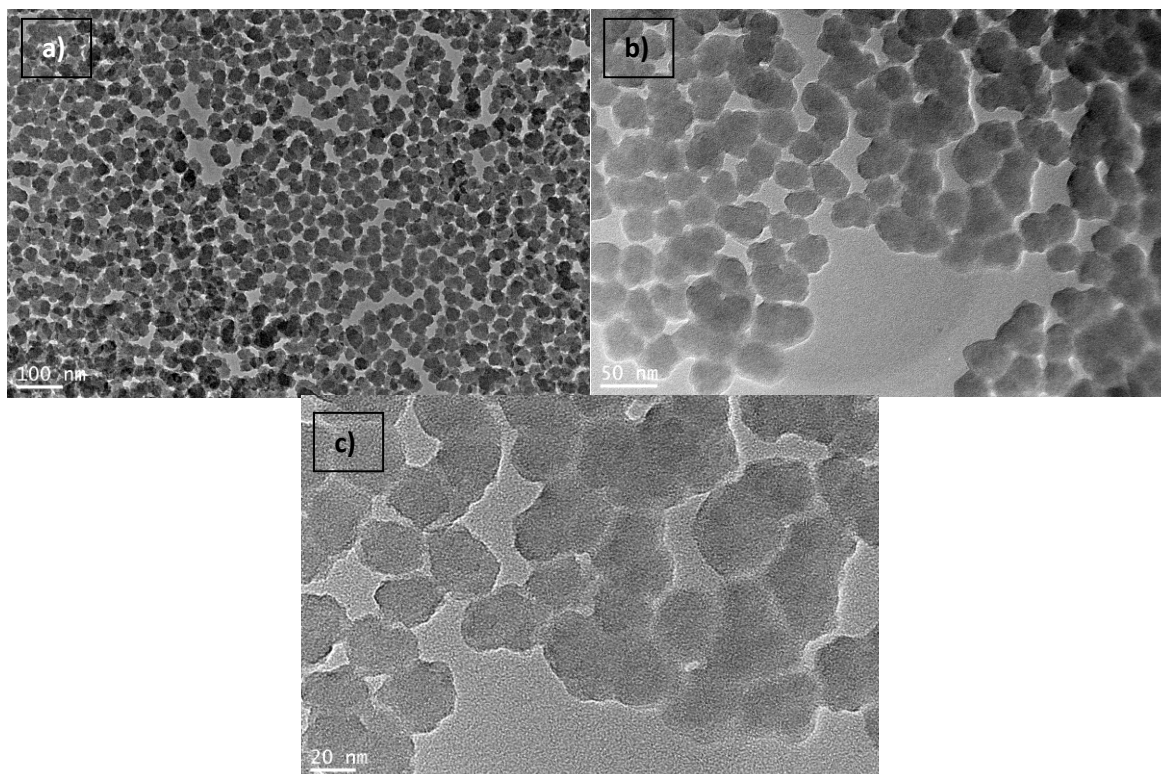
En la Figura 4.14 se muestran imágenes de TEM de la muestra de sílice preparada con el péptido H en PBS. La morfología y tamaño no son definidos, algo que podría suponerse del hecho de que se forman precipitados con o sin la presencia del péptido, lo cual podría indicar que no hay un verdadero efecto de biomineralización debida al péptido.

La Figura 4.15 muestra algunas imágenes de la muestra obtenida con el péptido H en el amortiguador TRIS. La morfología y tamaño están bastante definidos, siendo

el tamaño de partícula promedio de 30 nm. En la reacción sin péptido (control negativo) la formación de partículas es nula, por lo que la formación de las nanopartículas es atribuible a la presencia del péptido, indicando un efecto en la biomineralización de  $\text{SiO}_2$ .

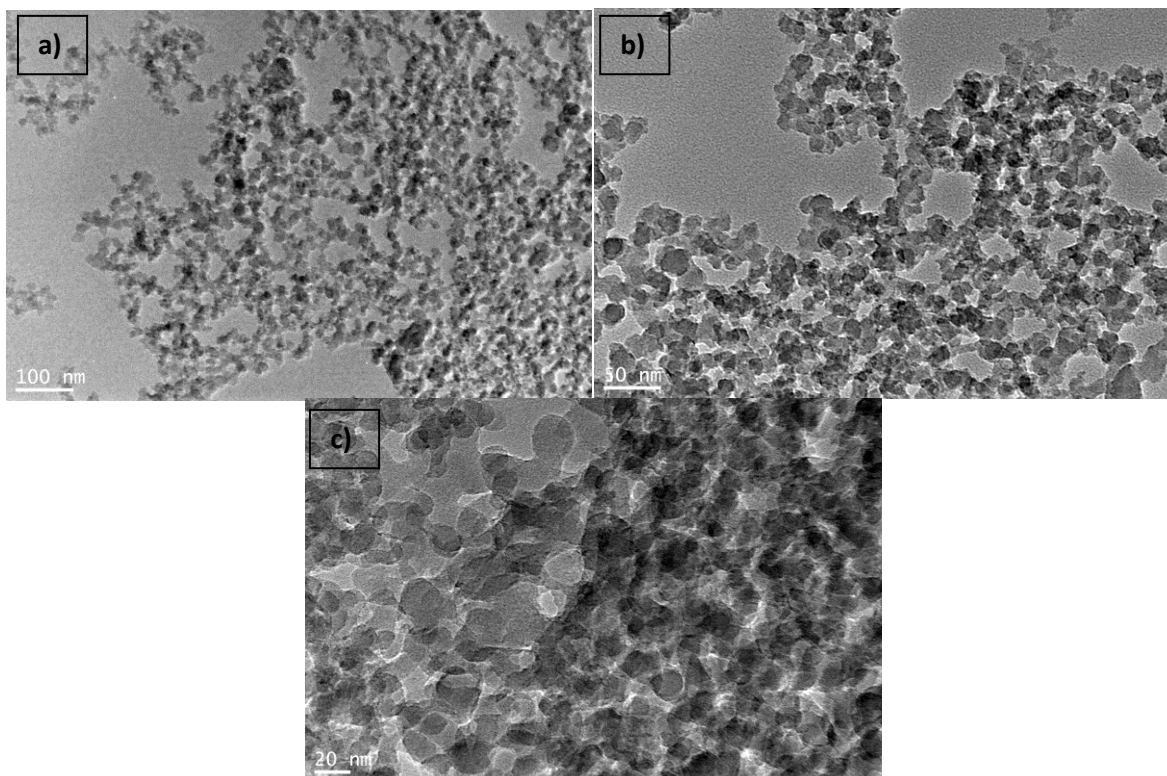


**Figura 4.14** Imágenes de TEM de  $\text{SiO}_2$  biomineralizado con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador de fosfatos (PBS). Escala: a) 50 nm, b) 20 nm.



