



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

**MINERALIZACION DE SALES DE CALCIO SOBRE POLIMEROS MODIFICADOS E
HIBRIDOS ORGANO-INORGANICOS**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA
MENCION, CIENCIAS DE LOS MATERIALES**

MARIO RODRIGO DIAZ DOSQUE

PROFESOR GUIA:
MEHRDAD YAZDANI-PEDRAM ZOBEIRI

MIEMBROS DE LA COMISION:
JOSE LUIS ARIAS BAUTISTA
MARIO RODRIGUEZ BAEZA
RAUL QUIJADA ABARCA
FRANCISCO MARTINEZ DIAZ

SANTIAGO DE CHILE
NOVIEMBRE 2009

Agradecimientos

A mis padres por estar siempre conmigo y apoyarme en este desafío.

A mi amigo el Profesor Héctor Urrutia M. porque sin su anónima ayuda y apoyo desinteresado, este trabajo no hubiera sido posible y a Angélica Barrera del Depto. de Cs. Físicas y Químicas. Al Decano de la Facultad de Odontología el Profesor Julio Ramírez C. por apoyarme durante todo el desarrollo de esta Tesis.

A mi director de Tesis el Profesor Mehrdad Yazdani-Pedram por su ayuda y apoyo día tras día en el desarrollo de este trabajo, junto al Profesor Jaime Retuert (Q.E.P.D.) pues aunque ausente ahora, siempre se encontrara entre nosotros.

A los miembros de la comisión de examen de grado los Profesores Francisco Martínez, Mario Rodríguez, José Luis Arias y Raúl Quijada por sus importantes aportes y correcciones en el escrito y disposición.

Al los miembros del laboratorio del Profesor Arias y especialmente al Dr. Andrónico Neira-Carrillo por las facilidades entregadas para el uso del SEM, ya que sin su disposición y contribución, este trabajo no hubiera sido posible. A la Profesora María Teresa Garland y Andrés Ibáñez por su ayuda en el análisis de DRX.

A Verónica Arias, Paulina Quevedo, el Profesor Francisco Casas y especialmente a Paula Zapata del laboratorio de Síntesis de Materiales. A Johanna Cáceres y Orieta Vergara por su ayuda en el desarrollo experimental de este trabajo. Al laboratorio de polímeros de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas dirigido por el Prof. Raúl Quijada por considerarme un miembro más de su grupo

Quiero agradecer a mis amigos, Pilar, Miguel, Margarita, Rocío, Almudena, Andrés y Tomas del laboratorio de Nuevas Arquitecturas en Química de Materiales del ICMM-CSIC en Madrid, dirigido por el también mi amigo el Profesor Eduardo Ruiz-Hitzky, por todas las facilidades y ayuda para realizar parte importante de mi tesis y hacerme sentir que ese también es mi laboratorio.

A mis amigos los Doctores Humberto Palza y Julio Bruna por sus catedráticos aportes y contribuir a que esta etapa de mi vida allá sido una de las mejores.

A CONICYT por el financiamiento a través de los proyectos FONDAP 11980002 FONDECYT 1050651, 1040927 Proyecto MECESUD UCH0205 y Proyecto CSIC 04/07-08

Publicaciones generadas por esta tesis

“Selective Crystallization of Calcium Salts by Poly(Acrylate)-Grafted Chitosan” Andrónico Neira-Carrillo, Mehrdad Yazdani-Pedram , Jaime Retuert, Mario Díaz-Dosque, Sebastien Gallois and José L. Arias. Journal of Colloid and Interface Science 286 (2005) 134–141

“Use of Biopolymers as Oriented Supports for the Stabilization of Different Polymorphs of Biomineralized Calcium Carbonate with Complex Shape” Mario Díaz-Dosque, Pilar Aranda, Margarita Darder, Jaime Retuert, Mehrdad Yazdani-Pedram, José Luis Arias, Eduardo Ruiz-Hitzky. Journal of Crystal Growth, 310,(2008) 5331-5340

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	<i>vii</i>
INDICE DE TABLAS	<i>xx</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>xxii</i>
RESUMEN	<i>xxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxvi</i>

Capítulo I	1
Introducción	
1.1 Biomineralización	1
1.2 Revisión Bibliográfica	3
1.2.1 Proceso de cristalización	3
1.2.2 Nucleación	5
1.2.3 Crecimiento Cristalino	13
1.2.4 Polimorfos	15
1.2.5. Efecto de las impurezas	17
1.3 Carbonato de Calcio	17
1.3.1 Polimorfos de carbonato de calcio	17
1.3.2 Estados hidratados de carbonato de calcio	21
1.3.3 Agentes externos que afectan la cristalización de CaCO₃	22
1.4 Biopolímeros	26
1.4.1 Quitosano	26
1.5 Polímeros inorgánicos	28
1.6 Hipótesis de trabajo	30

1.7	Objetivos	31
1.7.1	Objetivo general:	31
1.7.2	Objetivos específicos:	31
 Capítulo II		
Parte Experimental		32
2.1	Materiales	32
2.2	Purificación de quitosano	33
2.2.1	Solución de quitosano	33
2.3	Soluciones de κ-carragenato	33
2.4	Soluciones de alginato	33
2.5	Síntesis de sulfato de quitosano (QuiS)	34
2.6	Modificación de quitosano mediante reacciones de injerto de monómeros vinílicos	34
2.6.1	Purificación de quitosano injertado	35
2.6.2	Parámetros del injerto	36
2.7	Preparación de sol precursor de sílice	36
2.8	Preparación de híbridos organo-inorgánicos	37
2.9	Métodos de cristalización	37
2.9.1	Método de cristalización I	38
2.9.2	Método de cristalización II	39
2.9.3	Método de cristalización III	39
2.10	Equipos	40

2.10.1 Espectrofotómetro FTIR	40
2.10.2 Microscopio electrónico de barrido (SEM)	40
2.10.3 Difractómetro de rayos X (DRX)	40

Capítulo III

Resultados y Discusión	41
3.1 Estudio de cristalización de CaCO₃ usando diferentes biopolímeros como agente mineralizador	41
3.1.1 Estudio de cristalización de CaCO ₃ usando gelatina	41
3.1.2 Estudio de cristalización de CaCO ₃ usando κ-carragenato	48
3.1.3 Estudio de cristalización de CaCO ₃ usando alginato	54
3.1.4 Estudio de cristalización de CaCO ₃ usando quitosano	61
3.2 Estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador diferentes biopolímeros y mezclas de biopolímeros liofilizados	69
3.2.1 Estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador biopolímeros liofilizados	69
3.2.2 Estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador mezclas liofilizadas de quitosano y alginato	77
3.3 Cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador sulfato de quitosano	88
3.3.1 Síntesis de sulfato de quitosano	88
3.3.2 Estudio de cristalización de CaCO ₃ usando R1 y/o QuiS como agente mineralizador	89
3.4 Modificación de quitosano mediante injerto y su uso como agente mineralizador para el estudio de cristalización de carbonato de calcio	91

3.4.1	Injerto de acrilamida o ácido acrílico en quitosano	91
3.4.2	Estudio de cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador quitosanos modificados por injerto	95
3.4.3	Cristalización de carbonato de calcio sobre quitosano injertado con poli (ácido acrílico) (Qui-g-PAA)	96
3.4.4	Cristalización de carbonato de calcio sobre quitosano injertado con poliacrilamida (Qui-g-PAAM)	98
3.5	Estudio de cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador mezclas de quitosano con PAAM	103
3.6	Estudio de cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador películas híbridas órgano - inorgánicas	109
3.6.1	Cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador híbridos binarios órgano-inorgánicos	111
3.6.2	Cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador híbridos terciario órgano-inorgánicos	117
Capítulo IV		
4.	Conclusiones	123
Capítulo V		
5.	Bibliografía	124

INDICE FIGURAS

Figura 1.1 a) Micrografía de nácar b) esquema de la estructura de nácar	2
Figura 1.2.1. Relación de Ostwald-Freunlinch entre sobresaturación y el logaritmo del radio de calcita.	5
Figura 1.2.2. Procesos de la nucleación. (Mullin, J. W. en “Crystallization”, 1993, Oxford: Butterworth Heinemann press, UK).	6
Figura 1.2.3. Proceso bimolecular para la formación de un <i>cluster</i> crítico.	7
Figura 1.2.4. Diagrama de energía libre en función del radio de núcleo.	8
Figura 1.2.5. Relación entre la sobresaturación S y la velocidad de nucleación J .	10
Figura 1.2.6. Sobresaturación en función de la Concentración	10
Figura 1.2.7 Esquema de las tensiones superficiales y las fronteras que existirían en un sistema donde coexisten tres fases: superficie sólida (s), líquido (l) y deposito cristalino (c)	12
Figura 1.2.8. Relación de las energías libres de nucleación y el ángulo de contacto.	13
Figura 1.2.9. Mecanismo I de Absorción de Capas. Los iones A^{z+} y B^{z-} se adsorben individualmente en la capa de adsorción. En seguida, se obtiene el componente insoluble y posterior integración a la red cristalina.	14
Figura 1.2.10. Mecanismo II de Absorción de Capas. Ocurre la adsorción individual de cada uno de los iones y de esta manera su integración directa en la red cristalina en la forma iónica.	14

Figura 1.2.11. Mecanismo IIIa de Absorción de Capas. Los iones disueltos forman un componente en solución y este componente en solución se incorpora a la red cristalina.	14
Figura 1.2.12. Mecanismo IIIb de Absorción de Capas. Los iones disueltos forman un componente en solución y este componente se incorpora en las capas fronteras y posteriormente a la red cristalina.	15
Figura 1.2.13. Posible esquema de los procesos de formación de una fase u otra que puede ser controlado termodinámicamente y/o cinéticamente.	16
Figura 1.2.14. Efecto de la sobresaturación sobre la transformación de fase o la permanencia de una fase intermedia o transición hacia un estado termodinámicamente más favorable.	16
Figura 1.3.1. Estructura cristalina de (a) aragonita y (b) calcita, donde se observa el corrimiento de los iones carbonato en la dirección c. Esta diferencia es lo que implica las distintas propiedades que poseen estas dos fases.	19
Figura 1.3.2. Polimorfos de carbonato de calcio, donde se observa que el plano de CO_3^{2-} de calcita y aragonita están perpendiculares al eje c contrario a lo observado en vaterita donde ese plano es paralelo a al eje c. a) calcita, b) aragonita y c) vaterita.	21
Figura 1.3.3. Reconocimiento molecular en la interface orgánico-inorgánico en la biomineralización.	22
Figura 1.4.1 Estructura del quitosano	26
Figura 1.4.2 Estructura de biopolímeros extraídos de algas a) alginato b) κ -carragenato	28
Figura 1.5.3 Representación esquemática del proceso de sol-gel.	29
Figura 2.5.1. Reacción de sulfatación de quitosano.	34

Figura 2.5.2. Representación esquemática de la reacción de modificación de quitosano por injerto: a) quitosano injertado con poliacrilamida (Qui-g-PAAM); b) quitosano injertado con poli (ácido acrílico) (Qui-g-PAA).	35
Figura 2.8.1. Esquema de preparación de películas por el método de <i>gel-casting</i> .	37
Figura 2.9.1 Reacción de descomposición de $(NH_4)HCO_3$	38
Figura 2.9.2. Esquema de la cámara de cristalización de carbonato de calcio usado para el Método de cristalización I.	38
Figura 2.9.3. Esquema de la cámara de cristalización de carbonato de calcio usado para el Método de cristalización II.	39
Figura 2.9.4. Esquema equipo de <i>spin-coating</i> utilizado para el Método de cristalización III.	39
Figura 3.1.1. a) Contenido relativo de aminoácidos en la gelatina y b) un segmento de la estructura de la gelatina.	42
Figura 3.1.2. Patrón de difracción de rayos X para los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando G1% como agente mineralizador. C= calcita y V= vaterita.	43
Figura 3.1.3. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando G1% como agente mineralizador: a) 1 hora; b) 4 horas; c) 6 horas y d) 8 horas.	43
Figura 3.1.4. Patrón de difracción de rayo X para los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y al usar gelatina al 4% (G4%) como agente mineralizador. C=calcita y V= vaterita	44

- Figura 3.1.5.** Micrografías SEM de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando gelatina al 4% como agente mineralizador: a) 1 hora y b) 6 horas. **44**
- Figura 3.1.6.** Micrografías SEM de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización y usando gelatina al 4% como agente mineralizador: c) escala 50 μm y d) escala 5 μm . **45**
- Figura 3.1.7.** Micrografía de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando como agente mineralizador G4% a 8 horas cristalización: a) ordenamiento de CaCO_3 a través de la película y b) la distancia entre las aglomeraciones. **46**
- Figura 3.1.8.** Estructura de κ -carragenato. **48**
- Figura 3.1.9.** Patrones de difracción de rayos X de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando κ -carragenato como agente mineralizador y para diferentes tiempos de cristalización: a) Carr1% y b) Carr4%. C= calcita y V= vaterita. **49**
- Figura 3.1.10.** Patrón de difracción de rayos X de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando Carr1% como agente mineralizador a 24 horas de cristalización y comparación con patrones estándar de Calcita y Vaterita **49**
- Figura 3.1.11.** Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos usando Carr1% como agente mineralizador para diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) ampliación a 6 horas; c) 24 horas y d) ampliación a 24 horas **50**
- Figura 3.1.12.** Micrografía de cristales de carbonato de calcio usando la solución de κ -carragenato al 4% como agente mineralizador y para diferentes tiempos de cristalización: a) y b) 4 horas; c) y d) 6 horas; e) y f) 8 horas. **52**

Figura 3.1.13. Segmento de la estructura de Alginato en la que se observa los residuos de L- Acido Gulunórico y D-Acido Manurónico.	54
Figura 3.1.14. Esquema representativo de la estructura tipo “caja de huevo” de alginato en presencia de iones de Ca^{+2} .	55
Figura 3.1.15. Conformación de tipo hélice que adquiere el alginato en presencia de iones de Ca^{+2} .	55
Figura 3.1.16. Patrones de difracción de rayos X de cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando soluciones de alginato como agente mineralizador: a) Alg1% y b) Alg4%.	56
Figura 3.1.17. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos usando Alg1% como agente mineralizador: a) 4 horas de cristalización y b) 6 horas de cristalización.	57
Figura 3.1.18. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando Alg4% como agente mineralizador: a) b) y c) 1 hora; d) 6 horas; e) y f) 24 horas de cristalización.	58
Figura 3.1.19. Patrones de difracción de rayos X para los cristales de carbonato de calcio obtenidos al usar soluciones de quitosano como agente mineralizador: a) Qui1% a 4 horas de cristalización; b) Qui1% a 8 horas de cristalización; c) Qui4% a 4 horas de cristalización y d) Qui1% a 8 horas de cristalización. C = calcita y V= vaterita.	61
Figura 3.1.20. La celda unitaria de calcita en la que se distinguen los planos {104}, {012} y {024}. Carbono (●); calcio (●) y oxigeno (●).	62
Figura 3.1.21. Micrografía de los cristales de $CaCO_3$ obtenidos a 4 horas de cristalización y usando Qui1% como agente mineralizador: a) semiesferas b) detalles donde se distinguen cristales de calcitas.	63

- Figura 3.1.22.** Micrografía de cristales de CaCO_3 obtenidos a 8 horas de cristalización y al usar Qui1% como agente mineralizador: a) Cristales de CaCO_3 con diferentes formas; b) y c) detalles de una aglomeración de CaCO_3 con forma de “Crystal Leafs” y d) detalle de las aglomeraciones donde se distinguen un cristal calcita. **64**
- Figura 3.1.23.** Aglomeraciones de cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización y usando soluciones de quitosano como agente mineralizador: a) y b) Qui1% y c) y d) Qui4%. **65**
- Figura 3.1.24.** Posible gradiente de sobresaturación que se observaría en las aglomeraciones de carbonato de calcio obtenidas al usar Alg4% como agente mineralizador. Zonas más oscuras representa mayor sobresaturación. (CCA=carbonato de calcio amorfo). **67**
- Figura 3.2.1.** Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y utilizando como agente mineralizador alginatos liofilizados: a) Alg1% a 24 horas de cristalización; b) Alg1% a 48 horas de cristalización; c) Alg4% a 24 horas de cristalización y d) Alg4% a 48 horas de cristalización. **70**
- Figura 3.2.2.** Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido utilizando como agente mineralizador alginato en dos concentraciones y dos tiempos de cristalizaciones distintos: a) Alg1% a 24 horas de cristalización; b) Alg1% a 48 horas de cristalización; c) Alg 4% a 24 horas de cristalización y d) Alg1% a 48 horas de cristalización. **71**
- Figura 3.2.3.** Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y utilizando como agente mineralizador κ -Carragenato liofilizado: a) Carr1% a 24 horas de cristalización; b) Carr1% a 48 horas de cristalización; c) Carr4% a 24 horas de cristalización y d) Carr 1% a 48 horas de cristalización. **72**

- Figura 3.2.4.** Patrón de difracción de rayos X para cristales de carbonato de calcio obtenidos al utilizar soluciones de κ -Carragenato como agente mineralizador y para diferentes tiempos de cristalización: a) Carr1%, 24 horas; b) Carr1%, 48 horas; c) Carr4%, 24 horas y d) Carr1%, 48 horas. **73**
- Figura 3.2.5.** Micrografía SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos al utilizar Quitosano liofilizado como agente mineralizador y a diferentes tiempos de cristalización: a) Qui1%, 24 horas; b) Qui1%, 48 horas; c) Qui4%, 24 horas y d) Qui1%, 48 horas. **74**
- Figura 3.2.6.** Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido utilizando como agente mineralizador quitosano liofilizado proveniente de dos soluciones de diferentes concentraciones y a diferente tiempos de cristalización: Qui1%, 24 horas; b) Qui1%, 48 horas; c) Qui4%, 24 horas y d) Qui4%, 24 horas. **74**
- Figura 3.2.7.** Micrografía SEM de estructuras de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (1/1) para diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas. **78**
- Figura 3.2.8.** Espectro FTIR de la mezcla Qui/Alg (1/1) usados como agente mineralizador y después de 8 y 24 horas de cristalización. **79**
- Figura 3.2.9.** Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador mezcla Qui/Alg (1/2) para diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas. **80**
- Figura 3.2.10.** Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (1/2) usado como agente mineralizador y después de haber transcurrido 6, 8 y 24 horas de cristalización y una ampliación del espectro a 24 horas entre 750 cm^{-1} y 650 cm^{-1} . **80**
- Figura 3.2.11.** Micrografía de estructura de CaCO_3 obtenidas en la mezcla Qui/Alg 1/3 a distintos tiempos de exposición. a) 6 horas b) 8 horas y c) 24 horas. **si**

- Figura 3.2.12.** Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (1/3) usado como agente mineralizador y después de haber transcurrido 6, 8 y 24 horas de cristalización. **82**
- Figura 3.2.13.** Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (2/1) a diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas. **83**
- Figura 3.2.14.** Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (2/1) usado como agente mineralizador y después de haber transcurrido 6, 8 y 24 horas de cristalización. **83**
- Figura 3.2.15.** Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (3/1) a diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas. **84**
- Figura 3.2.16.** Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (3/1) usado como agente mineralizador y después de haber transcurrido 6, 8 y 24 horas de cristalización y una ampliación del espectro a 6 horas entre 500 cm^{-1} y 800 cm^{-1} . **85**
- Figura 3.3.1** Espectro FTIR de Qui, sulfato de quitosano (QuiS) y otro producto obtenido (R1) en la síntesis de sulfato de quitosano. **88**
- Figura 3.3.2** Cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización y usando R1 o QuiS como agente mineralizador: a) Blanco; b) R1 en presencia de agua; c) R1 y d) QuiS. **89**
- Figura 3.3.3.** Diferencia de la longitud diagonal de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización en presencia de R1 y QuiS como agente mineralizador: a) Blanco b); R1 en presencia de agua: c) R1 y d) QuiS. **90**

- Figura 3.4.1.** FTIR de Qui, Qui-g-PAA y Qui-g-PAAM. 95
- Figura 3.4.2.** Micrografías SEM de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando: a) quitosano de alto peso molecular y 24 horas de cristalización; b) quitosano de alto peso molecular y 48 horas de cristalización y c) quitosano de bajo peso molecular y 24 horas de cristalización. 96
- Figura 3.4.3.** Micrografías SEM de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando como agente mineralizador: a) QuiAPM-g-PAA usando 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; b) QuiAPM-g-PAA usando 2×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; c) QuiBPM-g-PAA usando 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización ; d) QuiBPM-g-PAA usando 2×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización. 97
- Figura 3.4.4.** Patrones de DRX para: a) QuiBPM y b) Aglomerados de CaCO_3 obtenidas utilizando QuiBPM-g-PAA como agente mineralizador. 97
- Figura 3.4.5** Micrografías SEM de aglomerado de sales de calcio obtenidos usando quitosano injertado con poliacrilamida como agente mineralizador: a) QuiBPM-g-PAAM con 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; b) y c) QuiBPM-g-PAAM con 2×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; d) QuiAPM-g-PAAM con 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización. 98
- Figura 3.4.6.** Patrón de DRX de: a) cristales obtenidos usando Qui-g-PAAM como agente mineralizador; b) patrón de difracción de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. 99
- Figura 3.4.7** Micrografías SEM de aglomerado de sales de calcio obtenidos usando quitosano injertado con poliacrilamida como agente mineralizador: a) y b) QuiAPM-g-PAAM con 2×10^{-2} M de iniciador y 48 horas de cristalización. 101
- Figura 3.5.1.** Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 en función del tiempo y la composición del híbrido ternario Qui/AcCa/PAAM . 104

- Figura 3.5.2.** Patrones de DRX de cristales de carbonato de calcio obtenido al usar mezclas de Qui/PAAM/AcCa conteniendo diferentes cantidades de PAAM y para diferentes tiempos de cristalización. **105**
- Figura 3.5.3.** Patrones de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido al usar como agente mineralizador mezclas de Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/PAAM) conteniendo diferentes cantidades de PAAM y comparación con el patrón de DRX de Calcita: a) 0,1g de PAAM y 24 horas de cristalización; b) 0,2 g de PAAM y 48 horas de cristalización; c) 0,1g de PAAM y 48 horas de cristalización. **106**
- Figura 3.5.4.** Micrografías SEM de estructuras tipo nácar formado por calcita obtenidos a 48 horas de cristalización: a) y b) obtenidas usando Qui/AcCa /PAAM (0,5/0,2/0,1); c) *Ostrea edulis* Linnaeus. **107**
- Figura 3.5.5.** Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos a 48 horas de cristalización y utilizando como agente mineralizador: a) Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,2) y b) Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,3). **107**
- Figura 3.5.6.** Distancias entre los átomos de calcio en la celda unitaria de calcita para los planos: a) {104} y b) {018}. **108**
- Figura 3.6.1.** Posible formación de puente de hidrógeno entre SiO_2 y Qui a) amido residual, b) amino protonado. **110**
- Figura 3.6.2.** Patrón de difracción de rayos X para carbonato de calcio obtenido al utilizar como agente mineralizador Qui/TEOS/AcCa y por periodos de 2, 6, 24 y 48 horas de cristalización. C =calcita y V= Vaterita (72-1616). **113**
- Figura 3.6.3.** Micrografía SEM de carbonato de calcio obtenido al usar Qui/TEOS/AcCa como agente mineralizador : a₁) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización 670X; a₂) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización 1700X; b₁) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización 670X y b₂) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización 1700X. **113**