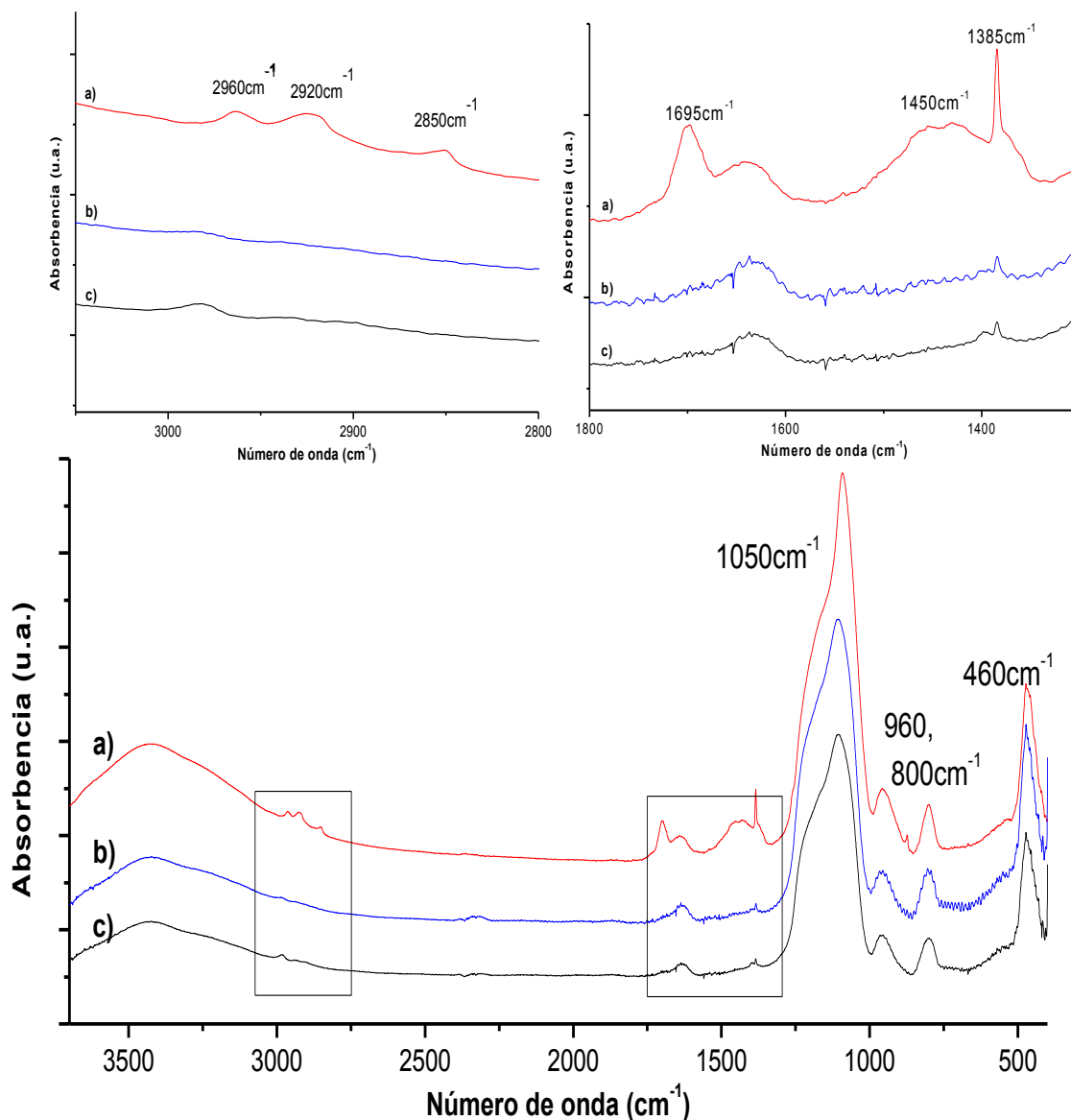
**Figura 4.15** Imágenes de TEM de  $\text{SiO}_2$  biomineralizado con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador TRIS. Escala: a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm.

Con el amortiguador de boratos, con pH de una unidad mayor que con TRIS, las partículas de  $\text{SiO}_2$  formadas no están tan bien definidas como las que se obtuvieron con el amortiguador TRIS, Figura 4.16. Las partículas forman redes de  $\text{SiO}_2$  de tamaño nanométrico, lo que explicaría el coloide formado.



**Figura 4.16** Imágenes de TEM de  $\text{SiO}_2$  sintetizado con el péptido H [2 mg/mL] en amortiguador de boratos. Escala: a) 100 nm, b) 50 nm, c) 20 nm.

En la Figura 4.17 se muestran espectros de infrarrojo de  $\text{SiO}_2$  preparado sin péptido y con el péptido H en PBS tras uno y dos lavados con etanol. En todos los casos se observan las bandas características de la sílice: 1050, 960, 800 y 460  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes al estiramiento asimétrico Si-O-Si, estiramiento en el plano Si-O, estiramiento simétrico Si-O y deformación de los enlaces Si-O-Si respectivamente, así como también la banda ancha a 3400 y 1600  $\text{cm}^{-1}$  de los grupos OH.<sup>75</sup> En la muestra lavada una sola vez (Figura 4.17a), se logran ver bandas a 2900 y 1450  $\text{cm}^{-1}$  de estiramiento asimétrico y deformación de enlaces C-H y otra en 1695  $\text{cm}^{-1}$  en la región donde aparecen las vibraciones del enlace peptídico.<sup>76, 77</sup> La muestra lavada por segunda vez, al igual que el control negativo, no presenta esta banda (Figuras 4.17b, c), lo que sugiere que después de la biomineralización el péptido permanece en la superficie de las partículas y no atrapado en ellas.



**Figura 4.17** Espectros de IR de las muestras de SiO<sub>2</sub> preparadas con el péptido H usando una concentración de [2 mg/mL] en amortiguador PBS. a) Lavada una vez, b) Lavada dos veces; c) Control negativo. Se muestran algunas regiones amplificadas para mayor detalle.

A partir de los resultados anteriores se eligió el amortiguador TRIS para los experimentos de biomineralización con los demás péptidos debido a que en este amortiguador se produjeron partículas bien definidas. La Tabla 4.4 Muestra los resultados de las pruebas de biomineralización de SiO<sub>2</sub> con todos los péptidos en amortiguador TRIS 50mM. Los únicos péptidos además del H en los que se observa biomineralización son el KK y el R. Sin embargo en ambos se observan precipitados, lo que indica que el tamaño de las partículas no son lo suficientemente pequeñas como las formadas con el péptido H.



Los resultados negativos de biomineralización con la mayoría de los péptidos podría deberse a la falta de interacciones específicas con las especies de silicio. Las cargas electrostáticas no son factor determinante para la biomineralización de sílice, pues los péptidos H, KK y L con el mismo valor de carga dan resultados diferentes en la biomineralización, sin embargo, únicamente los péptidos con mayor carga fueron capaces de inducirlos. Por lo tanto, una secuencia con grupos funcionales específicos y una carga superficial adecuada son factores que influyen para una buena biomineralización.

**Tabla 4.4** Pruebas de biomineralización de SiO<sub>2</sub> con los péptidos en amortiguador TRIS 50mM.

<b>Péptido</b>	<b>Resultado</b>	<b>Carga*/e</b>
<b>R</b>	Precipitados	3.5+
<b>H</b>	Coloide	2.5+
<b>KK</b>	Coloide con precipitados	2.5+
<b>L</b>	X	2.5+
<b>HH</b>	X	1.5+
<b>HK</b>	X	1.5+
<b>Sin péptido</b>	X	-

X= Sin cambios

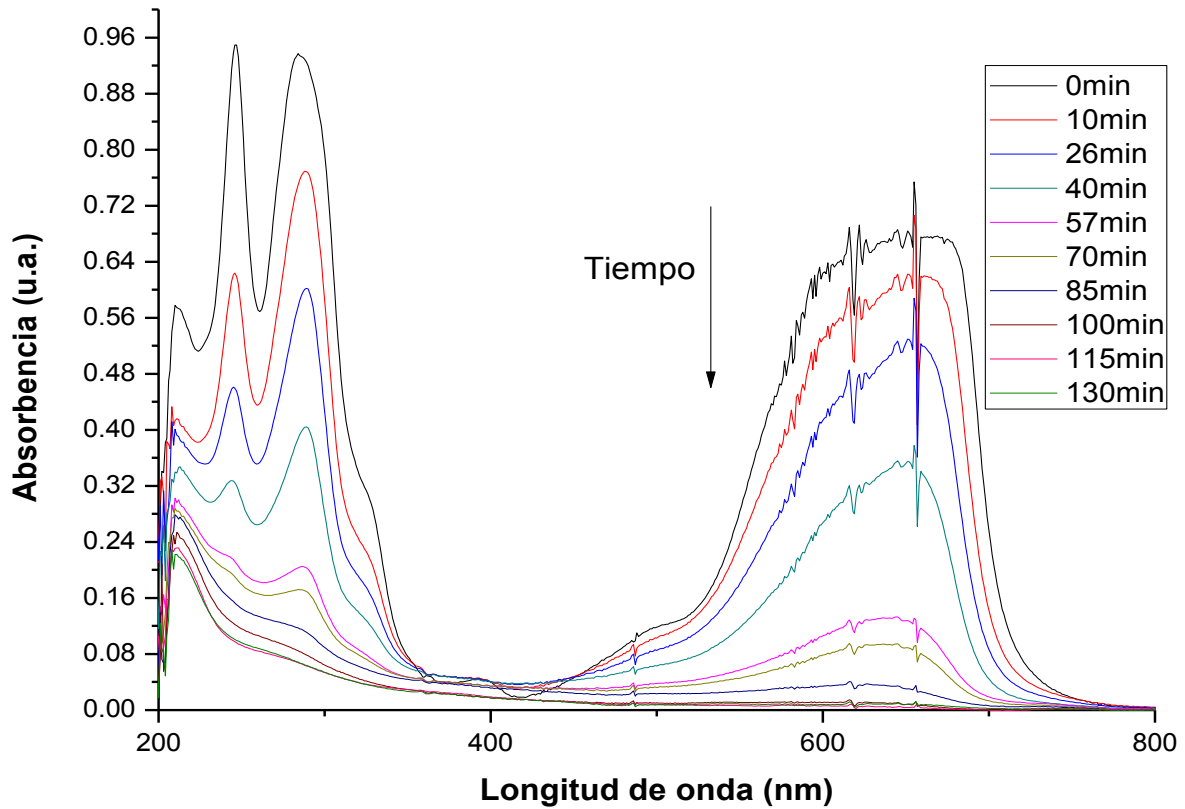
\*Calculada con el programa *Protein Calculator* tomando el valor de pH=8.

#### 4.4 Actividad fotocatalítica

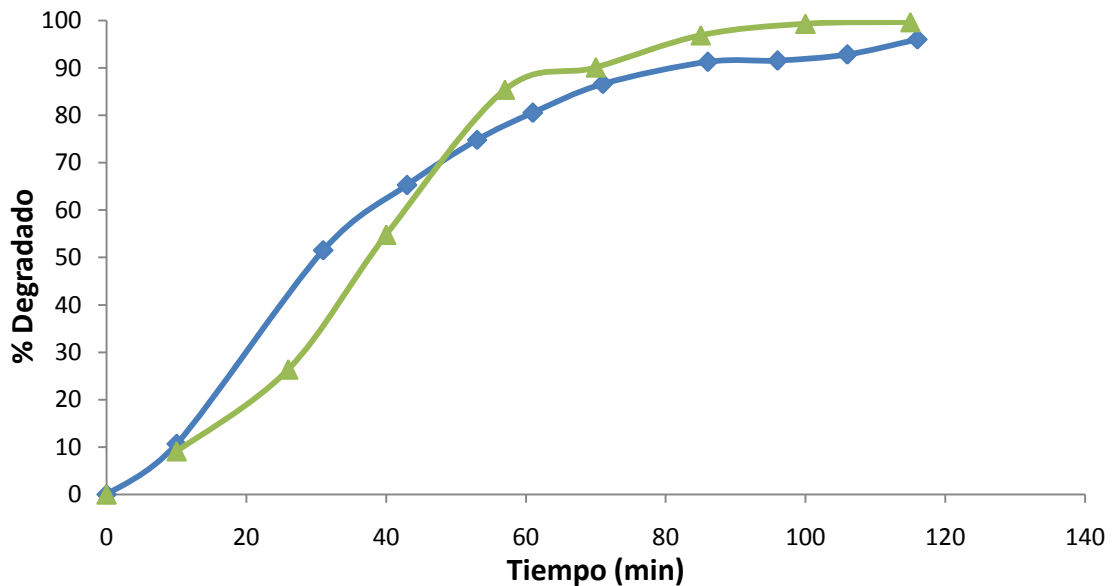
Debido a la importancia del  $\text{TiO}_2$  como fotocatalizador, se realizaron experimentos de fotocátalisis a fin de comparar los materiales obtenidos de manera tradicional y los obtenidos por biomineralización. Se comparó la eficiencia de degradación del azul de metileno (AM) con la muestra obtenida con el péptido H calcinada a  $500^\circ\text{C}$  y con nanopartículas (NPs) de anatasa comercial. En la Figura 4.18 se muestran los espectros de absorción de las muestras de fotocátalisis con AM y las muestras preparadas con el péptido H calcinadas a  $500^\circ\text{C}$  en función del tiempo, las cuales muestran prácticamente la total descomposición de AM después de 100 minutos de irradiación UV. En la Figura 4.19 se muestran los resultados de la fotodegradación de AM con el  $\text{TiO}_2$  biomineralizado (verde) y las NPs de anatasa. Se observa que a los 85 minutos el  $\text{TiO}_2$  biomineralizado ha degradado el 96.9% de AM mientras que las NPs de anatasa comercial sólo el 91.2% y a los 100 minutos la degradación es prácticamente completa, lo que las NPs de anatasa logran después de 115 minutos.

Adicionalmente se realizó la prueba de degradación de AM sin catalizador para tomar en cuenta el efecto únicamente de la lámpara de UV. El resultado en la degradación después de 120 minutos de irradiación UV fue prácticamente nulo (1.5%).

De la Figura 4.19 se observa que el  $\text{TiO}_2$  obtenido por biomineralización, a pesar de no tener un menor tamaño a las NP de anatasa comercial muestra una eficiencia tan buena como ellas.