- Figura 3.6.4.** Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido utilizando como agente mineralizador Qui/PAPS/AcCa: a) Tiempo de cristalización 2, 6, 24 y 48 horas. C = calcita y A= Aragonita (72-1616); b) 24 horas de cristalización y comparación con el patrón de aragonita. **114**
- Figura 3.6.5.** Micrografía SEM de cristales de carbonato de calcio obtenidos al usar Qui/PAPS/AcCa como agente mineralizador: a₁) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, 670X; a₂) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, 1700X; b₁) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización, 670X; b₂) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización, 1700X. C= calcita y A= aragonita. **115**
- Figura 3.6.6.** Esquema del posible mecanismo de formación de aglomeraciones de calcitas. **116**
- Figura 3.6.7.** a) Esquema de la red inorgánica utilizando poliaminopropilsiloxano (PAPS) como precursor en el proceso sol-gel y b) posible interacción entre la red inorgánica y la fase orgánica. **116**
- Figura 3.6.8.** Micrografías SEM de CaCO₃ obtenidos al usar como agente mineralizador Qui/TEOS/Quis/AcCa: a₁) y a₂) a 24 horas de cristalización; b₁) a 48 horas de cristalización. **117**
- Figura 3.6.9.** Patrón de difracción de rayos X para carbonato de calcio obtenido al usar como agente mineralizador Qui/TEOS/Quis/AcCa para 24 y 48 horas de cristalización y la comparación con el patrón de calcita . **118**
- Figura 3.6.10.** Micrografías SEM de calcita obtenida al usar el híbrido Qui/TEOS/Quis/AcCa como agente mineralizador y para 24 horas de cristalización. a1) contenido de Quis en el híbrido=0,1 mol y b1) contenido de Quis en el híbrido =0,2. **119**

- Figura 3.6.11.** Micrografías SEM de aragonitas obtenidas al usar híbrido Qui/PAPS/QuiS/AcCa como agente mineralizador y después de 24 horas de cristalización. a) cristales tipo rosetas y b) cristales aciculares. **119**
- Figura 3.6.12.** Patrón de difracción de rayos x para carbonato de calcio obtenido al usar Qui/PAPS/QuiS/AcCa como agente mineralizador para 24 horas de cristalización y la comparación con el patrón de aragonita. **120**
- Figura 3.6.13.** Patrón de difracción de rayos x de carbonato de calcio obtenido al usar Qui/PAPS/ QuiS/AcCa como agente mineralizador para 24 y 48 horas de cristalización. A = aragonita y C =calcita. **121**

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de carbonato de calcio en los seres vivos.	18
Tabla 2. Reactivos empleados	32
Tabla 3. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de la Gelatina como agente mineralizador y utilizando el método de <i>spin-coating</i> . (C=calcita, V=vaterita).	47
Tabla 4. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de κ -carragenato como agente mineralizador y utilizando el método de <i>spin-coating</i> . (C=calcita, V=vaterita).	53
Tabla 5. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de alginato como agente mineralizador y utilizando el método de <i>spin-coating</i> . (C=calcita, V=vaterita).	60
Tabla 6. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de quitosano como agente mineralizador y utilizando el método de <i>spin-coating</i> . (C=calcita, V=vaterita)	66
Tabla 7. Resumen de las morfologías y polimorfos obtenidos utilizando como agente mineralizador biopolímeros liofilizados.	76
Tabla 8. Resumen de las morfologías y polimorfos obtenidos utilizando como agente mineralizador mezclas de quitosano y alginato liofilizados	86
Tabla 9. Parámetros de injerto obtenidos para Quitosanos injertados con poliacrilamida y usando dos concentraciones diferentes de iniciador.	93
Tabla 10. Parámetros obtenidos para quitosanos injertados con poli (ácido acrílico) y usando dos concentraciones diferentes de iniciador.	94
Tabla 11. Resultados del análisis elemental realizado a Qui-g-PAAM a distintas concentraciones de iniciador.	100

Tabla 12. Sales de calcio obtenidos al usar diferentes quitosanos injertados como agente mineralizador.	102
Tabla 13. Composición y propiedades de híbridos órgano-inorgánico ternarios y cuaternarios.	111
Tabla 14. Resumen de las morfologías y polimorfos obtenidos utilizando como agente mineralizador los híbridos órgano-inorgánico	122

LISTA DE ABREVIATURAS

- APS (3-aminopropil) trietilensilano
- BIA N,N-metilen-bis- acrilamida
- DRX Difractómetro de rayos X
- FTIR Espectrofotometria infrarojo
- KPS Persulfato de potasio
- PAAM Poli acrilamida
- PAPS Poliaminopropilsiloxano
- PVC poli (cloruro de vinilo)
- QuiAPM Qui de alto peso molecular
- QuiBPM Qui de bajo peso molecular
- Qui-g-PAA Quitosano injertado con poli (ácido acrílico)
- Qui-g-PAAM quitosano injertado con poliacrilamida
- QuiS sulfato de quitosano
- SEM Microscopio electrónico de barrido
- TEOS tetraetilortosilicato

Resumen

El desarrollo de nuevos materiales es de vital importancia para el avance tecnológico, en las áreas tales como semiconductores, óptica, electrónica y biomédicas. Una ruta para la síntesis de estos nuevos materiales es lo que se denomina como biomimética. Los seres vivos en condiciones ambientales de presión y temperatura producen materiales inorgánicos con características muy específicas. Este proceso se conoce como la biomineralización donde la presencia y participación de algunos biopolímeros determina la morfología, orientación cristalina y la fase cristalina de las estructuras utilizadas para sus distintos usos por estos seres vivos. El estudio y su posterior desarrollo de materiales bioinspirados tendrán un fuerte impacto a nivel tecnológico.

Se ha estudiado en esta tesis el efecto de diferentes grupos funcionales contenidos en algunos biopolímeros, usados como agentes mineralizadores, sobre la cristalización *in Vitro* de carbonato de calcio. Todos los aglomerados de carbonato de calcio obtenidos fueron caracterizados por microscopia electrónica de barrido y difracción de rayos X. No fue posible realizar la caracterización de los aglomerados obtenidos al usar mezcla de Quitosano/Alginato (Qui/Alg) por difracción de rayos X; en su remplazo se utilizó espectrofotometría infrarroja.

Se utilizaron quitosano, (Qui), gelatina (Gel), alginato, (Alg) y κ -carragenato (Carr) en solución y/o liofilizado además de mezclas liofilizadas de Qui/Alg con diferentes composiciones como agente mineralizador. Se obtuvieron aglomerados de carbonato de calcio en las que coexisten los polimorfos calcita y vaterita al usar como agente mineralizador alginato, quitosano y/o mezclas de Qui/Alg liofilizadas. Al usar las mezclas Qui/Alg liofilizadas se obtuvieron los polimorfos aragonita y carbonato de calcio hexahidratado. También se obtuvieron aglomerados de calcita con orientaciones cristalográficas diferentes a las normalmente observadas, además calcitas y vaterita con morfologías no informadas en la literatura anteriormente.

Por otra parte se realizó la modificación química del Qui con el fin de aumentar e incorporar nuevos grupos funcionales a este biopolímero y estudiar su efecto en la cristalización de carbonato de calcio. Se sintetizaron sulfato de quitosano y quitosano injertado con poli ácido acrílico (PAA) o poliácridamida (PAAM) y se estudiaron sus efectos sobre la cristalización de carbonato de calcio. Además se prepararon mezclas de PAAM y Qui con el fin de comparar su comportamiento en la cristalización de carbonato de calcio con los quitosanos modificados. Los resultados obtenidos muestran que al realizar la cristalización de carbonato de calcio en presencia de sulfato de quitosano se obtiene cristales de calcitas modificados debido al mayor crecimiento de un plano específico. El uso de Qui injertado con PAA como agente mineralizador genera aglomerados de carbonato de calcio con una morfología toroidal la que no ha sido reportada anteriormente. Cuando se utilizó como agente mineralizador el Qui injertado con PAAM se obtuvo cristales de sulfato de calcio. Esto se debe al uso de persulfato de potasio como iniciador en la reacción de injerto. Los iones sulfatos generados por la descomposición del persulfato de potasio se asocian selectivamente con los grupos amidos de la PAAM y como consecuencia se produce la cristalización de sulfato de calcio.

Además, se utilizaron películas híbridas órgano-inorgánicas como agente mineralizador para el estudio de cristalización de carbonato de calcio. Estas películas fueron preparadas mediante el método sol-gel, donde el componente orgánico es Qui y la contraparte inorgánica proviene de la hidrólisis de tetraetilortosilicato (TEOS) o (3-aminopropil) trietilsilano (APS). Como era de esperar, las diferencias estructurales de ambos silicatos modificaron el entorno en que cristalizan las sales de calcio. Todas las mezclas híbridas produjeron calcita. Las morfologías de calcitas obtenidas son diferentes a lo observado normalmente al usar el híbrido Qui/TEOS/QuiS como agente mineralizador. Las mezclas híbridas Qui/TEOS generaron calcitas laminares y vateritas esféricas, mientras mezclas híbridas de Qui/PAPS y Qui/APS/QuiS produjeron aglomeraciones de aragonitas con forma de rosetas.

ABSTRACT

The development of new materials is of vital importance for the technological advances in such fields as semiconductors, optics, electronics and biomedicine. A route for the synthesis of these new materials is what is known as biomimetic. Live organisms produce inorganic materials with very specific characteristics under soft conditions of pressure and temperature. This process is known as biomineralization, where the presence and participation of some biopolymers determines the morphology, crystallographic orientation and the polymorphs. The study and the development of bioinspired materials would have a strong impact at technological level.

The effect of different functional groups contained in some biopolymers on the crystallization *in Vitro* of calcium carbonate was studied in this thesis. All agglomerates of calcium carbonate were characterized by scanning electron microscopy and X- ray diffraction. It was not possible to carry out the characterization of the agglomerates obtained from Qui/Alg blends by X- ray diffraction, instead, infrared spectroscopy was employed.

Chitosan, (Qui), gelatin (Gel), alginate, (Alg) and κ - carragenate (Carr) were used as template either in solution or freeze-dried. Also freeze-dried blends of Qui/Alg with different compositions were used as template. When alginate and chitosan, and/or freeze-dried blends of Qui/Alg were used as template agglomerates of calcium carbonate were obtained, where both polymorphs of calcite and vaterita coexist. When freeze-dried blend of Qui/Alg was used as template, both aragonite and calcium carbonate hexahydrated as well as calcite agglomerates with different morphology and crystallographic orientation. The latter is not reported in the literature.

On the other hand, the chemical modification of the Qui was carried out with the aims of increasing and incorporating new functional groups to this biopolymer as well as studying their effect on the crystallization of calcium carbonate.

Chitosan sulfate and chitosan grafted with poly (acrylic acid) (PAA) or polyacrylamide (PAAM) were synthesized and their effects on the crystallization of calcium carbonate were studied. Blends of PAAM and Qui were also prepared with the purpose of comparing their behavior with that of modified chitosan in the crystallization of calcium carbonate. The results showed that when the crystallization of calcium carbonate was carried out in the presence of chitosan sulfate, modified calcites crystals with a mayor growth in a specific plane were obtained. The use of Qui grafted with PAA as template generates agglomerates of calcium carbonate with a toroidal morphology, not reported in the literature. When grafted Qui with PAAM was used as template calcium sulfate crystals was obtained. This was attributed to the use of potassium persulfato as initiator for the grafting reaction. The sulfate ions were generated by thermal decomposition of the potassium persulfate associate with the amide groups of PAAM and consequently the crystallization of calcium sulfate takes place.

Also, organo-inorganic hybrid films were used as templates for the study of the crystallization of calcium carbonate. These films were prepared by the method of sol-gel, where the organic component is Qui and the inorganic component is produced by hydrolysis of tetraetilortosilicato (TEOS) or (3-aminopropil) trietilsilano (APS). As was expected, the structural differences of both silicates modified the environment where the crystallization of calcium salts take place. All hybrid blends produced calcite. The morphologies of obtained calcites are different to that usually observed when using the Qui/TEOS/Quis hybrid as template. The Qui/TEOS hybrid blends generated foliated calcites and spherical vaterites, while hybrid Qui/PAPS and Qui/APS/Quis blends produced agglomerates of aragonites with rosettes form.

1. Capítulo I

Introducción

1.1. Biomineralización

En la naturaleza los seres vivos son capaces de diseñar diferentes materiales minerales, con funciones específicas y sólo con un número limitado de elementos. Esta restricción es compensada con la capacidad de modificar sus formas para aplicaciones específicas. Este proceso se conoce como Biomineralización.

El primer texto referido al tema fue publicado en 1924 en Alemania por Schmidt. Posteriormente, en la década del 80 este proceso fue conocido como “calcificación” reflejando la preponderancia de este elemento en los materiales de origen biológico. Debido al descubrimiento de la presencia de otros cationes como componentes de materiales biogénicos, se denominó a este campo “biomineralización”. Desde entonces son muchos los autores que han escrito libros y monografías sobre este tema. ^[1-7]

El comprender los procesos involucrados en la biomineralización nos llevaría a entender cómo los seres vivos, bajo condiciones ambientales, pueden controlar el tipo de crecimiento de una estructura cristalina además de su estabilidad termodinámica. Esto nos propondría un abanico de rutas en el cual desarrollar por vías biomiméticas la síntesis de nuevos sólidos inorgánicos^[1-7]. La actual demanda en materiales avanzados con aplicaciones para las industrias de semiconductores, biomédicas, ópticas y electrónicas, requieren un control preciso de sus componentes cristalinos. Estos componentes además de ser puros deben poseer características específicas tales como tamaño, orientación y tipo de fase cristalina, por lo que el estudio detallado de los procesos de biomiméticos tendría un fuerte impacto a nivel tecnológico.^[6-8]

Al observar lo que ocurre en la naturaleza es posible encontrar materiales producidos por los seres vivos con variadas formas, por ejemplo, cáscaras de huevos, dientes, huesos, conchas de moluscos, etc. Estos últimos, son los más estudiados, los que son conocidos como el nácar.

Específicamente, este material posee propiedades mecánicas excepcionales. Con sólo un 1% de materia orgánica, el nácar posee resistencia a la fractura 3000 veces mayor que el de carbonato de calcio mineral. Esto se debe a su microestructura ordenada^[9], lo que dificulta la propagación de la grieta que se produce en una fractura. Por esta razón es necesario aplicar una energía adicional para la propagación de la fractura. Además cada una de las láminas se encuentra rodeada de una matriz orgánica, que contiene quitina en un porcentaje mayoritario. La capa orgánica funciona como un adhesivo aumentando aun más la energía requerida para que ocurra una fractura.^[9] El nácar está formada por laminas poligonales de aragonita. La aragonita es uno de los polimorfos metaestable del carbonato de calcio, **Figura 1.1**.

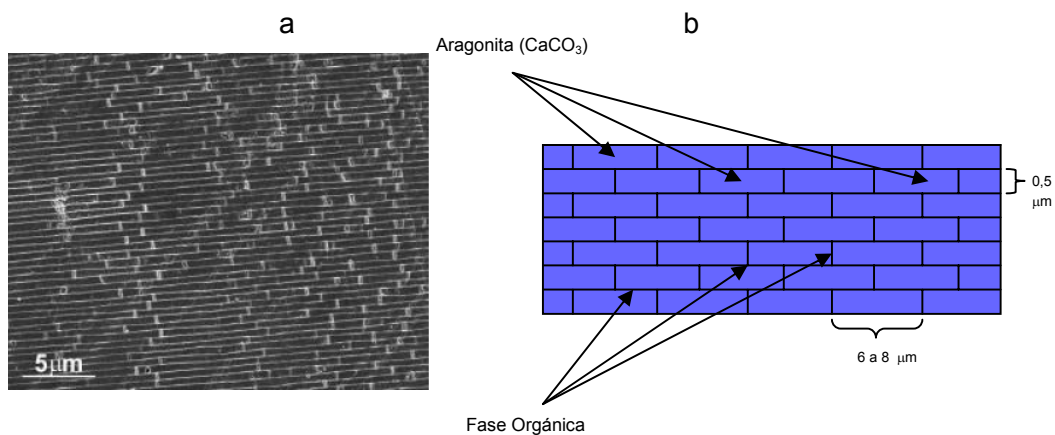


Figura 1.1 a) Micrografía de nácar b) esquema de la estructura de nácar.

El proceso de ordenamiento y selección del polimorfo lo realiza el ser vivo cristalizando el CaCO₃ en presencia de agentes ajenos a las componentes básicas de esta sal, como cationes y/o macromoléculas de origen orgánico. Muchos son los autores que han y están investigando sobre el tema, el cual, está lejos de ser comprendido completamente, debido a las múltiples aristas y componentes que están involucrados en el proceso de síntesis de los materiales biogénicos.

En general, la gran mayoría de los materiales o biomateriales sintetizados por los distintos seres vivos en la naturaleza son cristalinos.

La formación de cristales tiene una base teórica bien fundamentada que ayuda a comprender cuales son los pasos que los seres vivos pueden controlar en el proceso de cristalización para

obtener un sin número de materiales con llamativas morfologías y propiedades específicas como ópticas, mecánicas y magnéticas.

1.2. Revisión Bibliográfica

1.2.1. Proceso de cristalización

En términos muy generales es posible considerar a la cristalización como un proceso de precipitación. La diferencia fundamental es el tamaño de las partículas obtenidas. En la precipitación el tamaño de las partículas son mucho menores que en la cristalización. Otra diferencia es el tiempo en la que transcurre estos procesos. La precipitación ocurre mucho más rápido que la cristalización. ^[10]

La cristalización consiste básicamente en dos etapas, la nucleación y el crecimiento cristalino. Este proceso ocurre cuando se alcanza la sobresaturación (σ). La sobresaturación de una sal en solución se obtiene cuando el producto iónico (PI) del soluto es mayor que el valor de constante de producto de solubilidad (K_{ps}) (**Ecuaciones 1.1- 1.3**).



Donde aA y bB son los números de moles de A y B el producto ionico para esta reacción PI (PI) es igual a:

$$PI = [A]^a [B]^b [C]^c \dots [N]^n \quad (1.2)$$

De ahí se desprende la expresión para el K_{ps} :

$$K_{ps} = [A]_e^a [B]_e^b [C]_e^c \dots [N]_e^n \quad (1.3)$$

Donde el subíndice e se refiere a las concentraciones en equilibrio. La energía libre de la solución por molécula, Δg_{sol} , y el cambio de potencial químico se definen mediante **las ecuaciones 1.4-1.6**. ^[11]

$$\Delta g_{sol} = -k_B T \ln K_{ps} \quad (1.4)$$

$$\Delta \mu = k_B T \ln PA - \Delta g_{sol} \quad (1.5)$$

$$\Delta\mu = k_B T \ln(PA / Kps) \quad (1.6)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann y T es la temperatura absoluta. En lugar de usar $\Delta\mu$, para los análisis de crecimiento cristalino, es más común utilizar la expresión de sobresaturación (σ) la que se encuentra relacionada con $\Delta\mu$ a través de las **ecuaciones 1.7 y 1.8**.

$$\Delta\mu = k_B T \ln \sigma \quad (1.7)$$

$$\sigma \equiv \ln \left\{ \frac{AP}{Kps} \right\} \quad (1.8)$$

La σ también se puede expresar como:

$$\sigma \equiv \left(\frac{AP}{Kps} \right)^{-1} \quad \text{o} \quad \left(\frac{C}{C_e} \right)^{-1} \quad (1.9)$$

Donde C y C_e son las concentraciones de los reactantes en equilibrio. Esta aproximación sólo es válida para valores de σ muy bajas.

Relación de Ostwald-Freundlinch. Si bien la **Ecuación 1.9** es una buena aproximación para establecer la saturación, esta no considera la forma de la fase sólida, ni la influencia de éste en el estado de equilibrio del sistema.

Una relación que si considera estos parámetros es conocida como la relación de Ostwald-Freundlinch que relaciona la interacción liquido-sólido del sistema a través de consideraciones termodinámicas^[11].

$$\ln \sigma = \frac{2\gamma_{sl}V_m}{k_B T r} \quad (1.10)$$

Donde γ_{sl} es la tensión superficial, r , el radio del cristal y V_m el volumen del cristal, la

Ecuación 1.10 es la expresión de Ostwald-Freundlich, que muestra el efecto de una solución sobresaturada en equilibrio con el tamaño de una partícula esférica.

La relación entre la sobresaturación, σ , y el logaritmo de radio, r , de una partícula en concentración molal de la calcita, que corresponde al polimorfo más estable de carbonato de calcio, se presenta en la **Figura 1.2.1**.

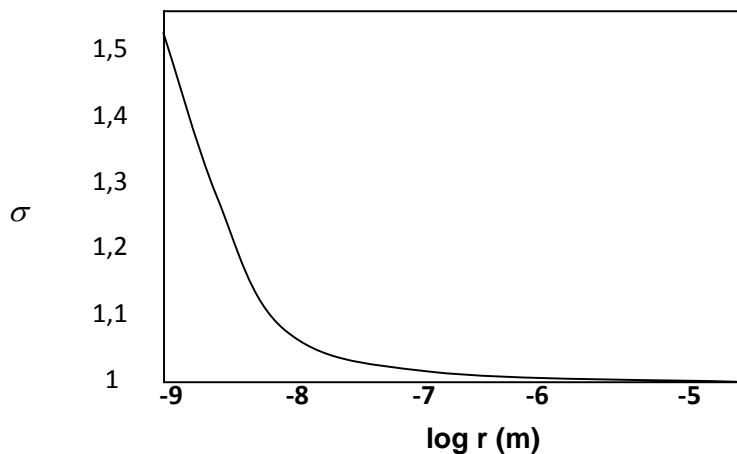


Figura 1.2.1. Relación de Ostwald-Freundlich entre sobresaturación y el logaritmo del radio de calcita.

1.2.2. Nucleación

La condición de sobresaturación no es una causa suficiente para que un sistema comience a cristalizar. Antes de que los cristales comiencen a desarrollarse deben existir embriones, núcleos o semillas como centros de cristalización. La nucleación puede iniciarse en forma espontánea o puede ser inducida artificialmente. Conocer el origen de este núcleo no es siempre posible pues un sistema puede haber creado un núcleo espontáneamente o se ha producido por la influencia de algún estímulo externo, como puede ser la agitación, un golpe mecánico o por fricción.

En términos generales, este proceso puede ser clasificado en dos grandes grupos, primario y secundario, (Figura 1.2.2.)

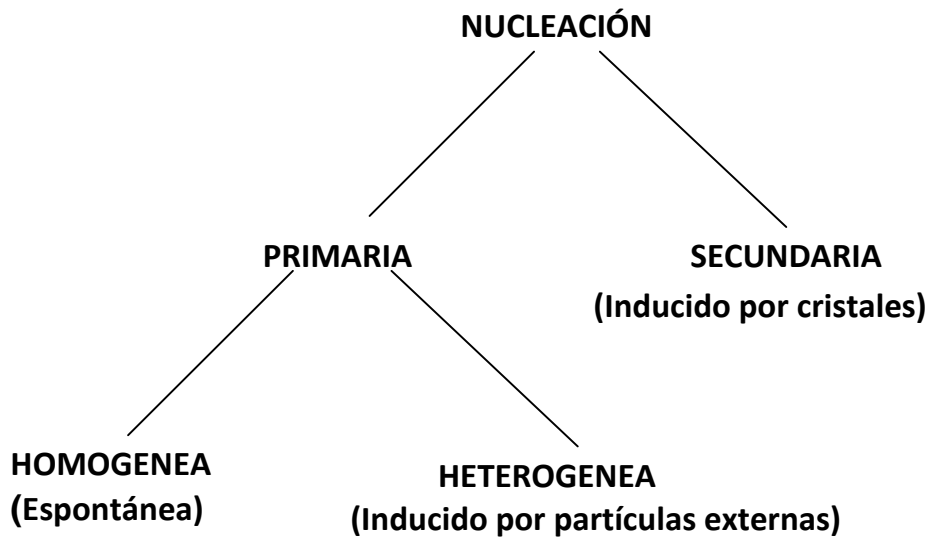


Figura 1.2.2. Procesos de la nucleación. (Mullin, J. W. en “Crystallization”, 1993, Oxford: Butterworth Heinemann press, UK)

La nucleación primaria está referida para todos los procesos en el cual el sistema no presenta cristales. Por otro lado la nucleación a menudo es generada en la vecindad de los cristales presentes en un sistema sobresaturado. A este último se le conoce como nucleación secundaria.