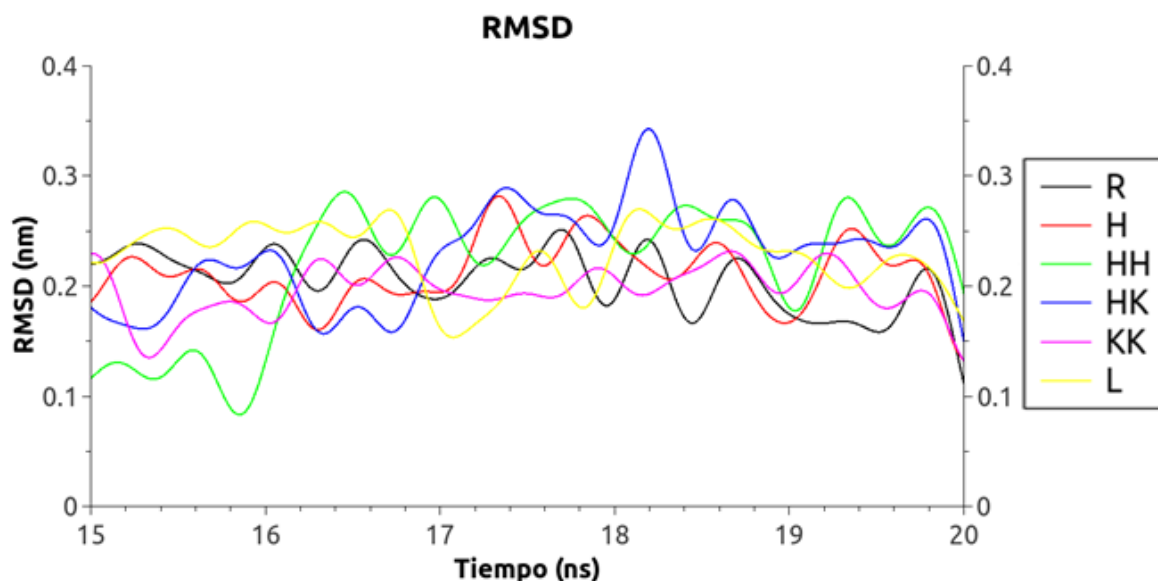
**Figura 4.18** Espectros de absorción UV-vis de AM respecto al tiempo de irradiación UV de cada muestra de fotocatalisis usando el  $\text{TiO}_2$  biomineralizado con el péptido control.



**Figura 4.19** Porcentaje de AM degradado respecto al tiempo de la fotocatalisis con la muestra por biomineralización calcinada (triángulos) y NP de anatasa comercial (rombos).

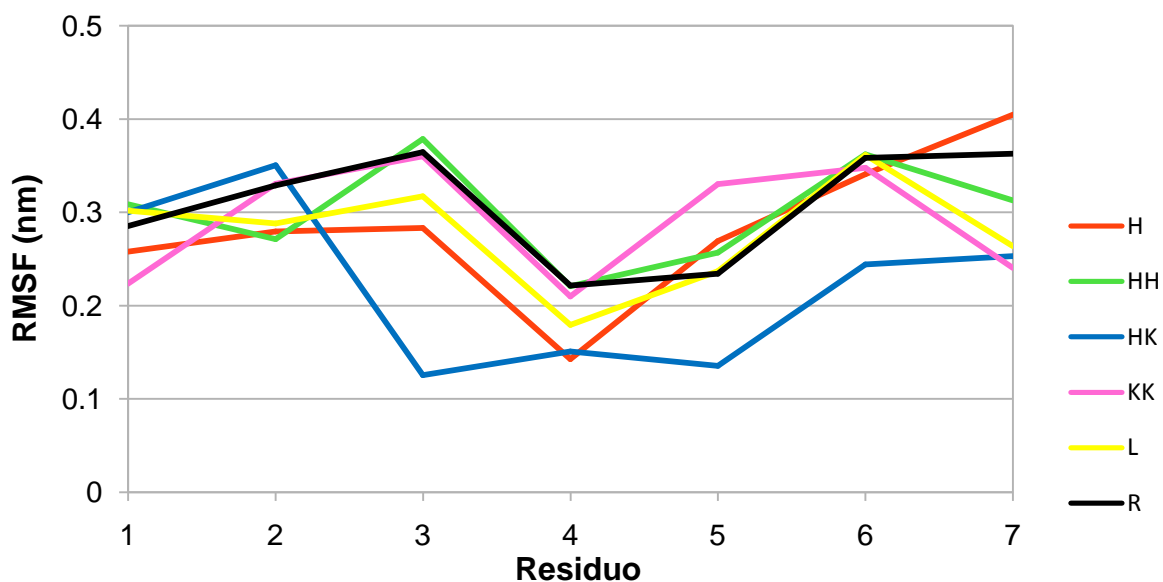
#### 4.5 Simulaciones por dinámica molecular

Luego de haber hecho las simulaciones, se analizó la desviación media cuadrática (RMSD) para determinar si las estructuras en los últimos nanosegundos de la simulación convergían. En la Figura 4.20 se muestra la RMSD de los péptidos simulados en los últimos 5ns. Las fluctuaciones son respecto a la estructura inicial (estructura extendida). Debido a que los péptidos son pequeños, la estructura no es fija y la desviación media cuadrática fluctúa desde 1.5Å hasta 3Å.

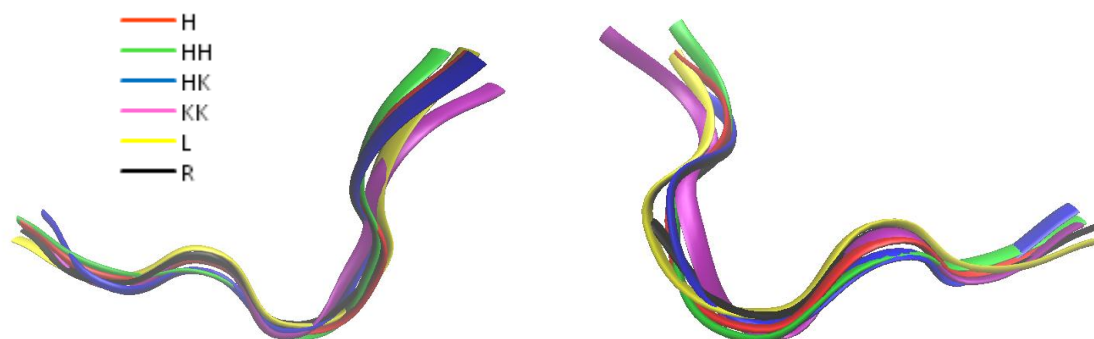


**Figura 4.20** Desviación de la media cuadrática (RMSD) de los péptidos en los últimos 5ns de simulación.

Para conocer la fluctuación de cada residuo en la estructura promedio se obtuvo el RMSF por residuo de los últimos 3ns, Figura 4.21. En todos los casos el residuo más restringido en movimiento es la prolina, a excepción del péptido HK en el cual los residuos 3 y 5 (H y S) están restringidos debido a la formación de un puente de hidrógeno entre ellos. El péptido KK tiene una gran movilidad en el residuo 5 pues tiene una histidina con un grupo lateral más grande que los demás con una serina.



**Figura 4.21** Fluctuación de la media cuadrática por residuo en los últimos 4ns de simulación. Los residuos se numeran del N-terminal al C-terminal.

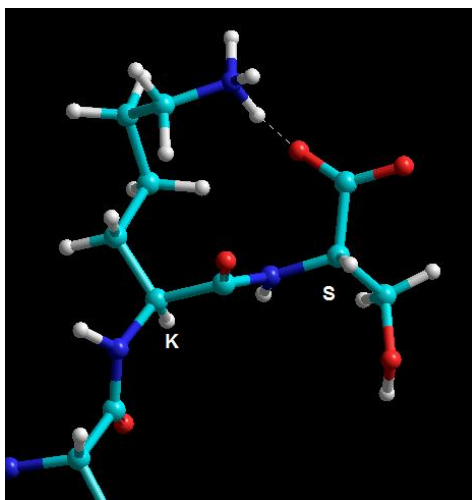


**Figura 4.22** Estructuras secundarias alineadas de los péptidos utilizados para biomineralizar. Izquierda: de N-terminal a C-terminal. Derecha: de C-terminal a N-terminal.

La Figura 4.22 muestra las estructuras secundarias promedio alineadas de los péptidos utilizados para biomineralizar. Todas las estructuras son muy similares, por lo que no se puede atribuir un efecto de la conformación del péptido para la biomineralización. De esta manera, las cadenas laterales de los residuos son los que otorgan la mayor influencia estructural a las mutantes.

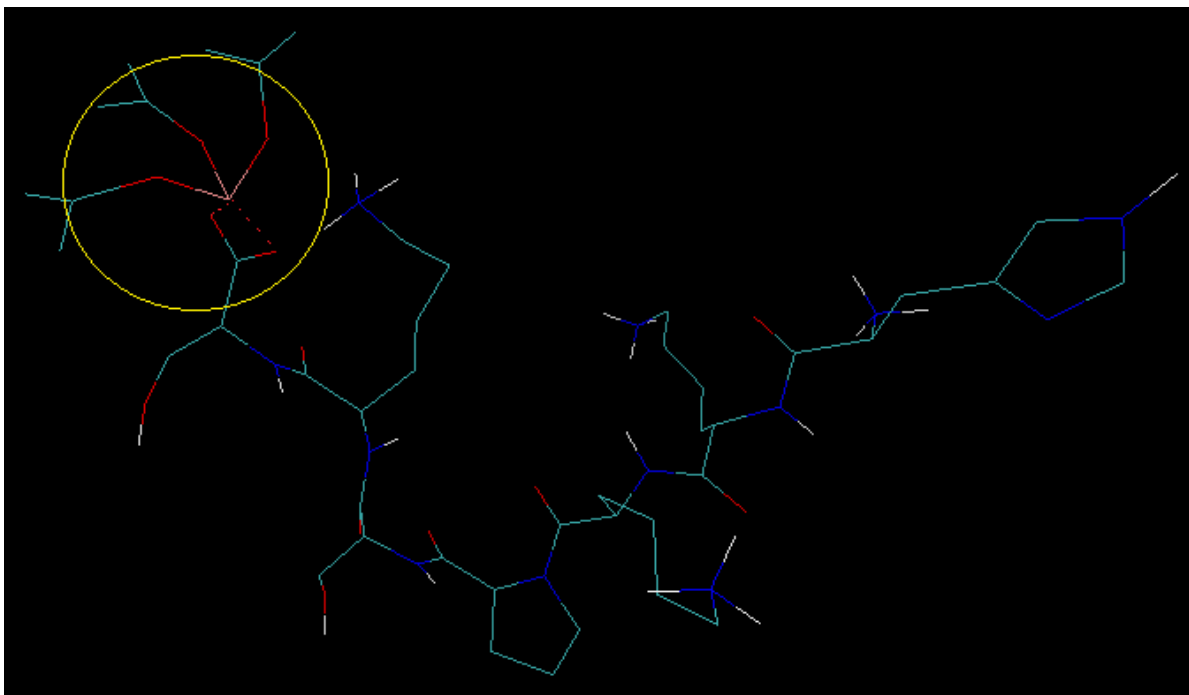
Los últimos dos residuos (-KS) se conservan en todos los péptidos y forman un puente de hidrógeno entre el grupo amino de la lisina y el carboxilo de la serina C-terminal. Figura 4.23. Este puente de hidrógeno contribuye a mantener estos residuos con una conformación relativamente fija, sin embargo, como se observa en el RMSF (Figura 4.21), el residuo de serina C-terminal del péptido H es el que

presenta la mayor fluctuación de todos, sugiriendo que el puente de hidrógeno es más débil en el péptido control.



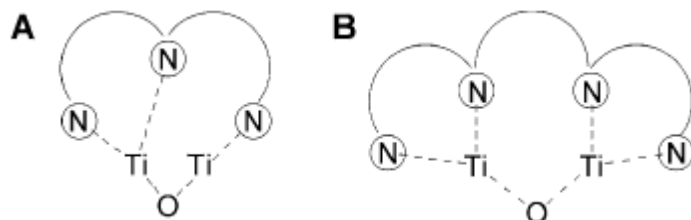
**Figura 4.23** Representación del puente de hidrógeno formado por los residuos K y S (C-terminal).

La reducción en la velocidad de reacción se puede atribuir a la presencia de grupos amino, carbonilo y el carboxilo del residuo C-terminal. Estos grupos electrodonadores pueden actuar como ligantes formando un complejo con el titanio como sucede con el ácido acético o la acetil acetona así como también anillos piridínicos y aminas.<sup>78</sup> En la Figura 4.24 se muestra un esquema de cómo el grupo carboxilo de la serina C-terminal forma un complejo con el  $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$  que desplaza a un grupo propóxido. Y como ya se mencionó, el residuo C-terminal del péptido control tiene la mayor RMSF lo cual ayudaría a interactuar más fácil y rápidamente con los alcóxidos.



**Figura 4.24** Representación del péptido H con el carboxilo de la serina C-terminal ligado a  $\text{Ti}(\text{OPr}^t)_3^+$  (círculo amarillo).

Como también proponen Cole y Valentine<sup>79</sup> los grupos amino son importantes para la biomineralización de  $\text{TiO}_2$ . Si existen pocos grupos amino adyacentes, no es posible el acercamiento de átomos de titanio para su posterior condensación. Así las diaminas sólo pueden complejar a un átomo de titanio y no son capaces de inducir la precipitación de  $\text{TiO}_2$  usando TiBALDH como precursor, Figura 4.25. De esta manera, la posición de los grupos carbonilo y amina del enlace peptídico y de los grupos laterales de los residuos deben ser determinantes en la biomineralización de estructuras cristalinas de  $\text{TiO}_2$ .



**Figura 4.25** Modelo de complejación de titanio con grupos amino.<sup>79</sup>

## Capítulo 5

### Conclusiones y perspectivas

#### 5.1 Conclusiones

El péptido control (HKKPSKS) mostró afinidad a precursores de Ti y Si, induciendo la formación de partículas nanoestructuradas. Incluso, en el caso de Ti, el péptido control indujo la formación de nanocristales de  $\text{TiO}_2$ .

Las distintas mutantes probadas en los experimentos de biomineralización de  $\text{TiO}_2$ , al igual que con el péptido control, disminuyen la velocidad de hidrólisis. Esto debido a los grupos carbonilo y carboxilo pueden coordinarse con el catión de titanio para formar un complejo más estable que el alcóxido.

Las mutantes también indujeron la formación de nanopartículas, sin embargo, no fue posible obtener nanocristales. Por lo tanto, los cambios puntuales en cada una de las mutantes modifican la interacción péptido-precursor, lo que impide la formación de los nanocristales, debido en parte a las distintas cargas superficiales.

Las pruebas con tetraetilortosilicato mostraron una dependencia del pH en la capacidad de nanoestructurar  $\text{SiO}_2$ . Las mutantes con mayor carga a pH básico si pudieron biomineralizar, no obstante, sólo con el péptido control se obtuvieron nanopartículas lo que comprueba la gran importancia de la secuencia peptídica en la biomineralización.