Nucleación primaria (homogénea) No está comprendido cómo exactamente se forma un núcleo estable de un cristal en un líquido homogéneo. Un ejemplo simple es el proceso ocurrido durante la condensación de un vapor sobresaturado a fase líquida. La transición de vapor a la fase líquida es sólo posible después de la formación de gotas microscópicas sobre la superficie de condensación. Estos son llamados núcleos de condensación. Sin embargo, como la presión de vapor en la superficie de estas gotas es sumamente alta, estas se evaporan rápidamente aunque el vapor circundante se encuentra sobresaturado. Nuevos núcleos se forman mientras otros viejos se evaporan, hasta que finalmente se forman gotas estables ya sea por coagulación o bajo condiciones de muy alta sobresaturación del vapor.

La formación de los núcleos de cristalización es un proceso aún más difícil de prever. Esta debe tener las moléculas necesarias para coagularse, oponerse a redisolución y además orientarse

para formar una red fija. El número de moléculas necesarias para formar un núcleo cristalino es variable y va desde diez a varios mil como ejemplo el agua (hielo) en los cuales los núcleos pueden contener cerca de 100 moléculas. Mirado desde este punto de vista, es poco probable que un número fijo resulte de un choque de moléculas. Es más probable que sea resultado de una sucesión de adiciones bimoleculares como se observa en la **Figura 1.2.3**.

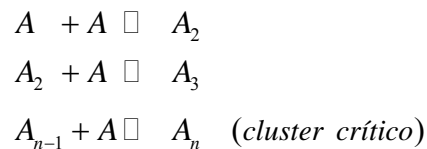


Figura 1.2.3. Proceso bimolecular para la formación de un *cluster* crítico.

Las adiciones moleculares sobre un *cluster* en condiciones críticas tendrían como resultado la nucleación y por consiguiente el crecimiento del núcleo. Situación semejante a la observada en una solución en la que los iones y las moléculas pueden interactuar para formar pequeños grupos y/o formar cadenas cortas, lo que puede formar una red y así un cristal. Este proceso, que ocurre muy rápidamente, sólo puede continuar en zonas donde la sobresaturación es muy alta. Muchos de los embriones o pre-núcleos fallan en llegar a la madurez ya que simplemente se disuelven pues son inestables. Cuando los embriones crecen más allá de un valor crítico estos ya se estabilizan. La estructura de esta aglomeración de moléculas o iones no se conoce bien. Podría ser un cristal perfecto, pero es demasiado pequeño para ser observado directamente ^[12].

La teoría clásica de la nucleación de Gibbs describe que la velocidad de la nucleación homogénea depende de la sobresaturación, la que es sustentada en la relación de Ostwald-Freundlich. Esto se basa en el proceso condensación de un vapor a un líquido, pero éste tratamiento puede ser extendido desde líquidos a sólidos fundidos.

El cambio de energía libre de Gibbs puede ser asociado con el proceso de nucleación homogénea. El cambio de energía libre, ΔG , entre una pequeña esférica de radio r del soluto y

el soluto en solución, es igual a la suma del cambio de la energía libre superficial, ΔG_s , y el cambio de la energía libre por unidad de volumen ΔG_v . **Ecuación 1.11**

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v \quad (1.11)$$

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v \quad (1.12)$$

Donde γ es la tensión superficial entre el crecimiento de la superficie cristalina y la solución sobresaturada. Estos dos términos de la **Ecuación 1.11** tienen signos opuestos y dependen de forma distinta de r . La **Figura 1.2.4** muestra la dependencia de r en función de ΔG .

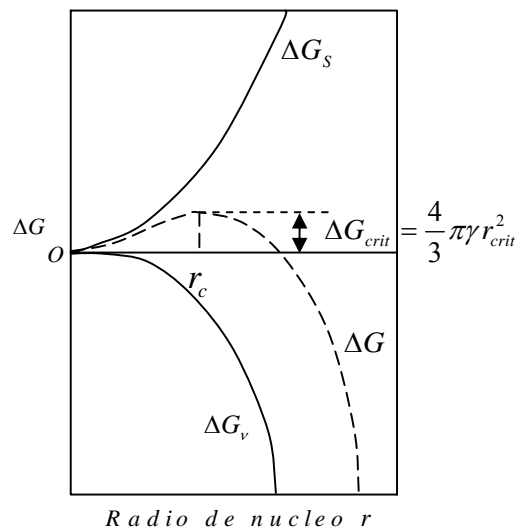


Figura 1.2.4. Diagrama de energía libre en función del radio de núcleo.

El máximo valor, ΔG_{crit} , corresponde al radio crítico del núcleo el cual se obtiene de la **Ecuación 1.13**.

$$\frac{d\Delta G}{dr} = 8\pi r \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta G_v = 0 \quad (1.13)$$

$$\Rightarrow r_{crit} = -\frac{2\gamma}{\Delta G_v} \Rightarrow \Delta G_{crit} = \frac{4\pi \gamma r_{crit}^2}{3} \quad (1.14)$$

El valor crítico para r , (r_{crit}), entonces representa el tamaño estable mínimo de un núcleo. Las partículas menores que r_{crit} se disuelven en la solución supersaturada y sólo las que poseen un mayor tamaño empiezan a crecer.

Ahora al introducir la relación Ostwald-Freundlich que relaciona la solubilidad con el tamaño de partícula, **Ecuación 1.14**, se obtiene:

$$r_{crit} = \frac{2\gamma_{sl} V_m}{k_B T \ln \sigma} \quad (1.15)$$

Entonces al sustituir en la **Ecuación 1.15** se obtiene:

$$\Delta G_{crit} = \frac{16\pi \gamma_{sl}^3 V_m^3}{3(k_B T \ln \sigma)^2} \quad (1.16)$$

Que relaciona el valor de la energía libre de Gibbs crítico en función del volumen.

Por otra parte la velocidad de nucleación, J , puede ser expresada en la forma de Arrhenius:

$$J = A e^{-\Delta G / k_B T} \quad (1.17)$$

Donde J es el número de núcleos formado por unidad de tiempo.

Al introducir la **Ecuación 1.16** en la **Ecuación 1.17**, el resultado es:

$$J = Ae^{\left(-\frac{16\pi\gamma^3V_m^2}{3(k_B T)^3 (\ln \sigma)^2} \right)} \quad (1.18)$$

En la **Ecuación 1.18** es posible observar las variables fundamentales que controlan la velocidad de nucleación J , la temperatura, $V =$ Volumen y la tensión superficial, γ . La **Figura 1.2.5** muestra el incremento de la velocidad de nucleación cuando los valores de sobresaturación aumentan, aunque experimentalmente se ha demostrado que esto tiene un límite.

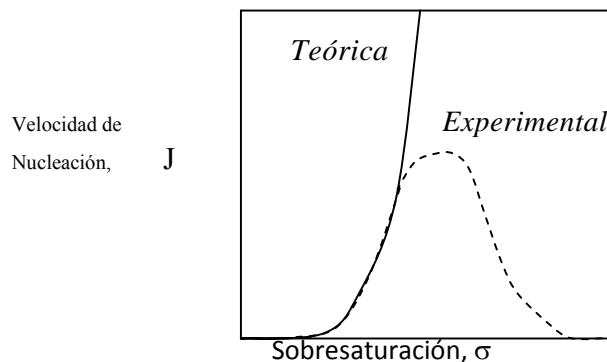


Figura 1.2.5. Relación entre la sobresaturación σ y la velocidad de nucleación J .

La zona de sobresaturación que se encuentra entre la saturación (Zona de disolución) y la sobresaturación crítica (Zona Inestable) es donde ocurre la nucleación secundaria y es considerada como una zona metaestable la que puede variar significativamente, **Figura 1.2.6**.

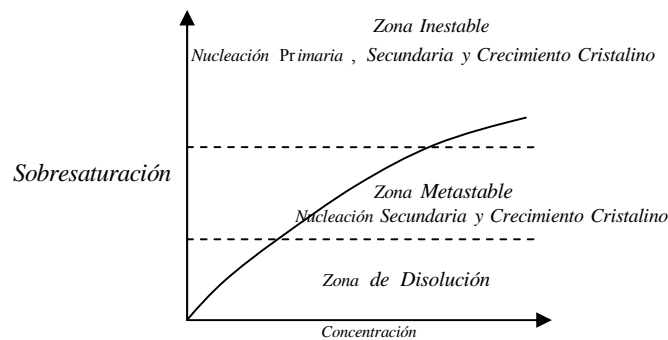


Figura 1.2.6. Sobresaturación en función de la Concentración.

La fase sólida puede disolverse a concentraciones menores que la sobresaturación. Sin embargo, debajo de determinado grado de sobresaturación crítica, se puede observar la

nucleación secundaria y el crecimiento cristalino. Ambos fenómenos son relacionados con la fase sólida. En la zona inestable, una fase sólida puede formarse espontáneamente sin la participación de la fase sólida inicial. Este fenómeno se denomina la nucleación primaria^[12]. El ancho de la zona, es decir, la sobresaturación crítica, puede variar significativamente dependiendo de las condiciones externa. Dentro de la zona metaestable, la sobresaturación puede ser consumida por crecimiento cristalino y el denominado nucleación secundaria sobre la fase sólida ya existente.

Nucleación secundaria (heterogénea) En general es asumido que la nucleación heterogénea siempre ocurre en paralelo con la homogénea. Sin embargo, su participación disminuye con el incremento de la sobresaturación. Siempre ocurrirá una nucleación heterogénea debido a que es imposible obtener una solución sin ninguna partícula extraña. La velocidad de nucleación es susceptible a la influencia de elementos extraños (impurezas). Estas pueden realizar un efecto similar a la de un catalizador disminuyendo el valor de la energía de activación.

El valor de la energía libre de Gibbs asociado a las condiciones críticas heterogénea, $\Delta G'_{crit}$, debe ser menor al cambio de energía libre de Gibbs crítico, ΔG_{crit} , correspondiente al sistema homogéneo. Al asociar las dos energías libres, se tiene:

$$\Delta G'_{crit} = \phi \Delta G_{crit} \quad (1.19)$$

Donde ϕ es menor que 1.

Como se mencionó antes, en la **Ecuación 1.16**, la tensión superficial (γ) es uno de los factores más importantes que controlan el proceso de nucleación.

En la **Figura 1.2.7** se presenta un diagrama de las tensiones superficiales que se observarían en un sistema compuesto por tres partes: una superficie sólida, un cristal y un líquido. Donde,

- γ_{cs} la tensión superficial entre el cristal y la superficie.
- γ_{cl} la tensión superficial entre el cristal y el líquido.
- γ_{sl} la tensión superficial entre la superficie y el líquido n.

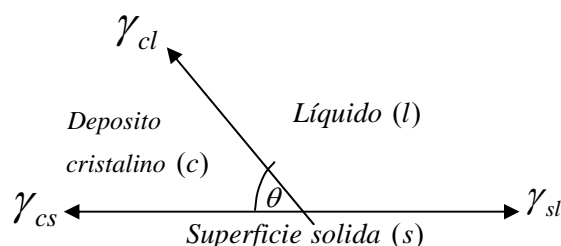


Figura 1.2.7 Esquema de las tensiones superficiales y las fronteras que existirían en un sistema donde coexisten tres fases: superficie sólida (s), líquido (l) y depósito cristalino (c). Las diferentes tensiones superficiales pueden relacionarse como:

$$\gamma_{sl} = \gamma_{cs} + \gamma_{cl} \cos \theta \quad \text{o} \quad \cos \theta = \frac{\gamma_{sl} - \gamma_{cs}}{\gamma_{cl}} \quad (1.20)$$

El factor ϕ de la **Ecuación 1.20** se puede expresar de esta manera^[13],

$$\phi = \frac{(2 + \cos \theta)(1 - \cos \theta)}{4} \quad (1.21)$$

El valor de $\phi = 1$ o $\theta = 180^\circ$ indica que no existe afinidad entre el sólido cristalino y la superficie sólida. Por lo tanto el ΔG para un proceso heterogéneo es igual al necesario para un proceso homogéneo o espontáneo. Cuando se observa una situación en la cual $0 < \theta < 180^\circ$ (afinidad parcial), la nucleación heterogénea es fácil de lograr ya que la energía necesaria es menor que para un proceso homogéneo. El último caso es donde la afinidad es completa, $\theta = 0$. Esta situación ocurre cuando se induce la cristalización por la adición de algunos cristales sobre una solución sobresaturada. La **Figura 1.2.8** presenta la relación entre el valor de ϕ y el ángulo de contacto θ .

En una solución sobresaturada es posible que se formen núcleos de alguna manera. En el caso donde la sobresaturación no es alta, la presencia de cristales facilita la nucleación. Los mecanismos para este tipo de nucleación han sugerido la presencia de una estructura transitoria, pero que no ha sido posible caracterizar^[13].

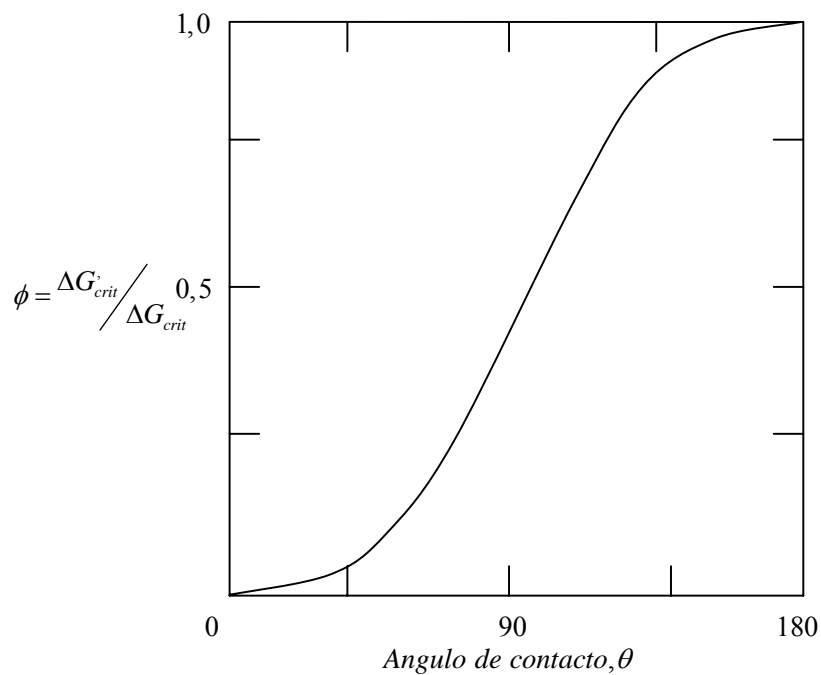


Figura 1.2.8. Relación de las energías libres de nucleación y el ángulo de contacto.

1.2.3. Crecimiento Cristalino

En el momento que los núcleos formados en una solución sobresaturada superan el valor crítico, r_{crit} , **Ecuación 1.15**, es el instante que los cristales comienzan su crecimiento y pueden ser visibles.

Muchos son los mecanismos propuestos para el crecimiento cristalino, entre los cuales se destaca la teoría de superficie y la teoría de la absorción de capas. La primera se basa en que la forma que adopta un cristal en crecimiento es aquella que tiene una mínima energía superficial. Este enfoque se encuentra casi abandonado, aunque no completamente. El segundo asume que el crecimiento se sustenta en el depósito continuo en una cara del cristal en una tasa proporcional a la diferencia en la concentración entre el punto de deposición y la de la solución.

Teoría de Absorción de capas. El concepto de mecanismo para el crecimiento cristalino basado en la existencia de un capa de átomos o moléculas adsorbidas sobre una cara cristalina fue sugerida por primera vez por Volmer en 1939 [13]. Varias barreras deben ser vencidas para que un ión o molécula se incorpore en una red cristalina. Estos son: difusión a través de la capa frontera alrededor del cristal, adsorción en la superficie del cristal, difusión superficial hacia los sitios de crecimiento del cristal y la integración en la red cristalina.

El mecanismo que implica el crecimiento cristalino de un cristal iónico puede ser bastante complicado. Debido a esto, se recurre al concepto de la sobresaturación como la fuerza motriz para explicar estos mecanismos, los que se presentan a continuación [13].

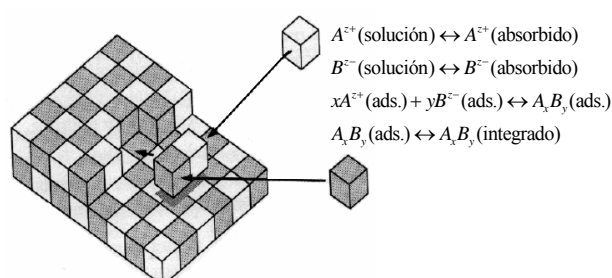


Figura 1.2.9. Mecanismo I de Absorción de Capas. Los iones A^{z+} y B^{z-} se adsorben individualmente en la capa de adsorción. En seguida, se obtiene el componente insoluble y posterior integración a la red cristalina.

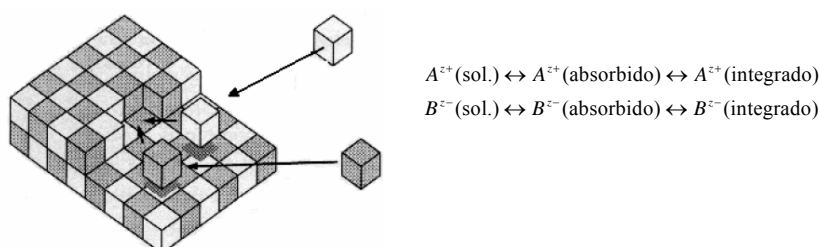


Figura 1.2.10. Mecanismo II de Absorción de Capas. Ocurre la adsorción individual de cada uno de los iones y de esta manera su integración directa en la red cristalina en la forma iónica.

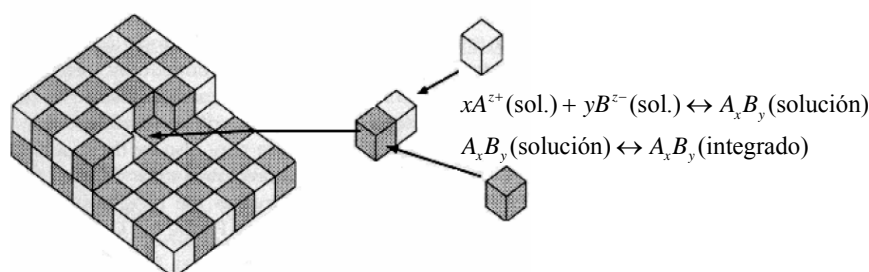


Figura 1.2.11. Mecanismo IIIa de Absorción de Capas. Los iones disueltos forman un componente en solución y este componente en solución se incorpora a la red cristalina.

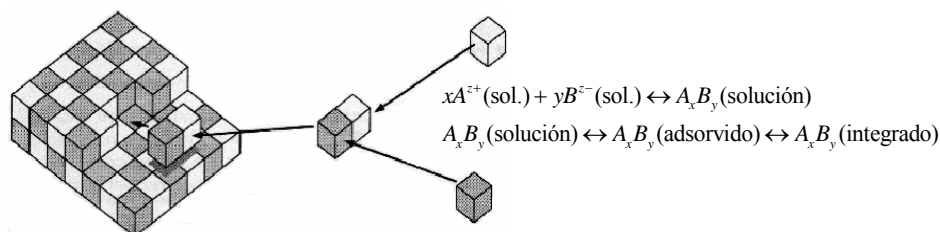


Figura 1.2.12. Mecanismo IIIb de Absorción de Capas. Los iones disueltos forman un componente en solución y este componente se incorpora en las capas fronteras y posteriormente a la red cristalina.

La velocidad del crecimiento del cristal está limitada, como en todos los procesos escalonados, por el paso más lento. Si la velocidad del crecimiento cristalino está controlada por la difusión, implica que este es el paso más lento que la velocidad de integración a la superficie ^[13].

Se han desarrollado otros modelos bastante más sofisticados para predecir el crecimiento cristalino en los últimos años. En algunos casos se sugiere una nucleación en dos dimensiones lo que hace más complicado su aplicación en bajas sobresaturaciones. Pero hasta el momento ninguno ha podido predecir con precisión los sitios de crecimiento cristalino.

1.2.4. Polimorfos

Algunas moléculas pueden cristalizar con frecuencia en distintos ordenamiento o distribución formada por diferentes celdas unitarias. Cuando ocurre esta situación, a cada una de estas estructuras se les conoce como polimorfismo.

Generalmente estas estructuras llamadas polimorfos no poseen la misma estabilidad termodinámica. En algunos casos estas pueden ser parte de pasos intermedarios, incluso en algunos casos hasta amorfas y por lo tanto inestables. Como resultado final de esta evolución se obtiene una estructura estable, siguiendo lo que se conoce como la regla de Ostwald, **“La primera fase que se forma será aquella de mayor solubilidad. Esa fase se transforma seguidamente por disolución y recristalización en las fases menos solubles. La fase finalmente obtenida es el compuesto menos soluble”** ^[14]. Cada una de estos polimorfos y/o

estructuras intermedias tienen propiedades físicas y químicas distintas, que en ciertas situaciones tienen aplicaciones más interesantes que las estructuras más estables.

Estos procesos de formación de una fase u otra se encuentran controlados tanto por la termodinámica y/o la cinética, **Figura 1.2.13**. Una fase inicialmente formada puede ser resultado de efectos cinéticos y no termodinámicos pero que en un

siguiente cambio de fase pueda pasar a un estado termodinámicamente más estable. Aunque puede darse el caso que la estructura no pase a un estado termodinámicamente más estable ya que es controlado cinéticamente.

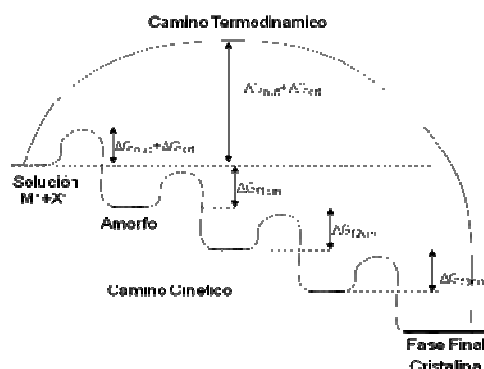


Figura 1.2.13. Posible esquema de los procesos de formación de una fase u otra que puede ser controlado termodinámicamente y/o cinéticamente.

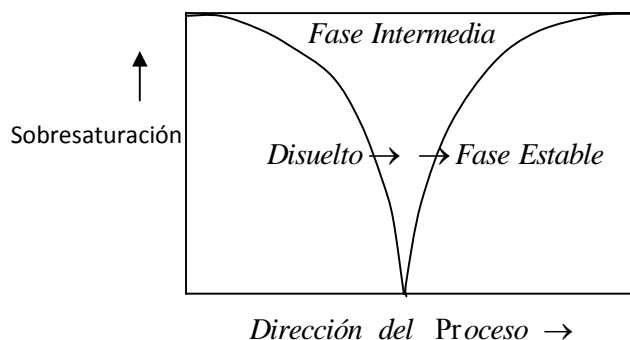


Figura 1.2.14. Efecto de la sobresaturación sobre la transformación de fase o la permanencia de una fase intermedia o transición hacia un estado termodinámicamente más favorable.