Además de lo anterior, la síntesis empleando estas bioplantillas, depende de la relación molar del precursor, alcohol, agua, péptido, y de otros agentes como la acetil acetona.

Las simulaciones de dinámica molecular sugieren que cada una de las mutantes tiene diferentes grados de libertad que se relaciona con el control de la interacción con el precursor y la cinética de las reacciones de hidrólisis-condensación.

El  $\text{TiO}_2$  obtenido por biomineralización presentó actividad en la fotodegradación de azul de metileno, la cual mostró ser tan efectiva con respecto a nanopartículas <25 nm de anatasa comercial.



## 5.2 Perspectivas

A partir de los resultados podría esperarse que con las condiciones adecuadas de reacción, se logre una síntesis de nanopartículas totalmente cristalinas de  $\text{TiO}_2$  a temperatura ambiente. Queda pendiente hallar el método óptimo que permita tener un control en la morfología, tamaño y cristalinidad.

Es necesario estudiar de manera detallada el mecanismo de reacción para comprender el proceso de biomineralización. Estudios teóricos más específicos, tales como el acoplamiento molecular (*docking*) y dinámicas *ab initio*, podrían ser útiles para explicar la interacción péptido-precursor y esclarecer qué tipo de unión o uniones son esenciales para la formación de estructuras cristalinas.

El conocimiento claro de estos procesos biomiméticos permitirá la construcción *ab initio* de péptidos con capacidad para biomineralizar. También queda en espera adaptar estas rutas de biomimética sol-gel a la síntesis de otros materiales novedosos.

## Capítulo 6

### Referencias

1. Swamy, V.; Galeb, J. D.; Dubrovinsky, L. S. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **2001**, 62, 887-895.
2. Buettner, K. M.; Valentine, A. M. *Chemical reviews* **2012**, 112, (3), 1863-81.
3. Chen, X.; Mao, S. S. *Chemical reviews* **2007**, 107, (7), 2891-959.
4. Sarikaya, M.; Tamerler, C.; Jen, A. K.-Y.; Schulten, K.; Baneyx, F. *Nature materials* **2003**, 2, (September), 577-585.
5. Li, W.; Zeng, T. *PloS one* **2011**, 6, (6), e21082.
6. Kumar, C. S. S. R., *Nanomaterials for the life sciences*. 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2009; Vol. 2.
7. Kumar, C. S. S. R., *Nanostructured oxides*. Wiley-VCH; John Wiley: Weinheim, Chichester, 2009; p xxiii, 507 p.
8. Mann, S.; Ozin, G. A. *Nature* **1996**, 382.
9. Dickerson, M. B.; Sandhage, K. H.; Naik, R. R. *Chemical reviews* **2008**, 108, (11), 4935-78.
10. Kuzyk, A.; Schreiber, R.; Fan, Z.; Pardatscher, G.; Roller, E.-M.; Högele, A.; Simmel, F. C.; Govorov, A. O.; Liedl, T. *Nature* **2012**, 483, (7389), 311-314.
11. Shchipunov, Y. A. *Journal of colloid and interface science* **2003**, 268, (1), 68-76.
12. Roth, K. M.; Zhou, Y.; Yang, W.; Morse, D. E. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (1), 325-30.
13. Gray, J. J. *Current opinion in structural biology* **2004**, 14, (1), 110-115.
14. Dong, Q.; Su, H.; Cao, W.; Zhang, D.; Guo, Q.; Zhang, F. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2007**, 2265-2273.
15. Shchipunov, Y.; Shipunova, N. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2008**, 63, (1), 7-11.
16. Peelle, B. R.; Krauland, E. M.; Wittrup, K. D.; Belcher, A. M. *Langmuir* **2005**, 21, (15), 6929-33.
17. Vallee, A.; Humblot, V.; Pradier, C. M. *Accounts of chemical research* **2010**, 43, (10), 1297-306.
18. Patwardhan, S. V.; Emami, F. S.; Berry, R. J.; Jones, S. E.; Naik, R. R.; Deschaume, O.; Heinz, H.; Perry, C. C. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, 134, (14), 6244-56.
19. Raut, V. P.; Agashe, M. A.; Stuart, S. J.; Latour, R. A. *Langmuir* **2005**, 21, (4), 1629-39.
20. Monti, S.; Carravetta, V.; Battocchio, C.; Iucci, G.; Polzonetti, G. *Langmuir* **2008**, 24, (7), 3205-14.
21. Banerjee, I. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2003**, 100, (25), 14678-14682.

22. Chiu, C.-Y.; Li, Y.; Huang, Y. *Nanoscale* **2010**, 2, (6), 927.
23. Naik, R. R.; Stringer, S. J.; Agarwal, G.; Jones, S. E.; Stone, M. O. *Nature Materials* **2002**, 1, (3), 169-172.
24. Djalali, R.; Chen, Y.-f.; Matsui, H. *Journal of the American Chemical Society* **2002**, 124, (46), 13660-13661.
25. Crookes-Goodson, W. J.; Slocik, J. M.; Naik, R. R. *Chemical Society Reviews* **2008**, 37, (11), 2403.
26. Fang, Y.; Poulsen, N.; Dickerson, M. B.; Cai, Y.; Jones, S. E.; Naik, R. R.; Kroger, N.; Sandhage, K. H. *Journal of Materials Chemistry* **2008**, 18, (32), 3871-3875.
27. Bersani, D.; Antonioli, G.; Lottici, P. P.; Lopez, T. *Journal of Non-Crystalline Solids* **1998**, (232-234), 175-181.
28. Fujishima, A.; Honda, K. *Nature* **1972**, 238, (5358), 37-8.
29. Mital, G. S.; Manoj, T. *Chinese Science Bulletin*. **2011**, 56, (16), 1639–1657.
30. Selloni, A. *Nature Materials* **2008**, 7, (8), 613-614.
31. Diebold, U. *Surface Science Reports* **2003**, 48, (5-8), 53-229.
32. Moellmann, J.; Ehrlich, S.; Tonner, R.; Grimme, S. *Journal of Physics: Condensed Matter* **2012**, 24, (42), 424206.
33. Mann, S. *Accounts of Chemical Research* **2012**, 45, (12), 2131-2141.
34. Bar-Cohen, Y., *Biomimetics : biologically inspired technologies*. CRC/Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2006; p xviii, 527 p., 32 p. of plates.
35. Shchipunov, Y. A.; Kojima, A.; Imae, T. *Journal of colloid and interface science* **2005**, 285, (2), 574-80.
36. Lee, S. W. *Science* **2002**, 296, (5569), 892-895.
37. Cook, G.; Timms, P. L.; Goltner-Spickermann, C. *Angewandte Chemie* **2003**, 42, (5), 557-9.
38. Chen, G.; Li, M.; Li, F.; Sun, S.; Xia, D. *Advanced Materials* **2010**, 22, (11), 1258-1262.
39. Jha, A. K.; Prasad, K.; Kulkarni, A. R. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009**, 71, (2), 226-229.
40. Sarikaya, M. *PNAS* **1999**, 96, (25), 14183–14185.
41. Reches, M.; Gazit, E., Peptide Nanomaterials: Self-assembling Peptides as Building Blocks for Novel Materials. In *Nanomaterials Chemistry*, Wiley-VCH: Germany, 2007; pp 171-183.
42. Whitesides, G. M. *Science* **2002**, 295, (5564), 2418-2421.
43. McMillan, R. A.; Howard, J.; Zaluzec, N. J.; Kagawa, H. K.; Mogul, R.; Li, Y.-F.; Paavola, C. D.; Trent, J. D. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, 127, (9), 2800-2801.
44. Smith, C. A.; Wood, E. J., *Biosynthesis*. 1a ed.; Chapman & Hall: 1992.
45. Ozin, G. A. *Chemical Communications* **2000**, 419-432.