La estabilización de una fase inestable es posible al aumentar la sobresaturación como se puede observar en la **Figura 1.2.14**.^[15]

1.2.5 Efecto de las impurezas

El efecto de impurezas en el proceso de cristalización y crecimiento cristalino puede generar grandes cambios en la morfología y estructura de los cristales. Algunas impurezas pueden inhibir completamente el crecimiento cristalino. En otros casos pueden aumentar el crecimiento. También es posible tener una gran selectividad actuando sólo en ciertas caras cristalográficas inhibiendo y/o aumentando el crecimiento de estas. Algunas impurezas pueden ejercer una influencia en concentraciones muy bajas, menos de 1 parte por millón, mientras que en otros necesitan estar presentes en cantidades bastante grandes antes de tener cualquier efecto. Cualquier sustancia ajena al cristal puede ser considerada una impureza incluso en algunos casos hasta un cambio de solvente puede producir cambios en el cristal ^[13].

1.3 Carbonato de Calcio

Carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los minerales más abundantes que podemos encontrar en los seres vivos, por lo que es uno de los biominales más estudiados ^[16].

Es posible identificar cinco polimorfos para el CaCO_3 . Tres de ellos son formas cristalinas anhidras: calcita, aragonita y vaterita. Además, se han identificado dos formas hidratadas del carbonato de calcio; el carbonato de calcio hexahidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) y monohidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Es factible también encontrar el CaCO_3 en estado amorfo estabilizado pero sólo en alguno organismos vivos ^[17].

1.3.1 Polimorfos de carbonato de calcio

La estabilidad termodinámica de calcita es la mayor aunque muy similar a la de aragonita ^[18]. Probablemente por esta razón ambas fases son comunes tanto en muestras biológicas como geológicas. El caso de la vaterita es distinto pues es la menos estable y además es muy poco común encontrarla en muestras de origen biológico y es más factible identificarla en muestras de origen geológico, **Tabla 1**.

Los otros tres polimorfos de carbonato de calcio son menos abundantes. $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ puede ser producido por seres vivos y el $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sólo es posible encontrarlo en forma natural en agua de mar entre -3 a 3 °C y el amorfo se observa en presencia de alguna fase cristalina como parte de una transición cristalina^[16].

Tabla 1. Presencia de carbonato de calcio en los seres vivos. ^[19]

Mineral	Formula	Organismo	Ubicación	Función
Calcita	CaCO_3	Cocolitos	Pared Celular	Exoesqueleto
		Moluscos	Concha	Exoesqueleto
		Crustáceos	Cutícula del Cangrejo	Esfuerzo Mecánico
		Aves	Cáscaras de Huevos	Protección
		Equinodermos	Lentes	Óptica
		Mamíferos	Oído medio	Sensor de Gravedad
Aragonita	CaCO_3	Coral	Pared celular	Exoesqueleto
		Moluscos	Concha	Exoesqueleto
		Cefalópodos	Concha	Flotabilidad
		Peces	Cabeza	Sensor de Gravedad
Vaterita	CaCO_3	Gastrópodos	Concha	Exoesqueleto
		Ascidianas	espículas	Protección
Amorfo	$\text{CaCO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Crustáceos	Cutícula del Cangrejo	Esfuerzo Mecánico
		Erizos	Espículas	Fase precursora
		E esponjas	espículas	Esfuerzo/Protección
		Ascidianas	espículas	Esfuerzo Mecánico

Calcita y aragonita tienen una estructura cristalina muy similar y como se comentó antes, con una estabilidad termodinámica parecida, aunque, la calcita es levemente más estable. Por lo tanto, según la regla de Ostwald, la solubilidad de aragonita es mayor que la de la calcita, $4,36 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ y $3,35 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente.^[20]

Calcita es un cristal romboédrico que pertenece al grupo espacial $R\bar{3}c$, las dimensiones y ángulos de la celda unitaria son $a = b = 4,99 \text{ \AA}$, $c = 17,016 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$.

Aragonita es un cristal ortorrómbico que pertenece al grupo espacial $Pm\bar{c}n$, las dimensiones y ángulos de su celda unitaria son $a = 4,9598 \text{ \AA}$, $b = 7,9641 \text{ \AA}$, $c = 5,7379 \text{ \AA}$ y $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$.^[21]

Ambas estructuras cristalinas están compuestas por capas alternadas de iones calcio y iones carbonatos perpendiculares al eje c (con ab en el plano). El ión calcio ocupa casi la misma posición en la red en este plano y en las dos fases los planos moleculares de los iones carbonatos son paralelos con el plano, **Figura 1.3.1**.

Sin embargo, en la aragonita, algunos de los iones del carbonato se elevan en la dirección de c para formar dos capas separadas por $0,96 \text{ \AA}$. Así, las orientaciones en dos capas son diferentes, **Figura 1.3.1**.

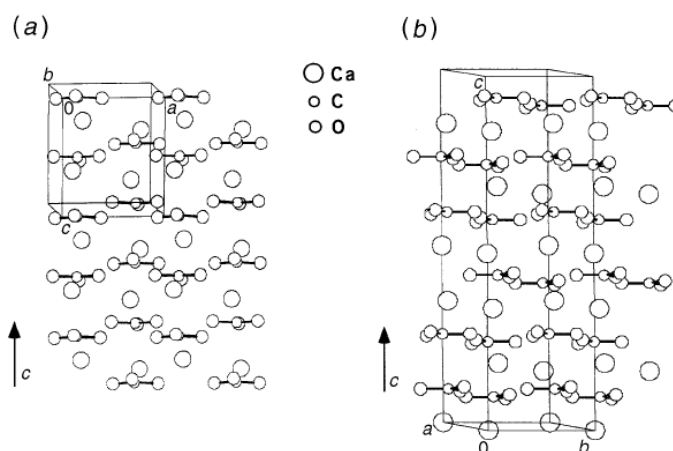


Figura 1.3.1. Estructura cristalina de (a) aragonita y (b) calcita, donde se observa el corrimiento de los iones carbonato en la dirección c . Esta diferencia es lo que implica las distintas propiedades que poseen estas dos fases.

La optimización de las interacciones en la aragonita permite un mejor empaquetamiento, y por consiguiente la densidad de este polimorfo es mayor que la calcita, $2,93 \text{ g/ml}$ y $2,71 \text{ g/ml}$, respectivamente.

En la aragonita el crecimiento preferencial es a lo largo del eje c por sobre los otros ejes cristalinos. Esa es la explicación porque en condiciones normales de presión y temperatura la aragonita crece en forma de agujas (cristales aciculares). Generalmente los cristales de aragonita son pequeños y cuando son producto de biomineralización se observan como maclas policristalinas.^[22] La calcita sintética crece en cambio en forma romboédrica y sin ningún plano preferencial circunscrito a caras oblicuas {104}. La estabilidad de este plano es fácil de entender debido a lo compacto que se encuentran los iones calcio y carbonato a través de esta cara. Un plano de alta estabilidad siempre va acompañado de una baja energía de cohesión en los planos paralelos. La estabilidad de los planos {104} de la calcita también es la razón para su debilidad mecánica y la causa de su carácter quebradizo. Es por eso que el cristal de calcita cliva fácilmente a lo largo de los planos {104} llamado “plano de clivaje romboédrico” donde las grietas se propagan por este camino con un mínimo de energía, en contraste con la aragonita que no posee ningún plano de clivaje.

Los organismos vivos producen los dos polimorfos en forma abundante para la construcción de materiales y la opción de usar un polimorfo u otro es definida bajo un control genético ^[22]. Parecería que un polimorfo ofrece mayores ventajas que el otro, si bien los dos poseen energía de red cristalinas muy parecidas a la misma composición. Aragonita posee la ventaja de no tener planos de clivaje, pero tiene la desventaja de poseer un pequeño tamaño y un crecimiento en forma de agujas, además de la tendencia de formar aglomeraciones de esferulitas y cristales de muy alta porosidad. La calcita, en cambio, tiende a formar cristales más grandes, pero éstos son muy quebradizos. Un análisis sobre la distribución de aragonita y calcita entre los materiales biomineralizados no da ninguna conclusión definitiva acerca de la razón por la que los seres vivos seleccionan uno u otro polimorfo. Sin embargo, cuando se trata del esqueleto, los seres vivos producen cristales grandes de carbonato de calcio que son preferentemente de calcita, como por ejemplo, las espinas de los erizos y las espículas de la esponja. Además, los cristales largos de la capa prismática exterior de las conchas de los moluscos son de calcita. Algunos moluscos sin embargo tienen estas capas prismáticas de aragonita. No hay ninguna ventaja obvia o razón para esta opción. Contrario a los casos anteriores, las láminas del nácar están siempre compuestas de aragonita, aunque unas estructuras muy similares a la del nácar son producidas por algún *bryozoans* pero que están formadas por calcitas.^[23]

El tercer polimorfo no hidratado de carbonato de calcio es la vaterita con una celda hexagonal que pertenece al grupo espacial $P6_322$. Las dimensiones de su celda unitaria y ángulos son $a =$

b 4,13 Å, **c** =8,49 Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$. Su densidad es menor que los otros polimorfos 2,653 g.cm⁻³ y por ser el menos estable de esta serie, es el más soluble; $1,099 \cdot 10^{-4}$ mol [20]

Los iones Ca⁺² y CO₃⁼ se encuentran organizados alternadamente en capas paralelas al eje **c**, donde el plano del CO₃⁼ es perpendicular a **c**, a diferencia de la calcita y aragonita en la que el plano de los grupos CO₃⁼ es paralela al plano **c**, **Figura 1.3.2**.

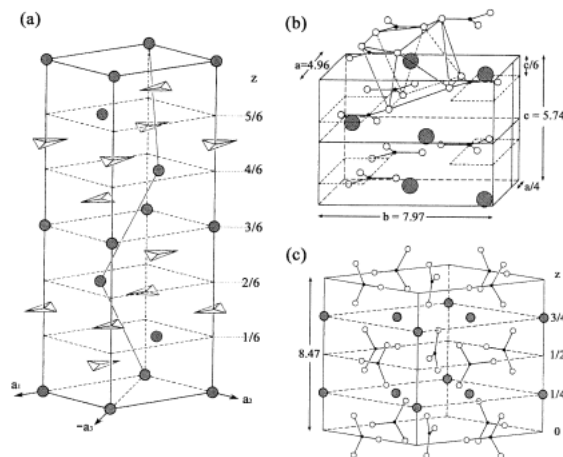


Figura 1.3.2. Polimorfos de carbonato de calcio, donde se observa que el plano de CO₃⁼ de calcita y aragonita están perpendiculares al eje c contrario a lo observado en vaterita donde ese plano es paralelo a al eje c. a) calcita, b) aragonita y c) vaterita.

1.3.2

Estados

hidratados de carbonato de calcio

La precipitación de las fases metaestable es favorecida con la velocidad de precipitación, bajas temperaturas y la incorporación de algunos aditivos [24-30].

Las dos fases hidratadas CaCO₃·6H₂O y CaCO₃·H₂O son estados de transición de de los estados anhidros. CaCO₃·6H₂O puede ser sintetizado a bajas temperaturas y estabilizarse con polifosfatos y Mg^[16, 24-31]. La síntesis de carbonato de calcio en su estado amorfo (CCA) es posible en condiciones de alta sobresaturación [16-20, 22-24, 32].

1.3.3 Agentes externos que afectan la cristalización de CaCO_3

La mayoría de los carbonatos de calcio provenientes de los procesos de biomineralización están asociados a macromoléculas orgánicas en un porcentaje en peso menor al 1%. El crecimiento de cristales de CaCO_3 *in vitro* y *en presencia* de macromoléculas orgánicas extraídas de biominerales, ha arrojado cambios en el crecimiento en planos cristalinos específicos^[16]. Se cree que la disminución específica de la energía de activación para la nucleación, en procesos de biomineralización en presencia de una macromolécula orgánica como matriz, involucra diferentes tipos de interacciones interfaciales entre los iones de la fase mineral y los grupos funcionales de la superficie de la macromolécula (**Figura 1.3.3.**)

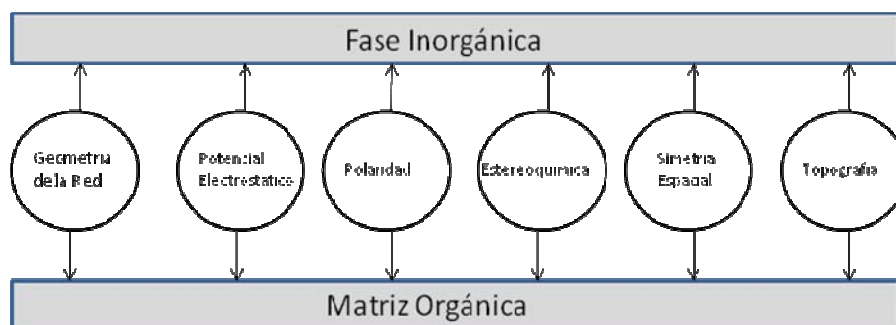


Figura 1.3.3. Reconocimiento molecular en la interface orgánico-inorgánico en la biomineralización.

En general estas interacciones involucran algún tipo de reconocimiento molecular en la interface orgánica-inorgánica. Por ejemplo, coincidencia de cargas, polaridad, estructura y estereoquímica pueden generar cambios específicos en la energía de activación, la que puede ser ajustada para controlar la velocidad de nucleación, el crecimiento, la orientación cristalina (textura) y la estructura (morfología) del mineral.

Biominerales que contienen calcio son frecuentemente asociados con macromoléculas orgánicas altamente ácidas enriquecidas con grupos carboxilatos (aspartato, glutamato), amino ácidos fosforilados (fosfoserina) y grupos azúcares sulfatados^[33].

La nucleación orientada puede estar definida y organizada por el sustrato, como una simple concentración de iones positivos y negativos en la matriz el cual puede que no sea específico con la orientación cristalina del polimorfo más estable ^[22].

Si bien todos los detalles específicos no se han podido identificar en su totalidad, en general se considera que la nucleación es controlada por la densidad de carga y los parámetros estructurales y quirales de la interface inorgánica-orgánica.

Iones metálicos .En general la precipitación de CaCO_3 en la naturaleza ocurre en presencia de iones metálicos, los que tienen una gran influencia en la formación de los distintos polimorfos. El efecto que ejercen los metales en la cristalización de CaCO_3 es ocupar sitios intersticiales de la red cristalina como es el caso del ión Li^+ que cuando está presente en concentraciones altas puede modificar la superficie del cristal. La adición del ión Li^+ retarda la transformación de aragonita y vaterita a calcita ^[34].

Muchos metales divalentes pueden reemplazar al ión Ca^{+2} y afectar la precipitación del CaCO_3 por diferentes mecanismos. Calcitas ricas en manganeso son posibles de sintetizar en soluciones de 16 mol % de Mn. En algunas muestras geológicas es posible incluso encontrar hasta un 50 mol % de Mn^[16]. La sustitución por iones de Fe también es posible en muestras geológicas conteniendo de 5-10 mol % de Fe. ^[16] .Si bien Ba y Sr poseen radios iónicos mayores que el calcio, se observa su incorporación en muestras de aragonita y calcita. ^[16]

La incorporación más importante observada en las aragonitas de origen biológicos es la que corresponde al Sr. La relación Ca/Sr es exactamente la misma que existe en el agua del mar.^[16]La presencia de Mg^{+2} es muy común en muestras de CaCO_3 ya sea de origen geológico o biológico .^[16]

El Mg^{+2} tiene la capacidad de generar importantes efectos en la precipitación del CaCO_3 y su presencia en ciertas concentraciones es capaz de estabilizar aragonita cuando las condiciones termodinámicas favorecen la formación de la calcita. ^[35, 36] Los estudios de cristalización *in vitro* en presencia de estos y otros cationes divalentes como Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ba^{+2} y Cd^{2+} muestran que estos son capaces de incorporarse a la red cristalina y así inducen cambios en la morfología y estabilización termodinámica, con excepción del Cu^{+2} ^[37].

Compuestos dicarboxílicos. El estudio de la calcificación en presencia de compuestos de estructura $\text{HO}_2\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CO}_2\text{H}$ arrojó un cambio en la morfología de calcita alargando una de

las caras y redondeando otras. El mayor efecto observado es cuando $n = 1$, ácido masónico. Este efecto disminuye con el aumento del largo de la cadena alifática. El cambio de morfología es considerado un reflejo de la interacción entre el aditivo orgánico y las caras del cristal.^[38]

Dendrimeros. Son una serie de macromoléculas orgánicas relativamente nuevas con una estructura similar a la de un árbol.^[39] Cuando son utilizadas como aditivos para la cristalización, pueden controlar de forma muy eficaz y selectiva la fase y la morfología^[40, 41]. Un dendrímero específico tiene la capacidad de estabilizar carbonato de calcio amorfo (CCA) e incluso permitir la coexistencia de dos estados como CCA y calcita. Esta propiedad es característica de los sistemas biológicos donde se estabiliza este estado como reservorio de carbonato de calcio para su uso en posteriores aplicaciones^[42].

Péptidos y poli (aspartato). Se han sintetizado péptidos con estructuras de α hélices con residuos de aspartato similar a los observados en la naturaleza con la finalidad de estudiar su interacción con caras específicas del cristal. El resultado muestra que fue factible obtener crecimientos preferenciales de ciertos planos cristalinos dependiendo de la conformación secundaria del péptido^[43].

El poli aspartato es considerado un análogo de muchas macromoléculas utilizadas por la naturaleza para el control biológico del crecimiento cristalino. El efecto de poli(α ,L-aspartato) y poli(α , β -D,L-aspartato) en solución en bajas concentraciones sobre el crecimiento de carbonato de calcio muestra un gran efecto tanto en la fase como en la morfología. Se observan agregados cristalinos con estructuras helicoidales tanto α como β de vaterita y a mayores concentraciones se puede incluso observar una proporción de carbonato de calcio hexahidratados^[44, 45].

Miscelas y microemulsiones. Partículas de carbonato de calcio han sido preparados en micro emulsiones de agua/aceite a partir de una solución de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y formando una miscela inversa con un surfactante no iónico, hexaetilen glicol dodecil éter, en ciclohexano y posteriormente se burbujeo dióxido de carbono a la solución. El resultado mostró partículas de tamaño uniforme de 6 nm^[46].

Otro ejemplo es la formación de partículas de carbonato de calcio con una morfología de esponjas. El procedimiento fue el de preparar una miscela de dodecil sulfato de sodio/ octano/ y una solución sobresaturada de bicarbonato de calcio la que se dejó evaporar. El producto

obtenido fue partículas de vaterita con una estructura porosa similar a una esponja con un diámetro entre 4 y 16 μm ^[47].

Homopolímeros sintéticos. Homopolímeros no iónicos como el poli (vinil alcohol) estabiliza el polimorfo aragonita^[48, 49], la poliacrilamida, vaterita y aragonita, ^[50] y el poli(*N*-vinilpirrolidona) vaterita ^[51-53]. Polímeros iónicos como el poli (ácido acrílico) estabilizó el polimorfo vaterita y aragonita ^[54, 55]. La ventaja de usar estos polímeros se debe al hecho que es posible conocer y controlar muy bien su peso molecular y por lo tanto estudiar tal variable y su influencia en la cristalización.

Copolímeros en bloque. El uso de copolímeros en bloque hidrofílicos es un efectivo controlador del proceso de cristalización y polimorfo de carbonato de calcio. Estos copolímeros pueden tener distintas estructuras variando el largo de los bloques ^[56]. Además cada uno de estos bloques puede interactuar de forma distinta con la superficie del mineral teniendo, por ejemplo, un bloque con una fuerte interacción y el otro bloque con una interacción débil. Ambos efectos pueden generar una interesante influencia en la cristalización de carbonato de calcio.

El primer trabajo ^[57] sobre el estudio de la influencia de copolímeros en bloque en la cristalización de carbonato de calcio se realizó con el poli (óxido de etileno-*b*-ácido metacrílico) (POE-*b*-PAMA). Un estudio previo de los homopolímeros mostró que el POE no genera ningún efecto en la cristalización del carbonato de calcio y el PAMA es un inhibidor de la cristalización. El POE-*b*-PAMA no induce la cristalización pero produce una fuerte influencia generando cristales alargados y una superficie rugosa lo que sugiere que existe una interacción específica del polímero y el cristal.

Una serie de trabajos se han realizando sobre la influencia de polímeros en bloques en el crecimiento de carbonato de calcio en las que se ha variado los largos de los bloques, el pH, la concentración, la fuerza iónica y el radio de los grupos funcionales. ^[58-63]

Monocapas de Langmuir Un excelente sistema sintético para poder estudiar el control de la nucleación y crecimiento cristalino del carbonato de calcio sobre matrices orgánicas puede ser mediante el uso de monocapas de Langmuir. Estas son monocapas compuestas por cadenas alifáticas largas que en su cabeza puede contener grupos funcionales como ácidos carboxílicos, sulfatos, fosfatos y aminos. Se ha observado que de acuerdo a la estructura del surfactante y su concentración es posible orientar calcitas y vateritas ^[64-68]. Se han logrado mayores controles

sobre la nucleación usando monocapas muy bien definidas. Se ha logrado crecimientos de calcitas orientados en una sola cara. [69-73]

1.4 Biopolímeros

Como se mencionó antes, todos los minerales de origen biológico están asociados con una fracción pequeña de materia orgánica, las que participan activamente en los procesos de mineralización y control de la velocidad de nucleación, el crecimiento, la orientación cristalina (textura), polimorfismo, y la estructura del mineral (morfología). Estos materiales orgánicos, en su mayoría, son macromoléculas, específicamente polisacáridos, que además en algunos casos se encuentran sulfatados y/o carboxilados. [17, 69]

El polisacárido más común encontrado entre las capas de los cristales del nácar es la β -quitina, el poli(β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina). La quitina es el biopolímeros más abundante en la naturaleza después de la celulosa.

Si bien hay algunos trabajos en la cual se utiliza quitina como medio director de la cristalización [74, 75] la baja solubilidad de este biopolímero limita su uso como matriz, por lo que se utiliza su derivado más común, el quitosano (Qui).

1.4.1 Quitosano

El quitosano (Qui) es el producto de la desacetilación de la quitina. El proceso de desacetilación ocurre en solución de hidróxido de sodio al 40% [76]. Cuando el porcentaje de desacetilación es sobre el 50% se denomina quitosano a (poli- β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa) (**Figura 1.4.1**). Quitosano es soluble en soluciones acuosas de ácidos diluidos, por lo que es posible obtener películas y fibras a partir de este biopolímero. [77]

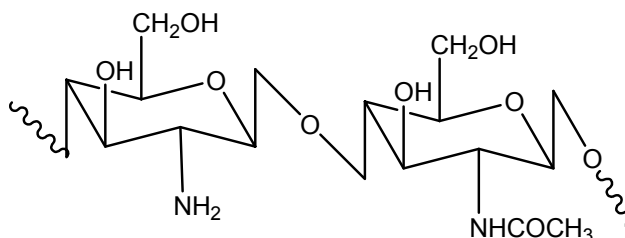


Figura 1.4.1 Estructura del quitosano

En estado sólido es un polímero semicristalino. Se han realizado algunos estudios, y ha sido posible obtener un cristal completamente desacetilado. El Qui fue clasificado por difracción de electrones como ortorrómbico y su celda unitaria es: (P2₁2₁2₁) con a=0,807 nm b= 0,844 nm y c=1,034 nm [78]. El peso molecular del Qui puede ser determinado mediante viscosimetría en solución y usando la relación de Mark-Houwink establecido por M. Rinaudo [79].

Se ha reportado que en presencia de Qui se forman calcitas romboédricas^[80, 81]. La formación de calcita y vaterita en presencia de mezcla de Qui y poli (ácido acrílico) también ha sido reportado [54, 82-84]. En otros estudios la coexistencia de los tres polimorfos de carbonato de calcio ha sido observado variando la relación entre el Qui y el poli (ácido acrílico)^[84, 85]. El cambio de temperatura también ha sido una variable estudiada en estas mezclas, obteniéndose un polimorfo específico en función de la temperatura^[85]. La incorporación de poli (aspartato) en combinación con Mg⁺² y Qui induce a la formación de vaterita en forma columnar^[86]. El carboximetil quitosano estabiliza la calcita y la vaterita pero con una morfología similar a una flor.

Otros Biopolímeros. Muchos de los polisacáridos que existen en la naturaleza son polímeros en bloque y en algunos casos poseen dos o más monómeros glicosídicos. Un ejemplo es el ácido algínico que se obtiene por extracción desde las algas pardas. El ácido algínico está compuesto por bloques de los residuos de ácidos manúrico y gulurónico, (**Figura 1.4.2.**). A pesar de la importancia de este biopolímero en el ámbito de la biomineralización, en donde polisacáridos aniónicos participan como “agente mineralizador” en la formación de la estructura de los cocolitos,^[87] relativamente pocos trabajos han sido reportados sobre el estudio sistemático de la influencia de simples polisacáridos en la cristalización de carbonato de calcio.

Se ha reportado que el alginato de sodio y carboximetil inulina inhiben la cristalización del carbonato de calcio por interacción directa con la superficie de los cristales en crecimiento^[88, 89]. Carboximetil inulina genera partículas esféricas de vaterita en conjunto con calcitas romboédricas. La eficacia de la inhibición de la carboximetil inulina se incrementa con la concentración del polímero. En otros estudios diferentes polimorfos de carbonato de calcio han sido obtenidos con diferentes polisacáridos^[90, 91]. La importancia de la estereoquímica del poli (ácido algínico) y el poli (ácido galacturónico) sobre la cristalización de carbonato de calcio ha sido reportada. Se encontró que el poli (ácido algínico) es más efectivo que el poli (ácido galacturónico) a la misma concentraciones, a pesar de que estos polisacáridos poseen similar número de grupos carboxílicos^[87].

Algunos estudios en polisacáridos sulfatados han sido reportados. Estos trabajos han estado inspirados debido a que se ha observado la presencia de protoglicanos sulfatados en algunos sistemas biomineralizados como la cáscara de huevo ^[90, 91]. κ -carragenato ha demostrado una pequeña influencia sobre el crecimiento del carbonato de calcio ^[92]. La heparina ha demostrado ser capaz de formar cristales de aragonita o calcita con arreglos helicoidales dependiendo de las condiciones experimentales. Ácido hialurónico demostró ser causante de la formación de aglomeraciones columnares de cristales de calcita ^[93] mientras el keratan sulfato produjo aglomeraciones octaédricas de calcita ^[94]. El efecto de la estructura del polisacárido sobre el hábito cristalino de carbonato de calcio no ha sido analizado en estos estudios.

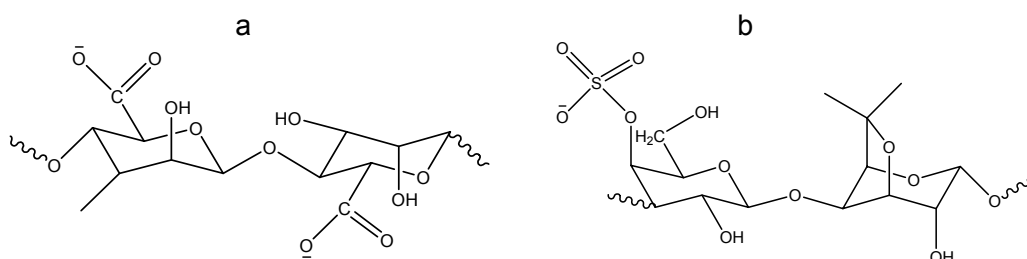


Figura 1.4.2. Estructura de biopolímeros extraídos de algas: a) alginato
b) κ -carragenato

El producto de la hidrólisis del colágeno es lo que se conoce como gelatina. Su estructura está compuesta por proteínas lo que implica un gran número de grupos funcionales. Estas características lo convierten en un buen candidato para ser usado como agente mineralizador en el estudio de la cristalización de CaCO_3 . Se ha reportado que el polimorfo de aragonita puede ser estabilizado usando una mezcla de gelatina y Mg ^[95, 96], mientras la mezcla de gelatina con urea ha generado calcitas triangulares y cilíndricas y vateritas hexagonales ^[97-99].

1.5 Polímeros inorgánicos

El concepto de polímero en general se ha relacionado, casi siempre, con la química orgánica debido a que el átomo principal de su estructura es el carbono. Sin embargo existe una serie de

polímeros en donde la estructura se sustenta en torno a metales. Algunos polímeros inorgánicos han sido sintetizados mediante el método sol-gel ^[100-102].

El método sol-gel se basa en la hidrólisis de alcóxidos metálicos para producir grupos hidroxilo, seguida por la policondensación para generar grupos hidroxilos y grupos alcoxi residuales para formar finalmente una red tridimensional, (**Figura 1.5.3.**)

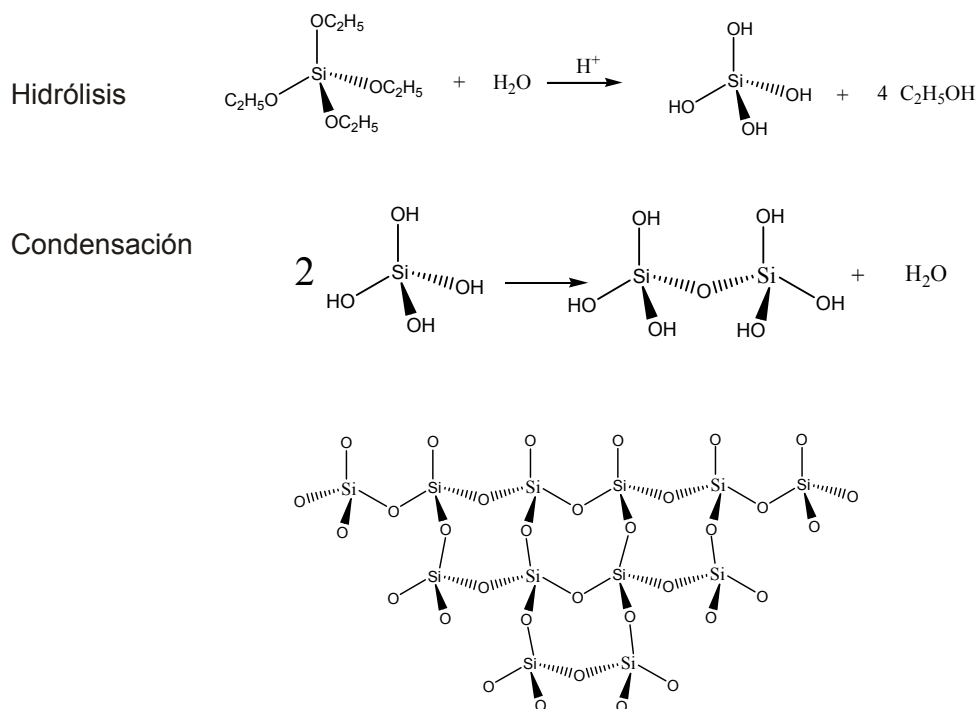


Figura 1.5.3 Representación esquemática del proceso de sol-gel.

Como se puede apreciar en la **Figura 1.5.3**, la hidrólisis completa conduce a una red tridimensional de sílice, sin embargo, se pueden distinguir etapas alternadas de reacciones de hidrólisis y condensación. Controlando las condiciones experimentales de cada etapa, se pueden obtener productos de reacción parcial en que los componentes inorgánicos se encuentran como suspensión de partículas coloidales o como oligómeros. Este estado se conoce como sol y puede servir como precursor de la red de una etapa posterior.

Los precursores del proceso sol-gel generalmente son alcóxidos metálicos monoméricos $\text{M}(\text{OR})_n$, donde M representa un elemento formador de la red tal como Si, Ti, Zr, Al, etc., mientras que R es el grupo alquílico ($\text{C}_x\text{H}_{2x+1}$).

Generalmente, tanto la hidrólisis como la condensación ocurren simultáneamente. Una vez que la hidrólisis es iniciada en presencia de agua, (**Figura 1.5.3**), estos dos procesos generan productos secundarios de bajo peso molecular tales como alcohol y agua. Cuando las especies han alcanzado cierto tamaño, ocurren reacciones de condensación cruzada entre las especies en solución (sol) que conducen a la formación de una red tridimensional, que al dejar solvente atrapado en su interior produce una estructura hinchada llamada gel.

Estas moléculas deben ser removidas del sistema lo cual conlleva a la formación de una red tetraédrica de SiO₂. La remoción de estos subproductos también contribuye a la contracción de la red.

Ambos procesos de hidrólisis y condensación ocurren mediante mecanismos de sustitución nucleofílica que involucran tres pasos: adición nucleofílica, transferencia del protón dentro del estado de transición y remoción de la especie protonada como alcohol o agua. En el caso de los alcóxidos no basados en silicio no se necesita este catalizador ya que son muy reactivos. Sin embargo, las reacciones de hidrólisis y condensación de los alcóxidos de silicios comúnmente se llevan a cabo en presencia de un catalizador ácido o básico. La estructura y morfología de la red resulta dependiente fuertemente del pH de la reacción^[100].

La mayoría de los trabajos relacionados con la mineralización se han enfocado en usar sustratos de carácter orgánicos. Sin embargo, el uso de membranas de polisiloxanos ha demostrado que los materiales inorgánicos pueden ser muy activos en control de la nucleación y el crecimiento cristalino^[103, 104].

1.6 Hipótesis de trabajo

Mediante la biomineralización los seres vivos, bajo condiciones ambientales, controlan la estructura cristalina y la morfología de carbonato de calcio además de estabilizar sus diferentes polimorfos. El proceso de ordenamiento y selección del polimorfo lo realiza el ser vivo cristalizando el CaCO₃ en presencia de agentes ajenos a las componentes de esta sal, como cationes y/o biopolímeros. Se propone entonces que al usar como agente mineralizador el biopolímero quitosano, quitosanos modificados y otros polisacáridos y/o híbridos órgano-inorgánicos en base a quitosano y silica permiten modificar *in vitro* la estructura cristalina y la morfología de carbonato de calcio.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general:

Estudiar la influencia de diferentes biopolímeros, polímeros sintéticos, biopolímeros modificados e híbridos organo-inorgánicos sobre la cristalización de carbonato de calcio.

1.7.2 Objetivos específicos:

- Utilizar diferentes biopolímeros, quitosano, alginato, gelatina o κ -carragenato como directores de cristalización de carbonato de calcio.
- Sintetizar sulfato de quitosano y su utilización como agentes modeladores del hábito cristalino en procesos biomimético de cristalización de carbonato de calcio.
- Utilizar películas de quitosano y mezclas de quitosano con poliacrilamida como matriz directora de cristalización de carbonato de calcio .
- Preparar Películas o geles poliméricos mediante copolimerización por injerto de poliacrilamida y poli (ácido acrílico) en quitosano.
- Obtener películas híbridas órgano-inorgánicas, empleando como componente orgánico quitosano y componentes inorgánicos basados en soles de siloxanos preparados por el método sol-gel.

Capítulo II

Parte Experimental

2.1. Materiales

Los reactivos utilizados aparecen resumidos en la tabla 2.; los mismos se adquirieron comercialmente.

Tabla 2. Reactivos empleados

Solventes y Reactivos	Laboratorio	Pureza
Quitosano	Sigma-Aldrich	p.a. Peso molecular promedio viscosimétrico Mv=353.000*
Ácido Sulfúrico	Riedel-de häen	95-97%, p.a.
Éter etílico	Merck	p.a.
Hidróxido de sodio	Merck	p.a
Bromuro de potasio	Merck	p.a
Acido Acético	Merck	Glacial 99.8%
Persulfato de potasio	Sigma-Aldrich	p.a.
Acrilamida	Aldrich	97%
Acido Acrílico	Aldrich	
N,N'-Metilénbisacrilamida		
Acetona	Merck	p.a
Tetraetilortosilicato	Sigma Aldrich	98%
(3-aminopropil)triethylsilano	Sigma Aldrich	p.a
Cloruro de Calcio	Merck	p.a
Acetato de Calcio	Merck	p.a.
Bicarbonato de Amonio	Merck	p.a.
Hidroximetilaminometano	Merck	>99%

* Determinado por medidas de viscosidad en solución diluida según el método propuesto por M. Rinaudo et. al. ^[79]

2.2. Purificación de quitosano

Se disolvió el Quitosano (Qui) en una solución de ácido acético al 2% v/v y se dejó con agitación durante un periodo de aproximadamente de 24 horas hasta obtener una solución homogénea. Esta solución fue filtrada al vacío con una frita número 3 para eliminar los microgeles formados. Posteriormente al filtrado se le adiciona NH_4OH concentrado. El precipitado obtenido es separado por centrifugación y secado a temperatura ambiente hasta peso constante.

2.2.1. Solución de quitosano

Se disolvió 1 g de Qui purificado en 100 mL de ácido acético al 2 % (v/v) hasta formar una solución homogénea. Con esto se obtuvo una solución al 1% (p/v). Las soluciones al 4% se prepararon de la misma manera.

2.3. Soluciones de κ -carragenato

Se disolvió 1 g de κ -carragenato (Car) en 100 mL de agua con agitación continua en un baño a 60 °C hasta obtener una solución homogénea. Con esto se obtuvo una solución al 1% (p/v). Las soluciones al 4% se prepararon de la misma manera.

2.4. Soluciones de alginato

Se disolvió 1 g de alginato (Alg) en 100 mL de agua con agitación continua hasta formar una solución homogénea. Con esto se obtuvo una solución al 1% (p/v). Las soluciones al 4% se prepararon de la misma manera.

2.5. Síntesis de sulfato de quitosano (QuiS)

Se pesaron 5g de Qui y se mezclaron con ácido sulfúrico concentrado por tres horas, con agitación constante, hasta obtener una solución viscosa y luego se precipitó con éter etílico frío. El precipitado se neutralizó con hidróxido de sodio al 30% p/v.^[76]

La solución neutralizada fue dializada en agua destilada por 72 horas hasta eliminar el sulfato de sodio que se produjo durante la reacción. El sulfato de quitosano purificado se obtuvo removiendo el agua por destilación a presión reducida. Durante el proceso de diálisis se generó un precipitado sobre la membrana. Este producto (R1) y el sulfato de quitosano se caracterizaron por FTIR.

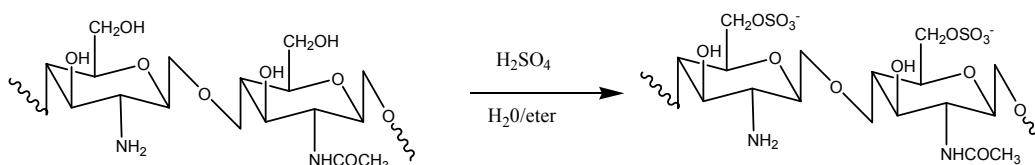


Figura 2.5.1. Reacción de sulfatación de quitosano.

2.6. Modificación de quitosano mediante reacciones de injerto de monómeros vinílicos

Se disolvió 1 g de Qui purificado en 40 mL de ácido acético al 2% v/v en un tubo de polimerización. Paralelamente se preparó 40 mL de una solución de los monómeros, 2,4 g de acrilamida o 3,3 g de ácido acrílico, N,N-metilen-bis-acrilamida (BIA) (0,25 % p/p con respecto al monómero) en ácido acético al 2% v/v que contiene como entrecruzador y persulfato de potasio como iniciador utilizado en dos concentraciones diferentes 1×10^{-2} y 2×10^{-2} molar (M).^[105]

Ambas soluciones se mezclaron y se polimerizaron en un baño termostático a 60 °C por una hora. Posteriormente las soluciones se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se precipitaron con acetona.

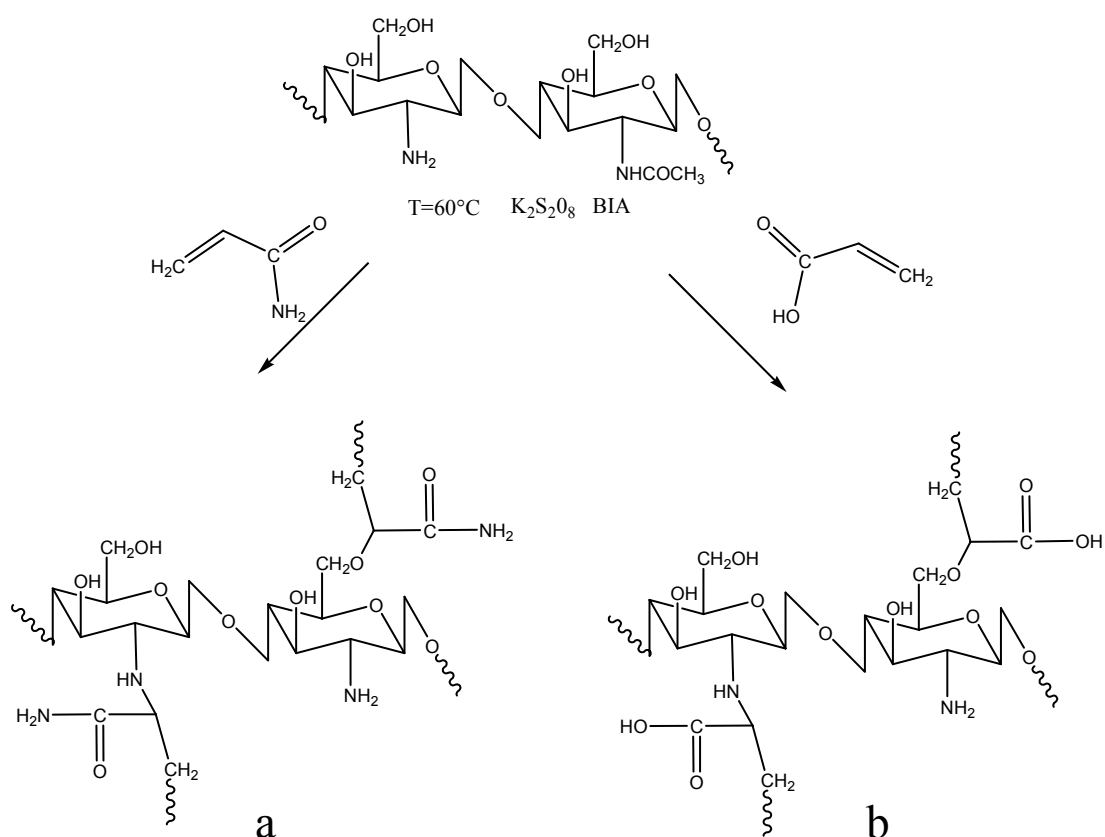


Figura 2.5.2. Representación esquemática de la reacción de modificación de quitosano por injerto: a) quitosano injertado con poliácridamida (Qui-g-PAAM); b) quitosano injertado con poli(ácido acrílico) (Qui-g-PAA).

2.6.1. Purificación de quitosano injertado

La reacción de modificación de Qui genera productos secundarios, por esta razón es necesario purificar el producto obtenido para poder determinar los parámetros de injerto.

Esto se realizó por un proceso de extracción en medio acuoso, que consistió en introducir dentro de sobres de papel filtro el producto obtenido y colocarlos en recipientes de agua destilada, con agitación continua, a modo de diálisis, por un periodo de 4 días con cambio de agua diario y de esta manera asegurar que cualquier impureza soluble en agua, incluido el homopolímero, sea extraído de la muestra.

Posteriormente el producto fue secado al vacío a una temperatura de 60 °C hasta peso constante para posteriormente determinar los parámetros del injerto por gravimetría.^[105]

2.6.2. Parámetros del injerto

Los parámetros de injertos son los valores que nos dan cuenta como ocurrió la reacción. Estos valores para este caso se determinaron por gravimetría de los productos purificados.^[105] Cada uno se calculo según las siguientes relaciones:

Fracción de substrato injertado o contenido de injerto (%G).

$$G\% = [(m_2 - m_1) * 100] / m_2 \quad (2.1)$$

Eficiencia de injerto (%E)

$$E\% = [(m_2 - m_1) * 100] / m_3 \quad (2.2)$$

Razón entre la longitud de la cadena lateral injertada y la longitud de la cadena del substrato (R)

$$R = [(m_2 - m_1) * M_s] / (M_m * m_1) \quad (2.3)$$

Donde: m_1 = masa del substrato a injertar (para fines de interpretación de resultados, conviene que sea la masa del substrato luego de ser sometido a todas las condiciones de operación), m_2 = masa de substrato injertado luego de extracción, m_3 = masa de monómero, M_s = masa molar de la unidad repetitiva del substrato a injertar, M_m = masa molar de la unidad de monómero injertado.

2.7. Preparación de sol precursor de sílice

En un embudo de adición se introduce 10 mL de etanol y 0,9 mL de ácido clorhídrico diluido (0,83mL de ácido concentrado al 37% disueltos en 17,5 mL de agua destilada).

Esta solución se agrega gota a gota con agitación constante a un balón de 250 mL que contiene 0,5 moles de tetraetilortosilicato (TEOS) o (3-aminopropil) trietilensilano (APS) disueltos en 10 mL de etanol. Luego se coloca la solución en un baño termoregulado a 60 °C por 24 horas. El sol obtenido se utiliza inmediatamente o se conserva a 0 °C.^[106]

2.8. Preparación de híbridos organo-inorgánicos

Los híbridos organo - inorgánicos fueron obtenidas a partir de quitosano y/o sulfato de quitosano como fase orgánica y un sol precursor inorgánico, TEOS o APS, en medio ácido, con el fin de lograr la compatibilización de ambas fases. Para usar estos híbridos como agente mineralizador en el estudio de la cristalización de carbonato de calcio, fue necesario adicionar una cantidad determinada de acetato de calcio como fuente de iones Ca^{2+} .

Se obtuvieron películas a partir de los híbridos organo - inorgánicos mediante el método de vaciado *gel-casting* al depositar soluciones de diferentes composiciones sobre una película de poli (cloruro de vinilo) (PVC) en cápsulas Petri y posterior secado.

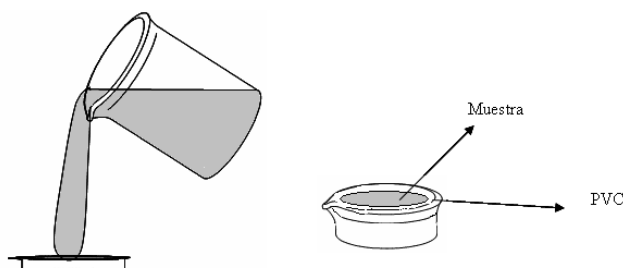


Figura 2.8.1. Esquema de preparación de películas por el método de *gel-casting*.

2.9. Métodos de cristalización

El proceso de cristalización se basa en la reacción de los iones calcio con el dióxido de carbono (CO_2) proveniente de la descomposición del bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), dando como resultado el carbonato de calcio (CaCO_3).