46. Avnir, D.; Coradin, T.; Lev, O.; Livage, J. *Journal of Materials Chemistry* **2006**, 16, (11), 1013-1030.
47. Knecht, M. R.; Wright, D. W. *Chemical Communications* **2003**, (24), 3038.
48. Kröger, N. *Science* **1999**, 286, (5442), 1129-1132.
49. Sewell, S. L.; Wright, D. W. *Chemistry of Materials* **2006**, 18, 3108-3113.
50. Naik, R. R.; Whitlock, P. W.; Rodriguez, F.; Brott, L. L.; Glawe, D. D.; Clarson, S. J.; Stone, M. O. *Chemical Communications (Camb)* **2003**, (2), 238-9.
51. Zhou, Y.; Shimizu, K.; Cha, J. N.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Angewandte Chemie International Edition* **1999**, 38, (6), 779-782.
52. Briggs, B. D.; Knecht, M. R. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2012**, 405-418.
53. Chen, C.-L.; Rosi, N. L. *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, 49, (11), 1924-1942.
54. Álvarez-Vallina, L., *Anticuerpos monoclonales: realidades y perspectivas*. 1a ed.; Ed. Complutense: España, 2004.
55. BioLabs, N. E. Phage Display Peptide Library. <http://www.neb.com/nebecomm/products/productE8120.asp> (07/07),
56. Dickerson, M. B.; Jones, S. E.; Ye Cai, G. A.; Naik, R. R.; Kröger, N.; Sandhage, K. H. *Chemistry of Materials* **2008**, 20, 1578–1584.
57. Seker, U. O. S.; Demir, H. V. *Molecules* **2011**, 16, (12), 1426-1451.
58. Whaley, S. R.; English, D. S.; Hu, E. L.; Barbara, P. F.; Belcher, A. M. *Nature* **2000**, 405, (6787), 665-8.
59. Sumerel, J. L.; Yang, W.; Kisailus, D.; Weaver, J. C.; Choi, J. H.; Morse, D. E. *Chemistry of Materials* **2003**, 15, (25), 4804-4809.
60. Kröger, N.; Dickerson, M. B.; Ahmad, G.; Cai, Y.; Haluska, M. S.; Sandhage, K. H.; Poulsen, N.; Sheppard, V. C. *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, 45, (43), 7239-7243.
61. Zhao, C.-X.; Yu, L.; Middelberg, A. P. J. *RSC Advances* **2012**, 2, (4), 1292.
62. Chen, H.; Su, X.; Neoh, K.-G.; Choe, W.-S. *Analytical Chemistry* **2006**, 78, (14), 4872-4879.
63. Chen, H.; Su, X.; Neoh, K.-G.; Choe, W.-S. *Langmuir* **2009**, 25, (3), 1588-1593.
64. Choi, N.; Tan, L.; Jang, J.-r.; Um, Y. M.; Yoo, P. J.; Choe, W.-S. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2012**, 115, 20-27.
65. Sano, K.-I.; Shiba, K. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125, (47), 14234-14235.
66. Monti, S.; Carravetta, V.; Zhang, W.; Yang, J. *Journal of Physical Chemistry C* **2007**, 111, (21), 7765-7771.
67. Zhang, H.-P.; Lu, X.; Fang, L.-M.; Weng, J.; Huang, N.; Leng, Y. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **2008**, 19, (11), 3437-3441.

68. Mirau, P. A.; Naik, R. R.; Gehring, P. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, 133, (45), 18243-18248.
69. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *Journal of Molecular Graphics & Modeling* **1996**, 14, (1), 33-38.
70. Hess, B.; Kutzner, C.; van der Spoel, D.; Lindahl, E. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2008**, 4, (3), 435-447.
71. Cino, E. A.; Choy, W.-Y.; Karttunen, M. *Journal of Chemical Theory and Computation* **2012**, 8, (8), 2725-2740.
72. van Gunsteren, W. F.; Billeter, S. R.; Eising, A. A.; Hünenberger, P. H.; Krüger, P.; Mark, A. E.; Scott, W. R. P.; Tironi, I. G., *Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide*. VdF: Hochschulverlag AG an der ETH Zürich and BIOMOS b.v.: Groningen, 2012.
73. Mohammadi, M. R.; Cordero-Cabrera, M. C.; Ghorbani, M.; Fray, D. J. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* **2006**, 40, (1), 15-23.
74. Bao, S.-J.; Lei, C.; Xu, M.-W.; Cai, C.-J.; Jia, D.-Z. *Nanotechnology* **2012**, 23, (20), 205601.
75. Al-Oweini, R.; El-Rassy, H. *Journal of Molecular Structure* **2009**, 919, (1-3), 140-145.
76. Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1995**, 30, (2), 95-120.
77. Kharlampieva, E.; Slocik, J. M.; Singamaneni, S.; Poulsen, N.; Kröger, N.; Naik, R. R.; Tsukruk, V. V. *Advanced Functional Materials* **2009**, 19, (14), 2303-2311.
78. Schubert, U. *Journal of Materials Chemistry* **2005**, 15, (35-36), 3701.
79. Cole, K. E.; Valentine, A. M. *Biomacromolecules* **2007**, 8, (5), 1641-1647.

## Apéndice 1

Tabla de aminoácidos, estructura, abreviaciones y propiedades.

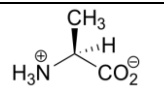
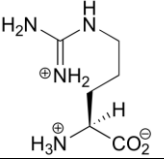
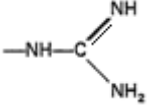
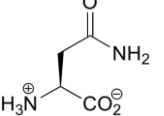
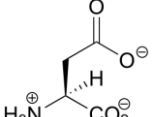
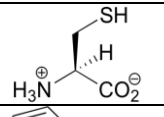
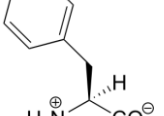
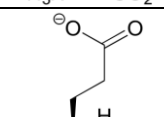
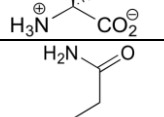
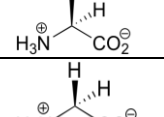
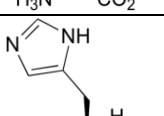
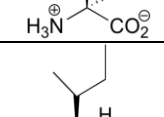
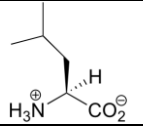
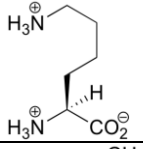
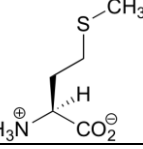
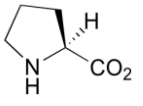