Figura 2.9.1 Reacción de descomposición de $(NH_4)HCO_3$ [105]

2.9.1. Método de cristalización I

Se toman entre 3 y 7 mg de cada injerto y se colocan dentro de un *micro-bridge* el cual contiene 35 μ L de una solución de Cloruro de Calcio 0,2 M con una solución tampón a pH 9. Luego se coloca en una cámara de cristalización, **Figura 2.9.2**. En la parte inferior de la cámara se coloca 3 mL de una solución de bicarbonato de amonio 0,025 M. a 25 °C por periodos de 24 y 48 horas. [105]

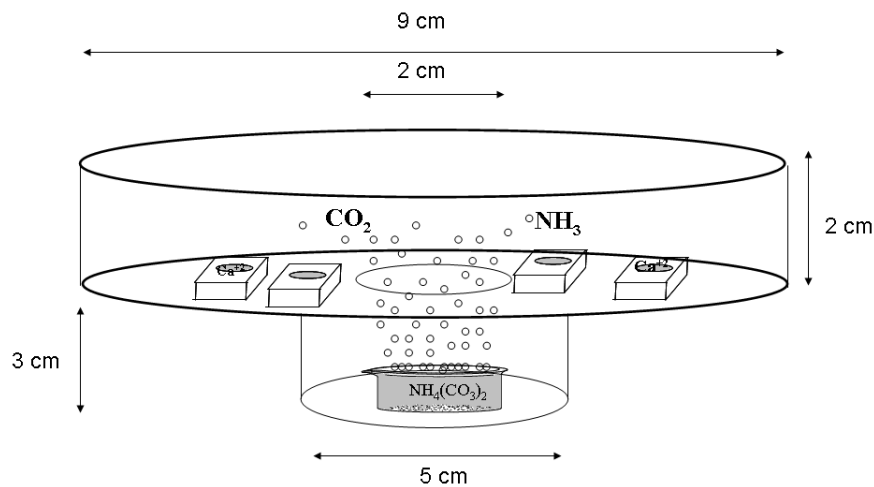


Figura 2.9.2. Esquema de la cámara de cristalización de carbonato de calcio usado para el Método de cristalización I.

2.9.2. Método de cristalización II

Las soluciones con distintas composiciones molares de Qui con los precursores de silicio y/o homopolímeros que tienen incorporado el ión calcio en su matriz se colocan en una desecadora en un ambiente de CO_2 proveniente de la descomposición de NH_4HCO_3 en estado sólido.

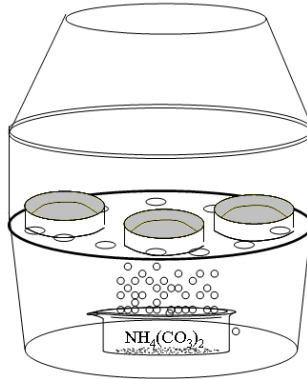


Figura 2.9.3. Esquema de la cámara de cristalización de carbonato de calcio usado para el método de cristalización II.

2.9.3. Método de cristalización III

Se toman 2 m L de cada una de las soluciones de biopolímeros (Qui, Alg y Carr) y se colocan en placas de petri. Estas placas se introducen en un equipo de *spin-coating*, Figura 2.9.4. Se adiciona gota a gota 2 mL de una solución de calcio 1M en una solución tampón a pH 9 sobre la placa que contiene el biopolímero mientras se hacen girar a 500 revoluciones por minuto. Después las placas de petri se introducen en una desecadora con CO_2 (Método II) por periodos de 1, 2, 4, 6, 8 24 y/o 48 horas.

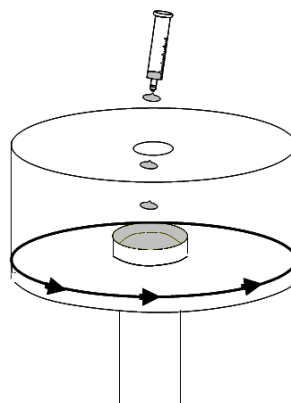


Figura 2.9.4. Esquema equipo de *spin-coating* utilizado para el Método de cristalización III.^[107]

2.10. Equipos

2.10.1. Espectrofotómetro FTIR

Los espectros infrarrojos se registran en un espectrofotómetro FTIR Bruker modelo Vector 22 acoplado a un computador con el programa OPUS para el procesamiento de los datos. Las muestras se preparan en forma de pastillas con KBr al 2% (p/p).

Los espectros se obtienen en el rango de 4000 a 350 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

2.10.2. Microscopio electrónico de barrido (SEM)

Las diferentes muestras fueron puestas en porta muestra convencionales y se recubrieron con una capa de oro al vacío en una cámara dispersora EMS 550.

Posteriormente las muestras fueron observadas usando los microscopios electrónico de barrido Tesla BS 343, Zeiss DSM 960 y el FE-SEM FEI Nova NanoSEM 230

2.10.3. Difractómetro de rayos X (DRX)

Los patrones de difracción de rayos X de los cristales de CaCO_3 fueron obtenidos usando los difractómetros Brucker Advance D8 y Siemens D-5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$ (40 KV y 30 mA) provisto de un monocromador de grafito de $1,5418 \text{ \AA}$ a 298 K.

Las intensidades relativas analizadas fueron en el rango de dispersión (2θ) de 10° a 60° . Se utilizó un portamuestra convencional para estos análisis de DRX.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Estudio de cristalización de CaCO_3 usando diferentes biopolímeros como agente mineralizador

Se ha demostrado que la participación de algunos biopolímeros en los procesos de biomineralización es fundamental. Su rol en la nucleación, sobresaturación y determinación de un polimorfo específico ha sido estudiado [74, 108]. Esta capacidad se debe a los grupos funcionales que posee cada biopolímero [109].

Se utilizó diferentes biopolímeros como agente mineralizador con el fin de estudiar sus efectos sobre la cristalización, orientación de los cristales, diferentes polimorfos y morfologías de los cristales de carbonato de calcio (CaCO_3). Los biopolímeros utilizados en forma de película fueron quitosano, Gelatina, alginato y κ -carragenato. Además, se prepararon matrices liofilizadas a partir de quitosano, alginato, κ -carragenato y mezclas de quitosano con alginato. También se utilizaron mezclas de quitosano con poliacrilamida, sulfato de quitosano, híbridos organo-inorgánico a base de quitosano y silica y quitosano injertado con poliacrilamida o poli (ácido acrílico).

3.1.1. Estudio de cristalización de CaCO_3 usando gelatina

La Gelatina (G) está constituida por una secuencia de diferentes aminoácidos, por lo que contiene grupos funcionales aminos y carboxílos. La composición de la gelatina se presenta en la **Figura 3.1.1 a**.

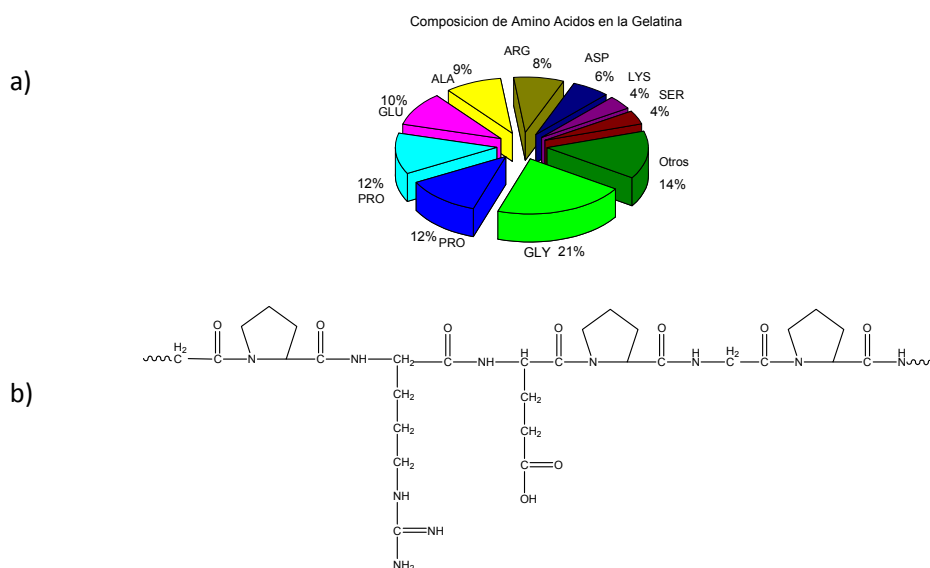


Figura 3.1.1. a) Contenido relativo de aminoácidos en la gelatina y b) un segmento de la estructura de la gelatina.

Se prepararon soluciones de gelatina al 1% (G1%) y al 4% (G4%) y se mineralizaron por Método III (Spin - Coating) por periodos de 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas.

El análisis de DRX y SEM muestra que para ambas concentraciones y al cabo de 1 y 2 horas de cristalización (**Figuras 3.1.2. y 3.1.3 respectivamente**) el polimorfo formado es calcita ya que presenta la señal a $29,5^{\circ}2\theta$ característica del plano $\{104\}$ de esta fase. Además se puede observar una señal ancha en $26^{\circ}2\theta$. La forma de este tipo de señal es indicio de un estado amorfo, el que puede ser atribuido tanto al biopolímero como a un posible estado de transición de CaCO_3 . Si bien esto último es muy difícil de pesquisar, la micrografía de los cristales formados en presencia de G4% y a 1 hora de cristalización (**Figura 3.1.4 a**) muestra estructuras con orificios centrales, lo cual podría deberse a carbonato de calcio amorfo ^[110].

A 4 horas de cristalización la señal $32,7^{\circ} 2\theta$ (**Figura 3.1.2**), señal identificada con el plano $\{024\}$ de vaterita, lo que se corrobora con lo observado en la micrografía de G1% a 4 horas (**Figura 3.1.3 b**) en la que se observan partículas de CaCO_3 de forma esférica $< 5\mu\text{m}$ congruentes con este polimorfo ^[111].

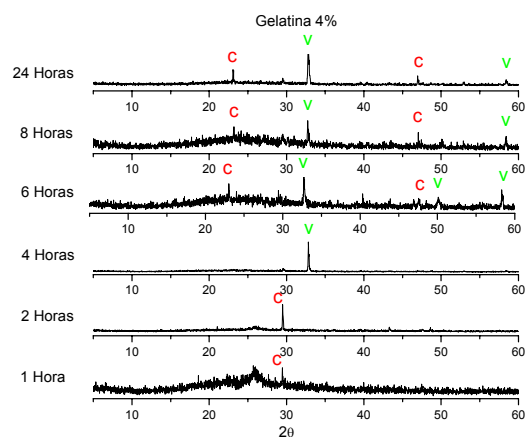


Figura 3.1.2. Patrón de difracción de rayos X para los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando G1% como agente mineralizador. C= calcita y V= vaterita.

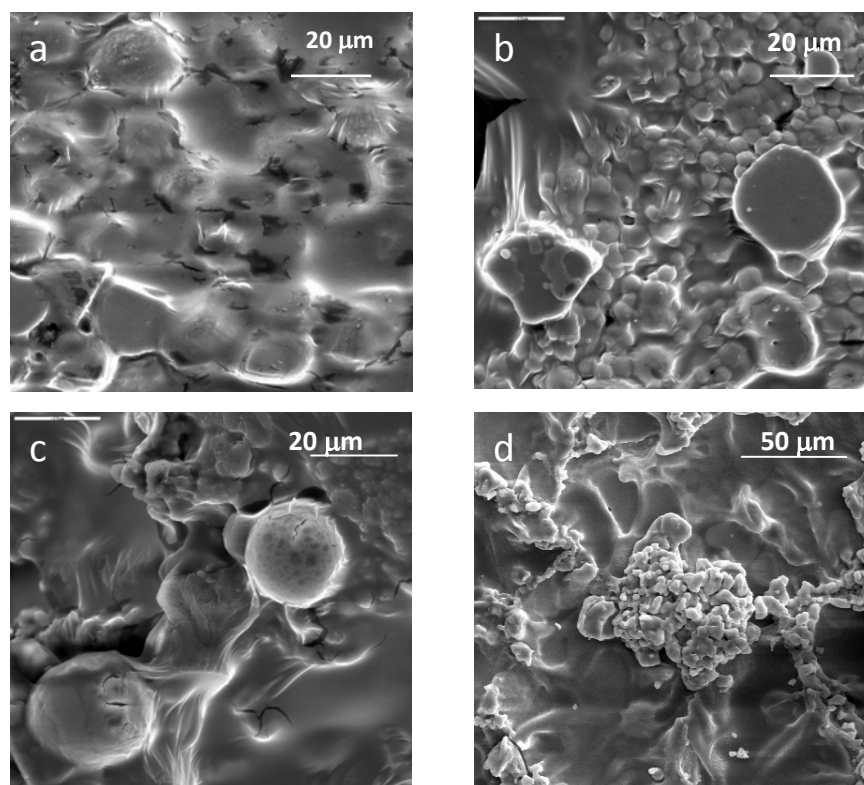


Figura 3.1.3. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando G1% como agente mineralizador: a) 1 hora; b) 4 horas; c) 6 horas y d) 8 horas.

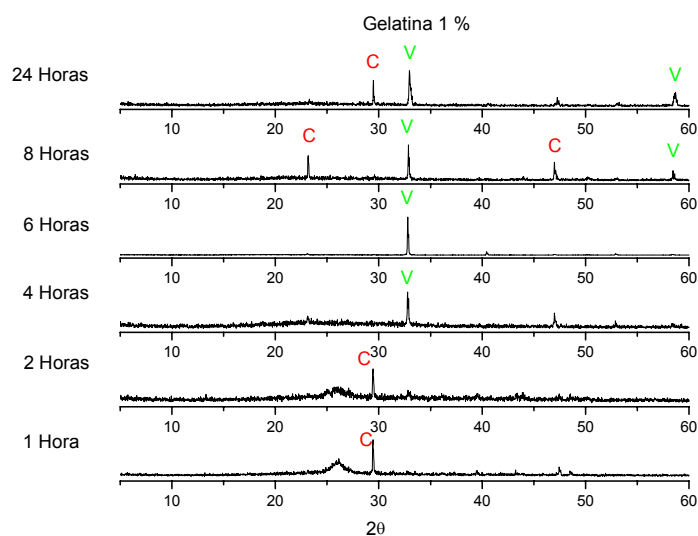


Figura 3.1.4. Patrón de difracción de rayo X para los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y al usar gelatina al 4% (G4%) como agente mineralizador. C=calcita y V= vaterita

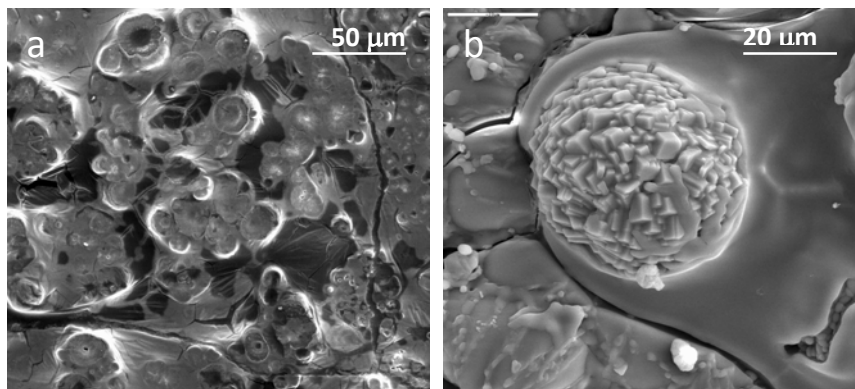


Figura 3.1.5. Micrografías SEM de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando gelatina al 4% como agente mineralizador: a) 1 hora y b) 6 horas.

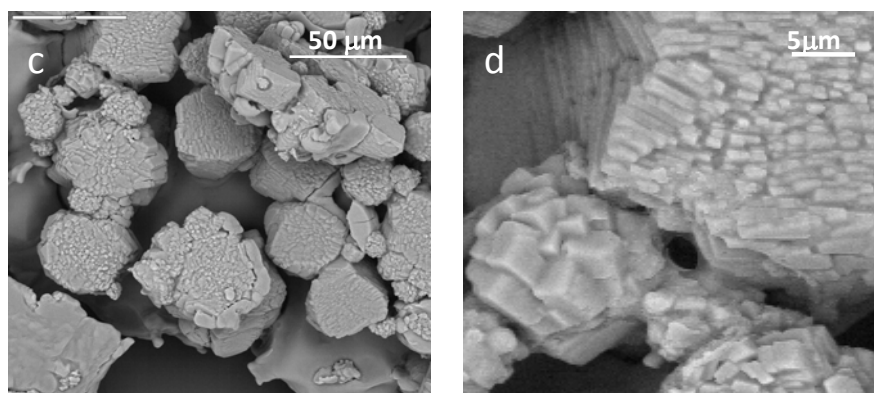


Figura 3.1.6. Micrograffias SEM de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización y usando gelatina al 4% como agente mineralizador: c) escala 50 μm y d) escala 5 μm .

Si bien hasta el momento los cristales obtenidos para ambas soluciones son prácticamente los mismos a partir de las 6 horas, (**Figura 3.1.5 b**), esto cambia pues al observar las micrograffias a distintas concentraciones, se observa que al 1% los cristales son esféricos y lisos característico del polimorfo vaterita pero para la solución concentrada se observa aglomeraciones esféricas formadas por calcitas lo que está en concordancia con lo registrado en la DRX para estos tiempos de cristalización y para G1% la señal de vaterita se mantiene al igual que en el caso de la solución de G4%. Sin embargo, a esta concentración aparecen señales de calcita $23^\circ 2\theta$ y $47^\circ 2\theta$ que corresponden a los planos $\{012\}$ y $\{024\}$ de este polimorfo.

También la coexistencia de ambos polimorfos se observa con G1% pero a partir de 8 horas; a este tiempo se identifican las señales de los planos $\{012\}$ y $\{024\}$ de calcita cuyas intensidades disminuyen dramáticamente a 24 horas en cambio aparece un importante incremento de la señal en $29,5 2\theta$ característica del plano $\{104\}$ de calcita. Esta diferencia en las intensidades de dos planos distintos de la calcita podría deberse a un cambio en la orientación de la calcita en función del tiempo. (**Figura 3.1.2**).

Para G4% a partir de 6 horas (**Figura 3.1.5 b**), se observan las mismas señales para los planos {012} y {024} de calcita que en G1% pero a diferencia del caso anterior estas se mantienen a través del tiempo.

Probablemente la alta concentración de este sustrato impide la movilidad de cargas lo que impediría una posible reorientación del cristal.

La micrografía de G4% a 24 horas de cristalización (**Figura 3.1.6**) muestran una zona donde es posible identificar algunos restos de las aglomeraciones esféricas anteriormente observadas a 6 horas de cristalización (**Figura 3.1.5 b**), pero además otro tipo de aglomeraciones formadas por cristales laminares cuyas láminas tienen un espesor aproximado de $1,5 \mu\text{m}$. Esta estructura llama la atención por su semejanza al ordenamiento que posee el nácar.

Además del ordenamiento observado a nivel micrométrico, también se observa un tipo de estructura milimétrica en la **Figura 3.1.7**. Esta micrografía se obtuvo por microscopía óptica para G4% a 8 horas de cristalización.

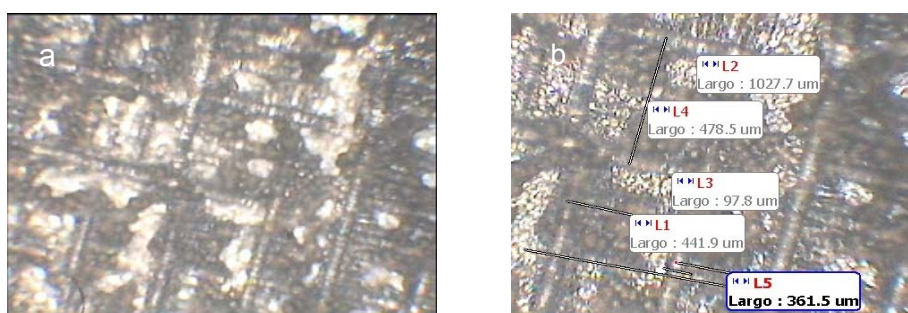


Figura 3.1.7. Micrografía de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando como agente mineralizador G4% a 8 horas cristalización: a) ordenamiento de CaCO_3 a través de la película y b) la distancia entre las aglomeraciones.

En estas micrografías se distinguen con claridad el entramado formado por columnas de CaCO_3 .

Las condiciones dinámicas en la cual se realiza la mezcla de la gelatina y el cloruro de calcio podría explicar la orientación a nivel milimétrica, situación anteriormente observada pero en un sistema de un policomplejo.^[112]

Tabla 3. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de la Gelatina como agente mineralizador y utilizando el método de *spin-coating*. (C=calcita, V=vaterita)

Concentración de la Solución de Gelatina P/V (%)	Tiempo de Cristalización (Horas)	Morfología y polimorfos	Conclusiones
1	6	Esferas lisas V	Se estabiliza V en función del tiempo
1	8	Esferas lisas V	
4	6	Aglomerados esféricos con superficie de C	Inicialmente C con el tiempo se estabiliza V
4	8	Aglomerados esféricos con superficies de estructuras romboédricas C y V lisas	Reorientación de C aglomerados de V a nivel micrométrico
4	24	Aglomerados laminares de C tipo nácar	

3.1.2. Estudio de cristalización de CaCO_3 usando κ -carragenato

El nombre carragenato es un término utilizado para los polisacáridos obtenidos por extracción alcalina de las algas rojas de la clase *Rhodophyceae* en la mayoría de los casos del género *Chondrus*, *Eucheuma*, *Gigartina* y *Iridaea*.^[113]

Carragenato son polímeros lineales que están formados por 25000 unidades de derivados de la galactosa en estructuras irregulares e imprecisas, lo que es dependiente del proceso de extracción^[113]. Por esta razón es posible encontrar más de una estructura, las que se identifican con una letra griega como prefijo, como son: ι -carragenato, μ -carragenato, ν -carragenato, κ -carragenato entre otras. Cada una de estas estructuras se diferencia por su relación carga por unidad monomérica y la posición en la que se encuentra el grupo sulfato. El más común es el κ -carragenato cuya estructura es (1 \rightarrow 3)- β -D-galactopiranososa-4-sulfato-(1 \rightarrow 4)-3,6-anhidro- α -D-galactopiranososa-(1 \rightarrow 3) (**Figura 3.1.8**).

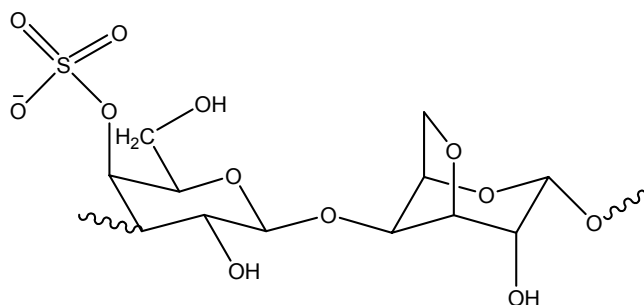


Figura 3.1.8. Estructura de κ -carragenato.

El gran número de grupos aniónicos que posee el κ -carragenato y la capacidad de formar geles con una estructura helicoidal en presencia de cationes, lo transforma en un muy buen candidato como sustrato de biomineralización.

Para el estudio de biomineralización se prepararon soluciones de κ -carragenato al 1% (Carr1%) y al 4% (Carr4%) y se utilizó el método II de cristalización por periodos de 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas. Los patrones de difracción de rayos X muestran la coexistencia de dos de los

polimorfos de carbonato de calcio (calcita y vaterita) para todos los tiempos de cristalización y con un aumento en las intensidades a través del tiempo (**Figuras 3.1.9 y 3.1.10**).

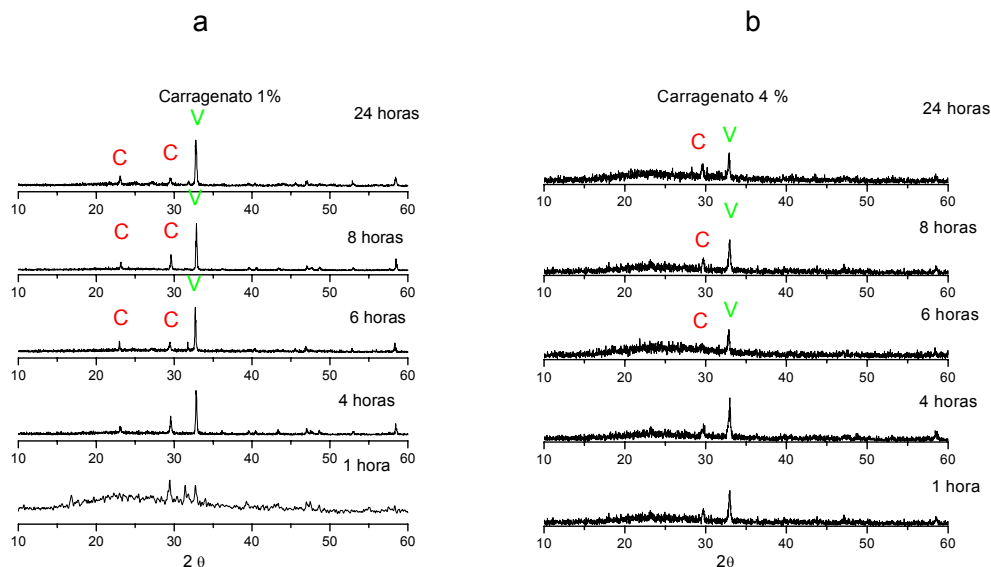


Figura 3.1.9. Patrones de difracción de rayos X de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando κ -carragenato como agente mineralizador y para diferentes tiempos de cristalización: a) Carr1% y b) Carr4%. C= calcita y V= vaterita.

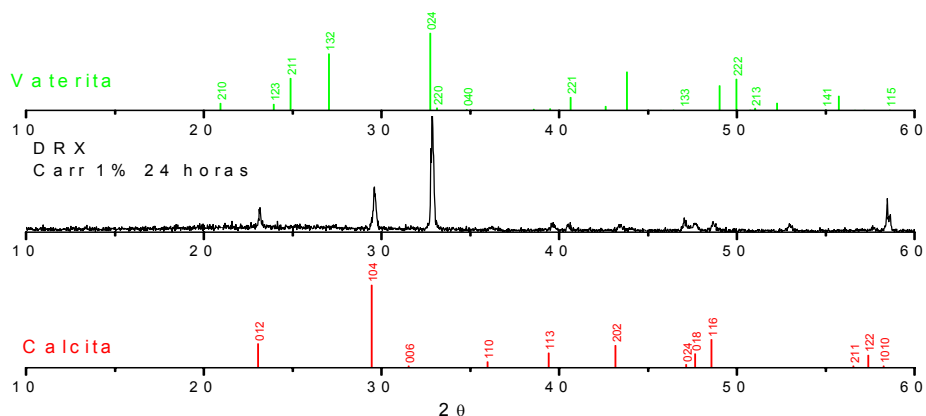


Figura 3.1.10. Patrón de difracción de rayos X de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando Carr1% como agente mineralizador a 24 horas de cristalización y comparación con patrones estándar de Calcita y Vaterita.

Si bien los patrones de DRX para ambas concentraciones de κ -carragenato son similares (**Figura 3.1.9**) los cristales obtenidos son muy diferentes. En el caso de Carr1% todas las estructuras son aglomeraciones esféricas de tamaño aprox. de 20 μm (**Figura 3.1.11 a**) cuya superficie esta formada por pequeños cristales romboédricos. A 6 horas de cristalización es posible observar entre estas estructuras otras de menor tamaño formadas por laminas de cristales, probablemente calcita, ordenadas concéntricamente alrededor de una depresión (**Figura 3.1.11b**). Esta depresión puede ser resultado de un proceso de transición de vaterita a calcita,^[110] A 24 horas de cristalización sólo se observan las aglomeraciones esféricas aunque en algunas zonas es posible identificar estructuras con un ordenamiento helicoidal formados por cristales de calcita de espesor nanométrico (**Figuras 3.1.11 c y d**).

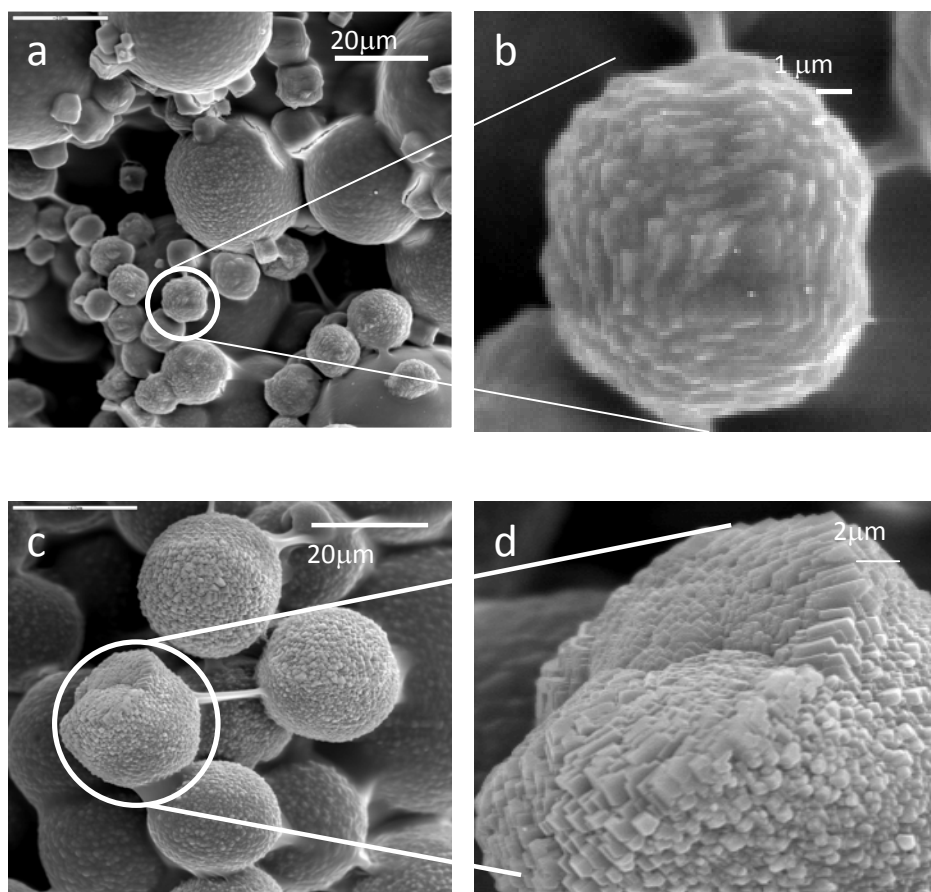


Figura 3.1.11. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos usando Carr1% como agente mineralizador para diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) ampliación a 6 horas; c) 24 horas y d) ampliación a 24 horas.

A la concentración más alta de κ -carragenato (Carr4%) ya no es posible observar las estructuras esféricas formadas por cristales prismáticos. En su reemplazo se observan cristales de una morfología vermiforme a las 4 horas de cristalización (**Figuras 3.1.12 a y b**).

Estas estructuras crecen en algunos casos alrededor de huecos semejantes a unas especies de tubos (**Figura 3.1.12 c y d**). A 6 horas de cristalización se observa una estructura semejante a un rompecabezas compuesta de cristales de un tamaño menor a 2 μm .

En la **Figura 3.1.12 c** se observa en detalle los posibles cristales iniciadores de estas estructuras los que en algunos casos poseen un tamaño aprox. de 100 nanómetros (**Figura 3.1.12 d**). Además, se observan estructuras con un crecimiento columnar. Estas estructuras acentúan su forma definiéndose aun más en las muestras obtenidas a 24 horas de cristalización.

Como se mencionó anteriormente, los datos de DRX (**Figura 3.1.9**), muestran que coexisten los polimorfos calcita y vaterita para ambas concentraciones de κ -carragenato, lo que es solamente posible de distinguir para el caso de la concentración baja de este biopolímero.

En la superficie de la estructura esférica se pueden distinguir los cristales romboédricos correspondientes a calcita. La parte interior de esta estructura está formada por cristales de carbonato de calcio correspondiente a vaterita ^[110], situación contraria a lo que ocurre para el producto obtenido para la concentración más alta donde no es factible identificar en ninguna de las estructuras algún plano prismático que nos pudiera dar indicios de la presencia de calcita.

La señal asociada a la calcita para el sustrato Carr4% es ancha y de muy baja intensidad (**Figura 3.1.9 b**), lo que estaría en concordancia con un tamaño muy pequeño y baja concentración de estos cristales. Por esta razón no es posible identificar visualmente este tipo de fase por SEM.

Es posible explicar el ordenamiento columnar obtenido al utilizar κ -carragenato como agente mineralizador considerando la configuración de doble hélice que adquiere el biopolímero en presencia de los iones de calcio. Esta estructura de doble hélice orientaría posteriormente el crecimiento de cristales del carbonato de calcio en forma de columnas.

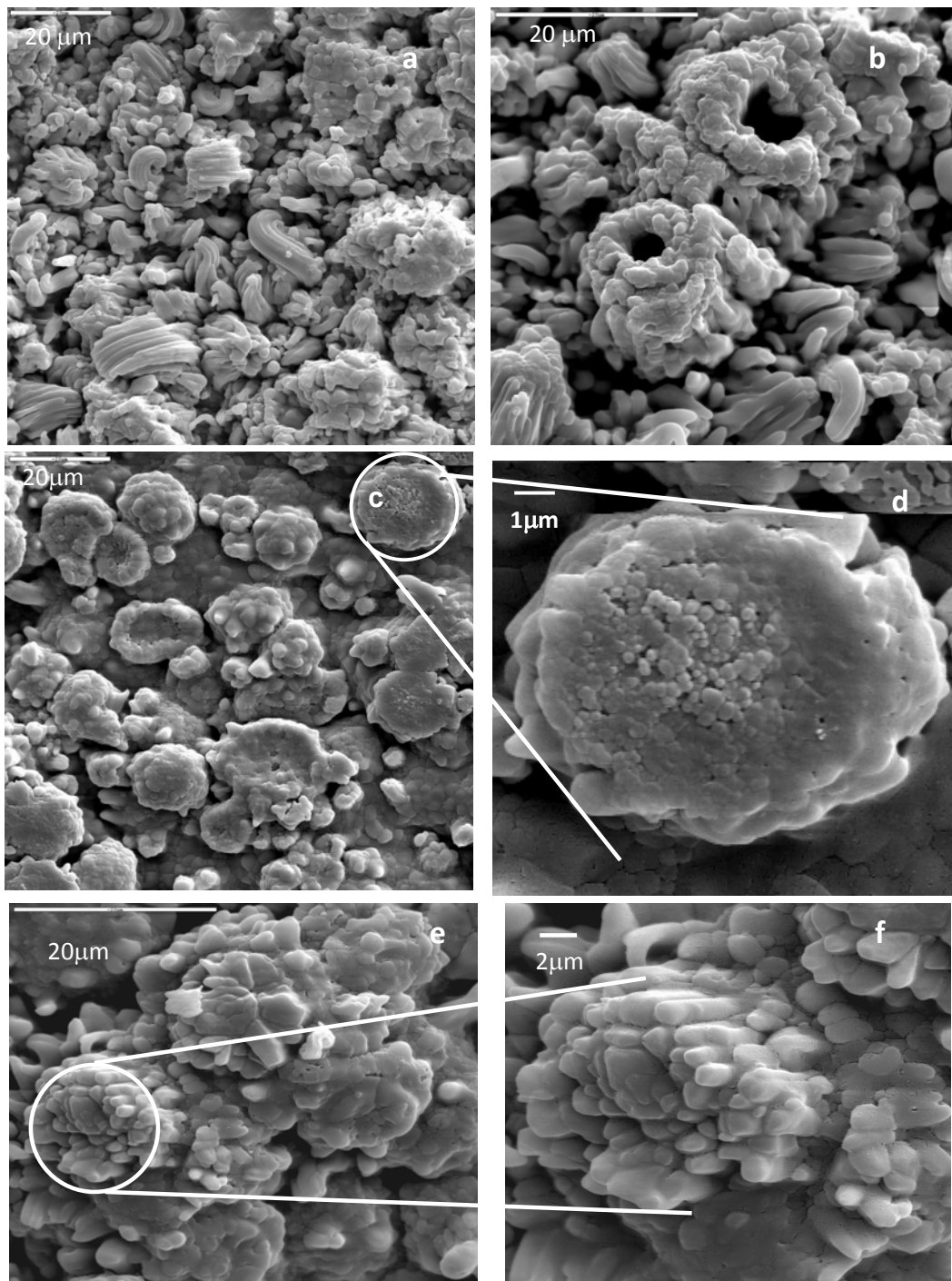


Figura 3.1.12. Micrografía de cristales de carbonato de calcio usando la solución de κ -carragenato al 4% como agente mineralizador y para diferentes tiempos de cristalización: a) y b) 4 horas; c) y d) 6 horas; e) y f) 8 horas.

Tabla 4. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de κ -Carragenato como agente mineralizador y utilizando el método de *spin-coating*. (C=calcita, V=vaterita)

Concentración de la Solución de κ -Carragenato P/V (%)	Tiempo de Cristalización (Horas)	Morfología y polimorfos	Conclusiones
1	6	Aglomeraciones esféricas de V de 5 μm con superficie de C	Predomina V pero se observa también C
1	24	Estructuras esféricas de V de 20 μm con superficie de C	
4	4	Cristales vermiforme de V (300 nm – 2 μm)	Supersaturación superficial de Ca^{+2} lleva a la formación de V
4	6	Aglomerados de V tipo rompecabezas V	
4	8	Aglomerados Columnares	

3.1.3. Estudio de cristalización de CaCO_3 usando alginato

Los alginatos son extraídos de las algas pardas (*Phaeophyceae*). Estos son polímeros lineales que contienen residuos de β -(1→4)- D-Acido Manurónico (M) y α -(1→4)- L- Acido Gulunórico (G) y (Figura 3.1.13).

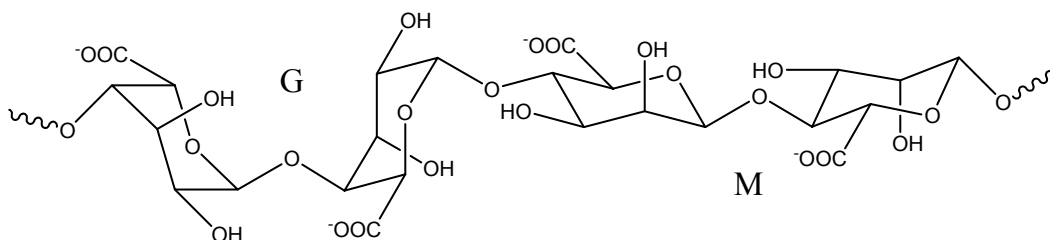


Figura 3.1.13. Segmento de la estructura de Alginato en la que se observa los residuos de L-Acido Gulunórico y D-Acido Manurónico.

Los alginatos no son copolímeros al azar. Esto depende del origen de la alga y se encuentran como una estructura en bloque de MMMMMM y GGGGGG y/o alternante GMGMGMGM. Cada estructura tiene una conformación y comportamiento diferente. Por ejemplo, la relación M/G en alginato obtenido de *Macrocystis pyrifera* es alrededor de 1,6 y para la *Laminaria hyperborea* es cercana a 0,45. Los alginatos son obtenidos de una u otra fuente para satisfacer una determinada aplicación. Sus pesos moleculares promedios se encuentra en un rango desde 50 a 10^5 [113].

El alginato se gelifica en presencia de iones de Ca^{+2} debido a la interacción de estos iones con los grupos funcionales carboxilos y la estructura resultante se conoce como la de “caja de huevos” [113] (Figura 3.1.14).

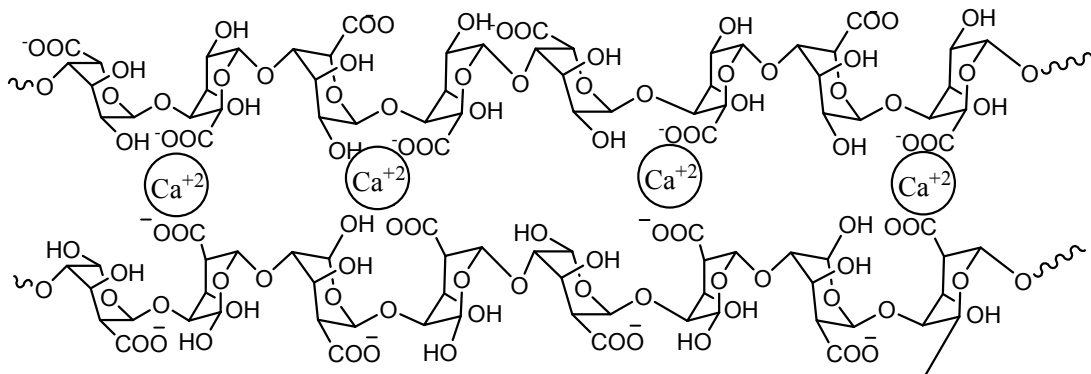


Figura 3.1.14. Esquema representativo de la estructura tipo “caja de huevo” de alginato en presencia de iones de Ca^{+2} .

La estructura que adquiere el alginato esta lejos de ser plana, donde las dos cadenas forman una hélice cuyo eje central esta formado por calcio (**Figura 3.1.15**).

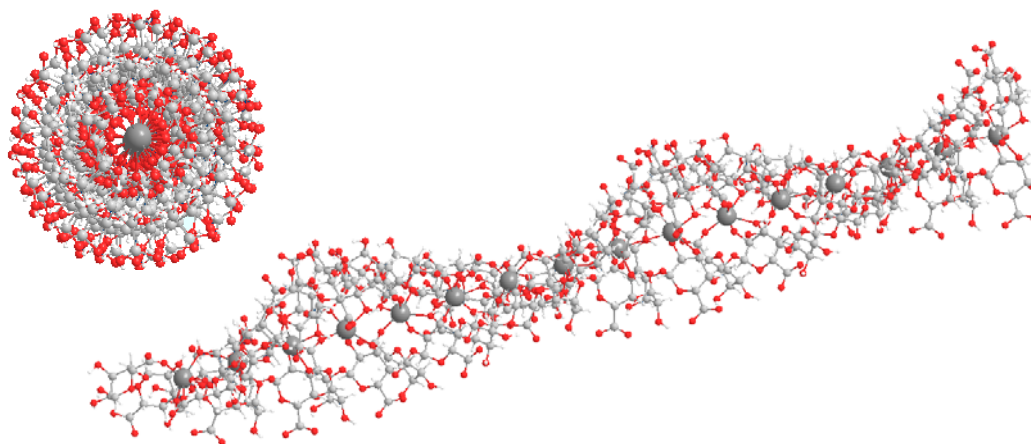


Figura 3.1.15. Conformación de tipo hélice que adquiere el alginato en presencia de iones de Ca^{+2} .

Para el estudio de cristalización de carbonato de calcio, en presencia de alginato como agente mineralizador, se prepararon soluciones de alginato al 1% (Alg1%) y al 4% (Alg4%) y se llevó a cabo la cristalización por el método III.

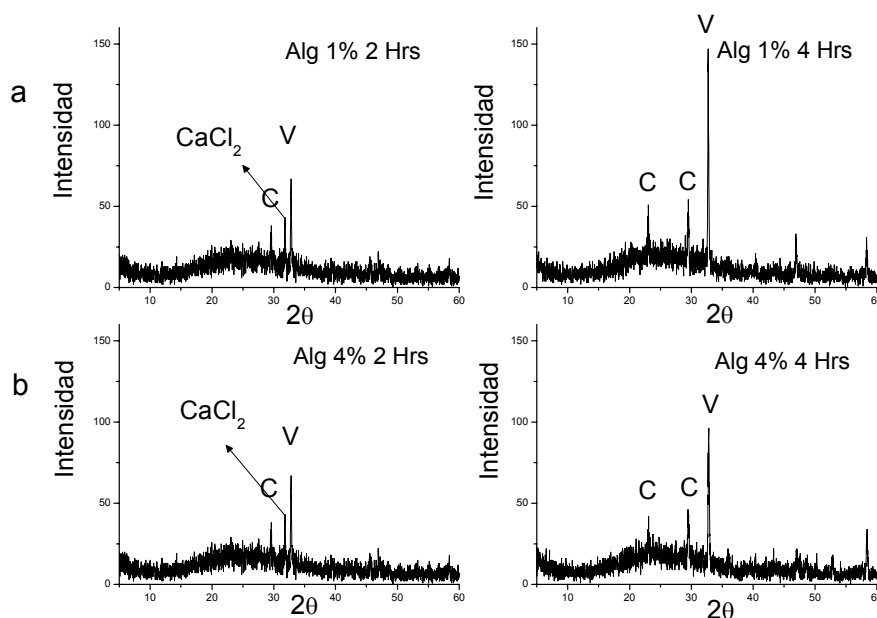


Figura 3.1.16. Patrones de difracción de rayos X de cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando soluciones de alginato como agente mineralizador: a) Alg1% y b) Alg4%.

En la **Figura 3.1.16** los patrones de DRX de los cristales obtenidos a 2 y 4 horas de cristalización para ambas concentraciones de alginato, donde se distinguen las señales para calcita a $29,5^\circ 2\theta$ y para vaterita a $32,7^\circ 2\theta$

El análisis de DRX realizado para ambas concentraciones muestra la existencia de los polimorfos calcita y vaterita al igual que en el caso anterior (Capítulo 3.1.1). Es posible observar en la θ . Además al cabo de 2 horas de cristalización, aún se observa la señal correspondiente a CaCl_2 a $31,8^\circ 2\theta$, desapareciendo al término de 4 horas de cristalización.

Al igual que en el caso de κ -carragenato, los polimorfos calcita y vaterita conviven en este sustrato para ambas concentraciones pero sus morfologías son bastantes disímiles pues para Alg1% a 4 horas de cristalización se observan vateritas esféricas de 5 μm y algunas con forma de flor descrita anteriormente^[114] (**Figura 3.1.17 a**). A partir de 6 horas de cristalización se observan aglomeraciones formadas por estructuras similares a una esponja (**Figura 3.1.17 b**).

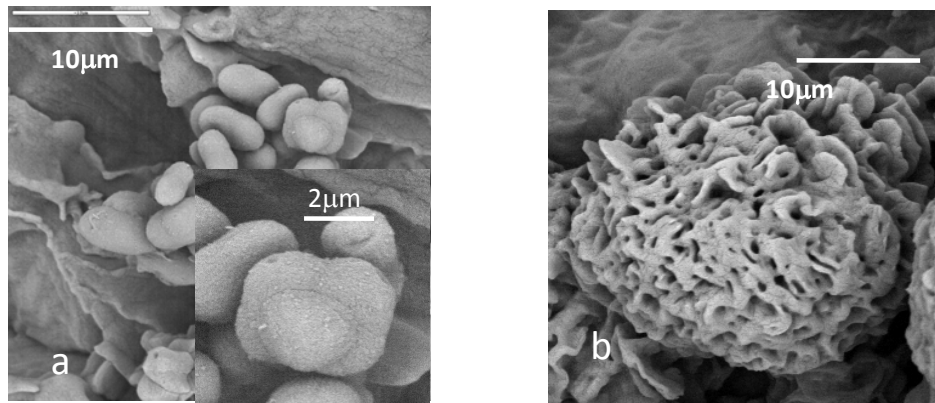


Figura 3.1.17. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos usando Alg1% como agente mineralizador: a) 4 horas de cristalización y b) 6 horas de cristalización.