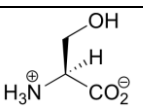
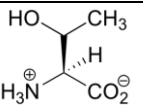
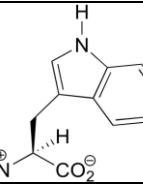
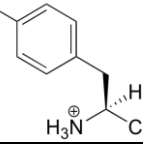
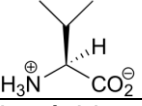
Nombre	Estructura	Abreviación		pI	Acidez/ basicidad <sup>a</sup>	Cadena lateral
		3 letras	1 letra			
Alanina		Ala	A	6.02	N	Alquilo -R
Arginina		Arg	R	10.76	B	Guanidino 
Asparagina		Asn	N	5.41	N	Amida -CONH <sub>2</sub>
Aspartato		Asp	D	2.98	A	Carboxilato -COO <sup>-</sup>
Cisteína		Cys	C	5.02	N <sup>b</sup>	Tiol -SH
Fenilalanina		Phe	F	5.48	N	Aromático -Ar
Glutamato		Glu	E	3.22	A	Carboxilato -COO <sup>-</sup>
Glutamina		Gln	Q	5.70	N	Amida -CONH <sub>2</sub>
Glicina		Gly	G	5.97	N	-H
Histidina		His	H	7.59	N <sup>c</sup>	Aromático -Ar
Isoleucina		Ile	I	6.02	N	Alquilo -R

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

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

<sup>a</sup>Cadenas laterales ácidas (A), básicas (B) o neutras (N); <sup>b</sup>La cisteína es ligeramente ácida debido al grupo tiol de la cadena lateral. <sup>c</sup>La histidina es ligeramente básica debido al imidazol de la cadena lateral. Adaptado de Bailey P. D. *An introduction to peptide chemistry*. Wiley, 1992.

## Apéndice 2 Método sol-gel

El método sol-gel está basado en reacciones de hidrólisis-condensación que originan oligómeros y polímeros en los pasos finales del proceso. Éste incluye cuatro pasos: hidrólisis, policondensación, secado y descomposición térmica. El nombre de este tipo de síntesis se refiere a la transición donde la solución inicial (sol) se transforma a un gel formado por las redes de óxidos metálicos.

El primer paso del método sol-gel, la hidrólisis, consiste en un ataque nucleofílico de moléculas de agua a un alcóxido metálico ( $M(OR)_n$ ). Los alcóxidos de titanio son extremadamente reactivos con agua lo que provoca la formación de hidróxidos o hidro-óxidos:

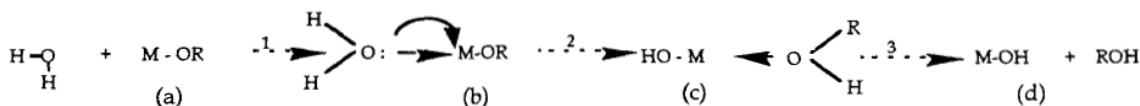


Donde R = grupo alquilo

Por un lado, el bajo número de coordinación de los alcóxidos de titanio y la electronegatividad de los grupos alcóxido (OR) provoca que el átomo metálico sea altamente propenso a ataque nucleofílico.

El número de protones (p) removidos espontáneamente en la hidrólisis depende directamente de la carga formal z, el número de coordinación N y la electronegatividad  $\chi_M^0$  del metal. Estos últimos dos parámetros son funciones directas del tamaño del catión  $M^{z+}$ , el cual debe tomarse en cuenta.

Se ha propuesto que el mecanismo de la hidrólisis se realiza en tres pasos<sup>(1)</sup>:

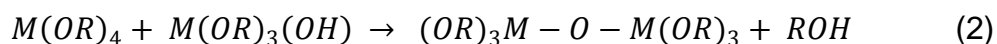


El primer paso (a) es una adición nucleofílica de una molécula de agua al átomo metálico cargado M. Esto conduce al estado de transición (b) donde el número de coordinación de M se incrementa en una unidad. El segundo paso implica una transferencia de protón entre (b) dando al intermediario (c). Un protón de la molécula de agua se transfiere al oxígeno negativamente cargado del grupo adyacente OR. El tercer paso es la partida del mejor grupo saliente, el cual debe ser la especie más positivamente cargada en el estado de transición (c).

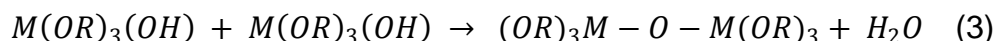


El segundo paso del sol-gel es la condensación. La condensación es también un proceso complejo y puede ocurrir tan pronto como los grupos hidroxilo son generados. Dependiendo de las condiciones experimentales, pueden ocurrir tres mecanismos competitivos: alcoxolación, oxolación y olación.<sup>(1)</sup>

- I. La alcoxolación es una reacción donde un puente oxo M-O-M es formado a través de la eliminación de una molécula de alcohol.



- II. La oxolación sigue el mismo mecanismo de la alcoxolación, pero el grupo R del grupo saliente es un protón, así que se elimina una molécula de agua.



- III. La olación puede ocurrir cuando no se satisface la coordinación completa del átomo metálico en el alcóxido ( $N-z \neq 0$ ). En este caso un puente hidroxilo M-(OH)-M se forma a través de la eliminación de una molécula de solvente (ROH o H<sub>2</sub>O) dependiendo de la concentración de agua en el medio.



S= ROH, H<sub>2</sub>O

Para poder homogenizar la mezcla entre el alcóxido metálico y el agua, y a su vez controlar la velocidad de reacción, es común que se emplee el alcohol del cual proviene el grupo alcóxido. Además, existen tres vías utilizadas para evitar la precipitación de los polímeros formados en la condensación<sup>(1)</sup>:

- La forma más antigua de estas vías es utilizar iones H<sup>+</sup>. Los protones favorecen la reacción de hidrólisis del hecho de que los grupos alcoxi protonados son mejores grupos salientes. Por el contrario, los protones inhiben las reacciones de condensación, pues protonan a los átomos de oxígeno de los grupos Ti-OH y disminuyendo así su poder nucleofílico.
- Otra manera de evitar la precipitación es sustituir algunos ligandos -OR por ligandos polidentados. Una gran variedad de complejantes han sido utilizadas. Por ejemplo, ácidos orgánicos como los carboxílicos, los α- o β-hidroxiácidos, las β-dicetonas, etc. La función de estos complejantes es doble: primero, estos ligandos son mucho menos hidrolizables que los

grupos alcoxi lo que permite reducir la reactividad real del precursor; por otra parte estos ligandos quelatos incrementan su número de coordinación. Por lo tanto estos ligandos juegan un papel doble, cinético y termodinámico.

- El último método utilizado para evitar la formación de precipitados es la gelación en micelas inversas. En este caso la hidrólisis de los alcóxidos está limitada por la movilidad reducida de moléculas de agua encerradas por el tensoactivo.

Una vez formado el óxido metálico, se procede al secado de la muestra (si es un gel) y por último la calcinación, pues es necesaria para descomponer el precursor orgánico y/o formar estructuras cristalinas. El tamaño de las partículas depende de la composición de la solución, pH y temperatura de síntesis y calcinación. Controlando estos factores, puede ser posible controlar el tamaño de las partículas. En resumen, las principales ventajas que tiene el método sol-gel son: (i) preparación a temperatura ambiente; (ii) producto homogéneo; (iii) baja temperatura de sinterizado; (iv) facilidad de trabajar con materiales multicomponentes y (v) buen control sobre el tamaño y forma de la partícula.<sup>(2)</sup>

#### **Referencias:**

- (1). Livage, J.; Henry, M.; Sanchez, C. *Progress in Solid State Chemistry* **1988**, 18, (4), 259-341.
- (2). Gupta, S. M.; Tripathi, M. *Central European Journal of Chemistry* **2012**, 10, (2), 279-294.