La situación es bastante diferente a la que se observa para Alg4% a 1 hora de cristalización. Se observa un grupo de cristales rodeando a un aglomerado semiesférico de carbonato de calcio. Según DRX (**Figura 3.1.16**) estos cristales podrían ser CaCl_2 . Dentro de este aglomerado semiesférico se puede distinguir una circunferencia concéntrica rodeada por una zona vacía (**Figura 3.1.18**). Además es posible distinguir en la superficie del semicírculo aglomeraciones de cristales prismáticos de tamaño menor a 100nm.

A 4 horas de cristalización, los cristales crecieron en torno a los aglomerados esféricos manteniendo un hueco al medio y dando como resultado estructuras columnares formadas por cristales de vaterita de 1 a 2 μm (**Figura 3.1.18**).

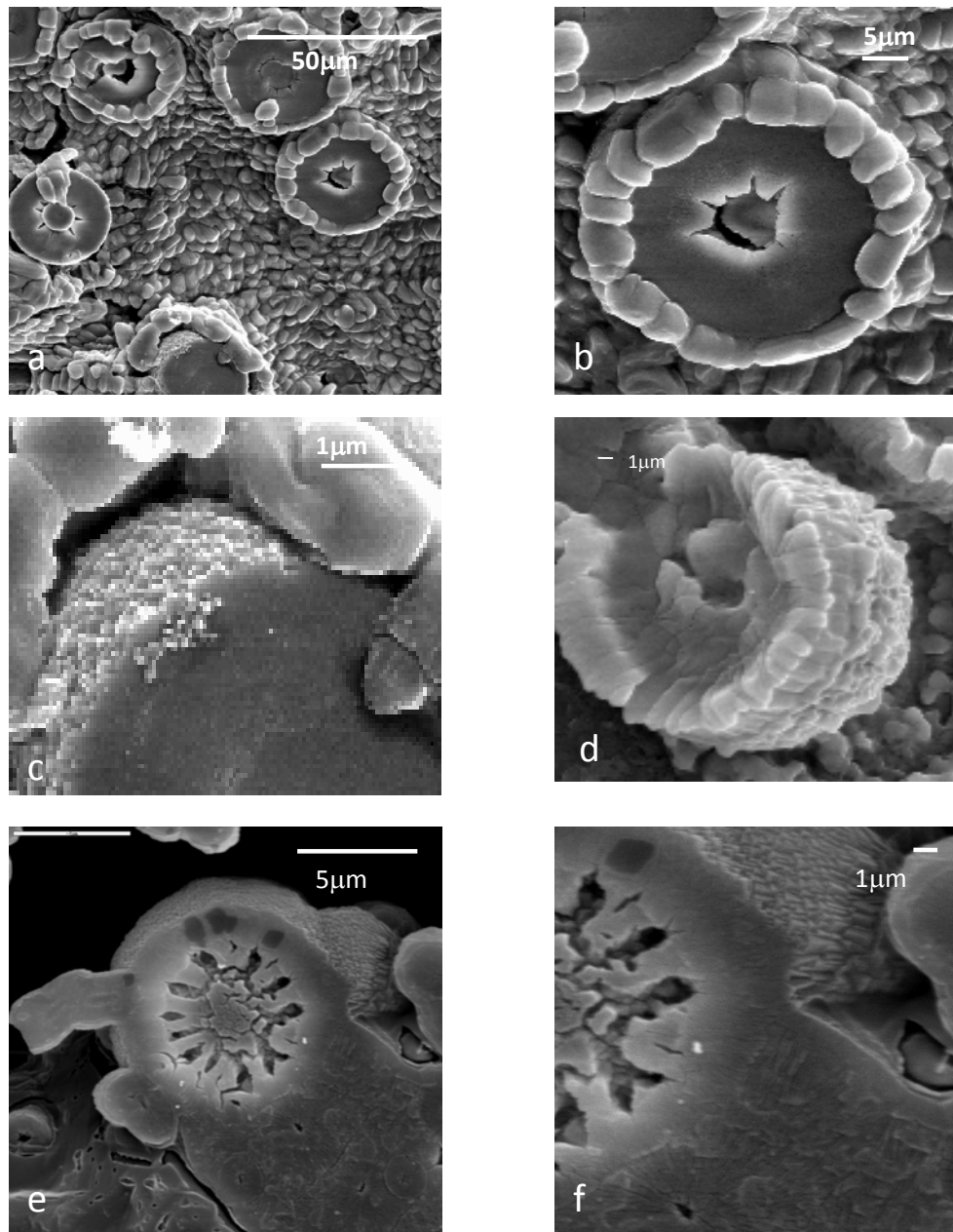


Figura 3.1.18. Micrografía de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y usando Alg4% como agente mineralizador: a) b) y c) 1 hora; d) 6 horas; e) y f) 24 horas de cristalización.

A 24 horas de cristalización se encuentran, en su gran mayoría, esferas cuya superficie esta compuesta por cristales de calcita de tamaño <150 nm (**Figura 3.1.18 f**). Dentro de esta estructura es posible distinguir semicircunferencias (**Figura 3.1.18 e**) con un orificio al medio y líneas de cristales radiales a esta circunferencia. En la semiesfera se observan grietas. Estas grietas son producto de la reducción del volumen que ocurre en la transición sólido- sólido de un polimorfo de CaCO_3 de menor estabilidad a uno de mayor estabilidad termodinámica ^[110].

Se ha reportado que el CaCO_3 amorfo (ACC) contiene entre 1.0-1.5 moléculas de agua por unidad de CaCO_3 ^[115]. Por otro lado, las densidades de calcita y vaterita son 2.71 g/mL y 2.45 g/mL, respectivamente. Las transformaciones de calcita a vaterita tienen un cambio de volumen de 6.3 % ^[110]. De esta manera, en un cambio de fase desde carbonato de calcio amorfo → Vaterita → Calcita generaría las grietas y los orificios. Además, esto está en concordancia con lo arrojado por el análisis de DRX. La estructura obtenida en este caso es muy similar a la observada en algunos seres vivos como reservorio de CaCO_3 ^[116].

Tabla 5. Resumen de la cristalización de CaCO_3 en presencia de alginato como agente mineralizador y utilizando el método de *spin-coating*. (C=calcita, V=vaterita)

Concentración de la Solución de Alginato P/V (%)	Tiempo de Cristalización (Horas)	Morfología y polimorfos	Conclusiones
1	4	Esferas lisas de V de 5 μm y algunas con forma de flor	Mayor tiempo de cristalización incrementa la estabilización de V por sobre C
1	6	Estructura tipo esponja de V	
4	1	Semiesferas lisas de V con un orificio al medio rodeada de cristales de C romboédricos	Estructuras muestran vestigios de transición desde CaCO_3 amorfo a V y finalmente a C
4	4	Semiesferas compuestas de columnas de V de 1-2 μm . Estructuras esféricas con superficie de C de < 150 nm	
4	6	Estructuras semiesféricas con cristales de C en la superficie < nm 150	
4	24	Estructuras semiesféricas de V con fracturas en su interior y cristales de calcita < 150 nm en su superficie	

3.1.4. Estudio de cristalización de CaCO_3 usando quitosano

Quitosano posee mayormente grupos funcionales aminos e hidroxilos y en menor proporción grupos acetamidos que lo convierten en un buen candidato para múltiples usos desde la industria farmacéutica, biomédica, cosmética y alimentos hasta para la remoción de residuos tóxicos y metales pesados^[117, 118].

Considerando los diferentes grupos funcionales que posee este polisacárido y su solubilidad en soluciones de ácidos diluidos, el quitosano parece ser un sustrato (agente mineralizador) interesante para el estudio de la cristalización de carbonato de calcio. En esta tesis se utilizaron dos soluciones de quitosano al 1% P/V (Qui1%) y al 4% P/V (Qui4%) en ácido acético al 2%. El estudio de cristalización se llevo a cabo según el método III.

Los patrones de DRX de cristales obtenidos al usar la solución de Qui1% de agente mineralizador a diferentes tiempos de cristalización muestran la existencia de los polimorfos vaterita y calcita con las señales características para vaterita en $27.1^\circ 2\theta$, $32,7^\circ 2\theta$, $50.1^\circ 2\theta$ y $58.5^\circ 2\theta$ correspondiente a los planos {132}, {024}, {222} y {115} respectivamente y para calcita en $29,5^\circ 2\theta$, $36,1^\circ 2\theta$, $47,6^\circ 2\theta$ y $48,6^\circ 2\theta$, relacionados con los planos {104}, {110}, {024} y {018}, respectivamente (**Figura 3.1.19**).

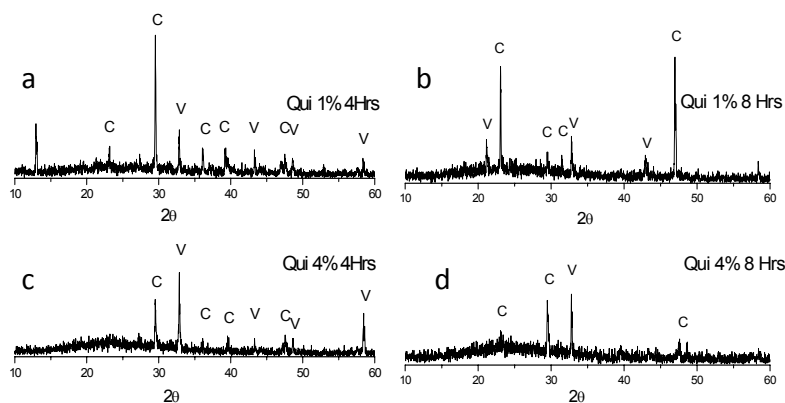


Figura 3.1.19. Patrones de difracción de rayos x para los cristales de carbonato de calcio obtenidos al usar soluciones de quitosano como agente mineralizador: a) Qui1% a 4 horas de cristalización; b) Qui1% a 8 horas de cristalización; c) Qui4% a 4 horas de cristalización y d) Qui1% a 8 horas de cristalización. C = calcita y V= vaterita.

La coexistencia de los dos polimorfos calcita y vaterita se mantienen a través de todo el tiempo de exposición al CO_2 para ambas concentraciones de quitosano. En el caso de Qui 1% a 8 horas de cristalización se distingue un cambio en la intensidad de las señales correspondientes a los planos $\{012\}$ y $\{024\}$ (**Figura 3.1.19**). Estas señales aparecen con mayor intensidad por sobre la señal correspondiente al plano $\{104\}$, característica de calcita, debido a que este plano es más denso. Los planos $\{012\}$ y $\{024\}$ son paralelos y no son los planos más densos de la celda unitaria de la calcita. Esto se puede observar en la **Figura 3.1.20** en donde se distingue que el plano $\{012\}$ sólo contiene átomos de calcio y el plano $\{024\}$ átomos de carbono y oxígeno, condición distinta a la que posee el plano $\{104\}$ donde se encuentran estos tres átomos. Esta situación de selectividad de los planos de crecimientos se debe probablemente a una orientación específica del sustrato que conlleva un crecimiento preferencial hacia estos planos lo que podría reflejarse en algún cambio en la morfología de la calcita.

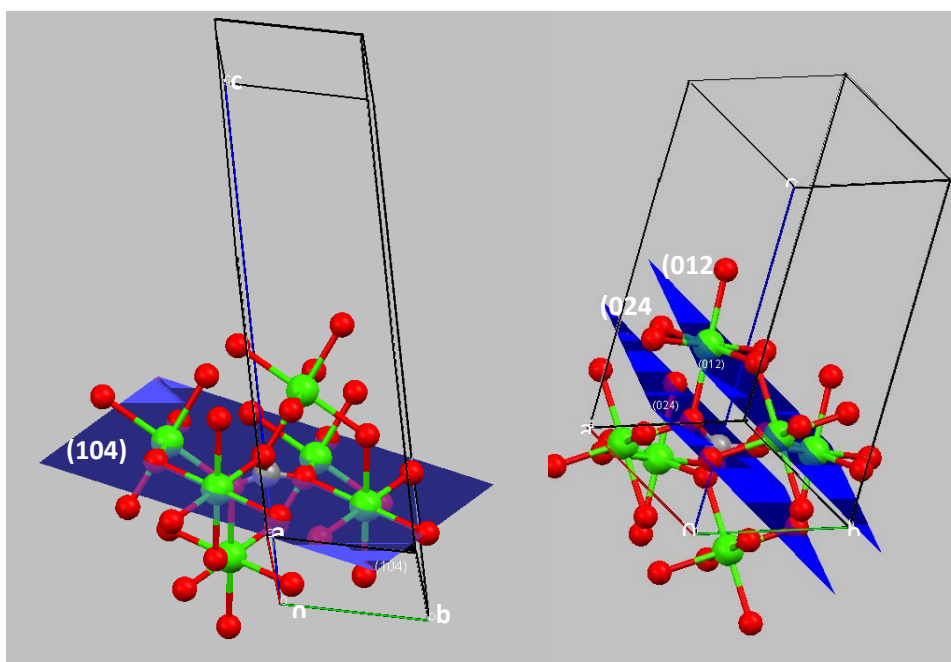


Figura 3.1.20. La celda unitaria de calcita en la que se distinguen los planos $\{104\}$, $\{012\}$ y $\{024\}$. Carbono (●); calcio (●) y oxígeno (●).

Al analizar por SEM la morfología de los cristales obtenidos a las 4 horas de cristalización se observa que son de dos tipos. Cristales en forma de semiesferas con una cara plana posiblemente vaterita y las otras son semiesferas formadas por aglomeraciones de cristales de calcitas de 2 μm aproximadamente (**Figura 3.1.21 b**).

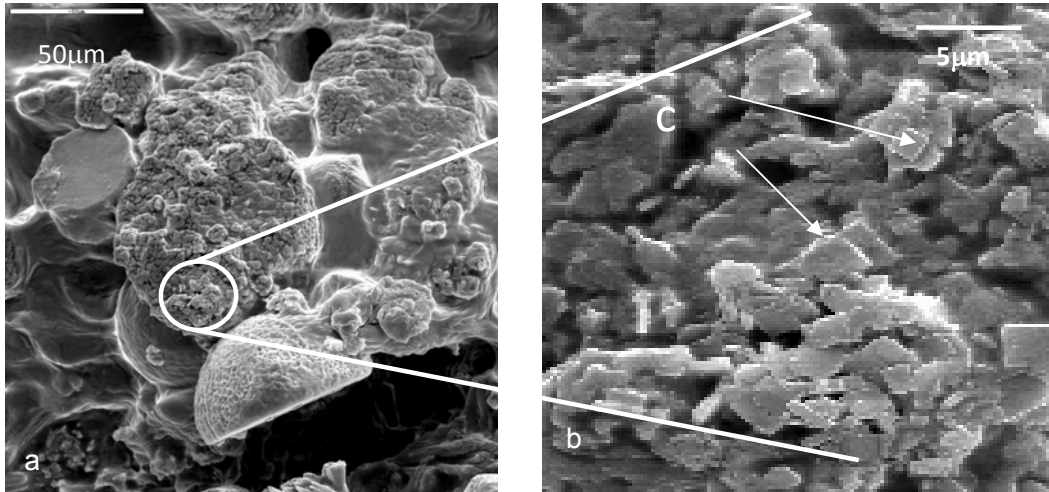


Figura 3.1.21. Micrografía de los cristales de CaCO_3 obtenidos a 4 horas de cristalización y usando Qui1% como agente mineralizador: a) semiesferas b) detalles donde se distinguen cristales de calcitas.

Al igual que en el caso anterior, a 8 horas de cristalización se distinguen dos tipos de aglomeraciones. El primero, aglomeraciones esféricas cuyas superficies están cubiertas con cristales prismáticos de calcita y las otras están compuestas por cristales con una forma muy similar a las que tienen las hojas de las plantas que en cuyo extremo es fácilmente reconocible un cristal de calcita^[109]. Estas estructuras “crystal leafs” además se encuentran ordenadas en forma helicoidal (**Figura 3.1.22**).

La morfología de esta calcita esta en concordancia con lo observado anteriormente en el patrón de difracción de rayos X donde se aprecia un incremento de la intensidad de las señales en $23,1^\circ 2\theta$, $47,6^\circ 2\theta$, reflejando un cambio de la morfología de la calcita comparado con la que normalmente se observa para los cristales de calcita obtenidos *in Vitro*.

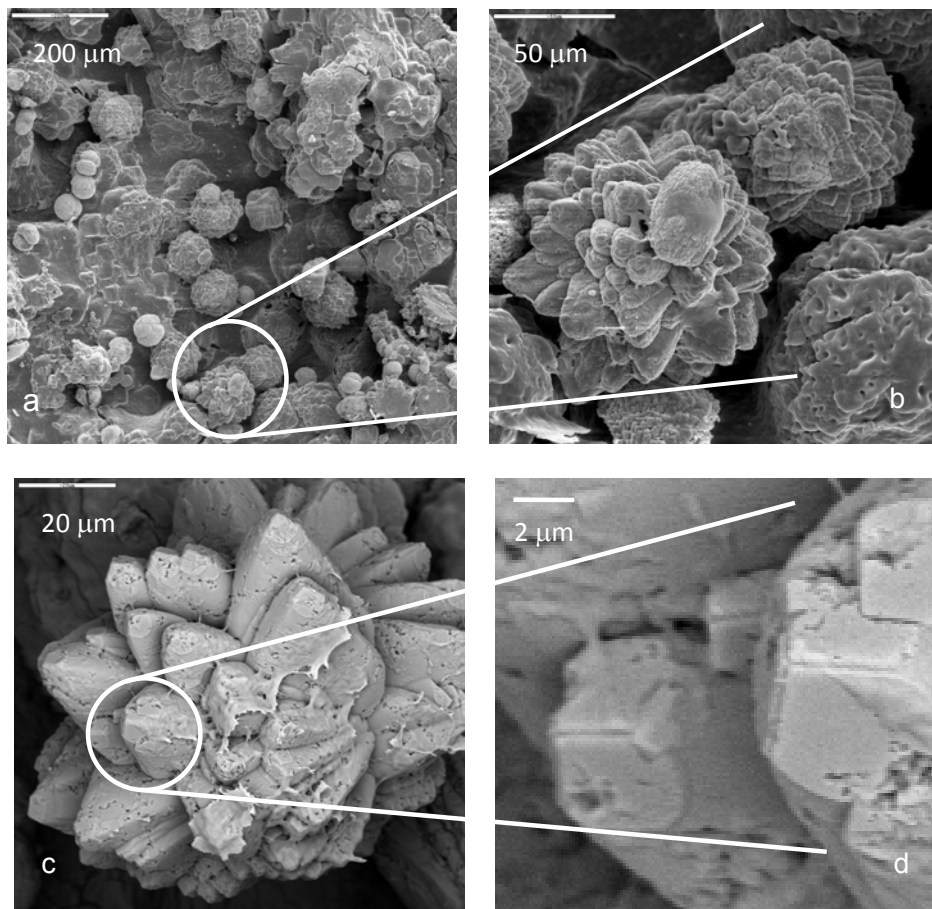


Figura 3.1.22. Micrografía de cristales de CaCO_3 obtenidos a 8 horas de cristalización y al usar Qui1% como agente mineralizador: a) Cristales de CaCO_3 con diferentes formas; b) y c) detalles de una aglomeración de CaCO_3 con forma de “Crystal Leafs” y d) detalle de las aglomeraciones donde se distinguen un cristal calcita.

A 24 horas de cristalización, **Figura 3.1.23**, se observan esferas de dos tipos, unas con una superficie lisa y otra con la superficie formada por cristales prismáticos de calcitas de tamaño menor a $5\mu\text{m}$.

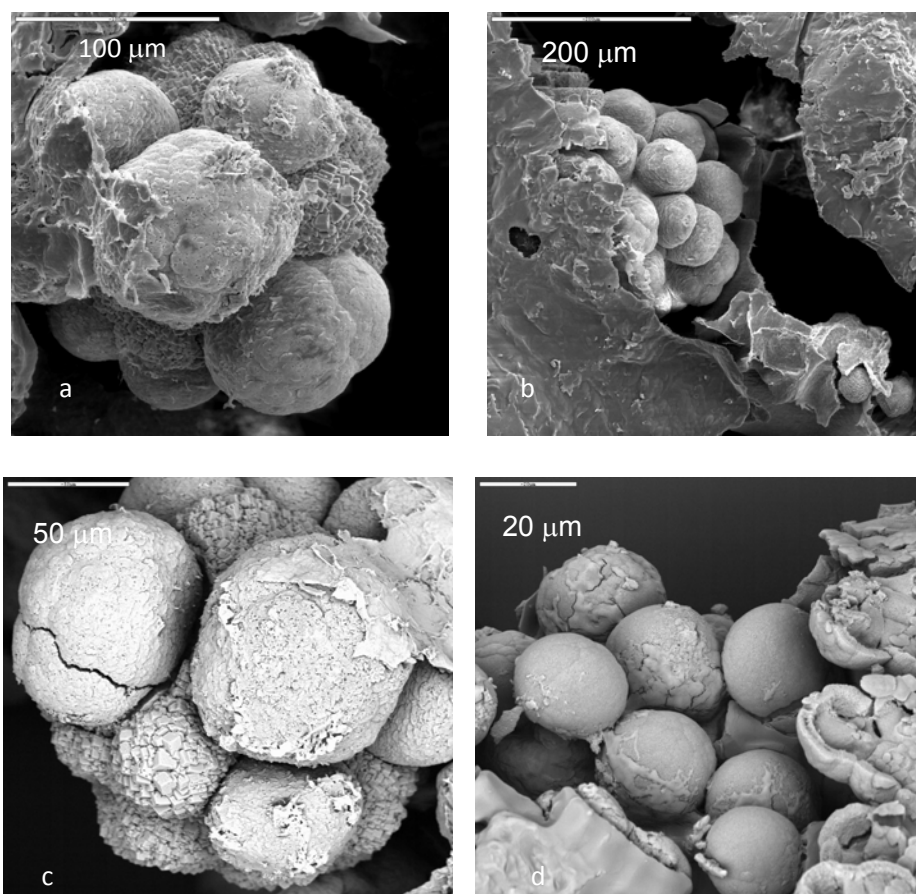


Figura 3.1.23. Aglomeraciones de cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización y usando soluciones de quitosano como agente mineralizador: a) y b) Qui1% y c) y d) Qui4%.

Los cristales observados para la solución más concentrada (Qui4%) no presenta cambios significativos a través del tiempo de cristalización, obteniéndose cristales similares a los obtenidos en la solución menos concentrada a 24 horas. En este caso se obtiene aglomeraciones esféricas, unas lisas y otras formadas por cristales de calcita (**Figura 3.1.23**). Es probable que la alta concentración de quitosano impida una difusión fluida de CO_2 al seno de la solución y por lo tanto una evolución de los cristales.

Tabla 6. Resumen de la cristalización de CaCO₃ en presencia de quitosano como agente mineralizador y utilizando el método de *spin-coating*. (C=calcita, V=vaterita)

Concentración de la Solución de Quitosano P/V (%)	Tiempo de Cristalización (Horas)	Morfología y polimorfos	Conclusiones
1	4	Semiesferas planas de V y aglomerados romboédricos de C	Crecimiento preferencial de C debido a la tendencia de Qui a un arreglo en capas
1	8	Aglomerados helicoidales de C con forma de flor de 5 μm	
1	24	Aglomerados esféricos con superficies de estructuras romboédricas de C y otras lisas de V	
4	24	Aglomerados esféricos con superficies de estructuras romboédricas de C y otras lisas de V	La alta viscosidad de la solución impide un flujo de CO ₂ al interior de la solución restringiendo un evolución de los cristales

El estudio de cristalización de carbonato de calcio en presencia de todos estos biopolímeros como agente mineralizador reveló que por el método de *spin-coating* se produce y se estabiliza al mismo tiempo ambos polimorfos vaterita y calcita. Este hecho es justificable en términos de que no es posible obtener una distribución homogénea de los grupos funcionales de los biopolímeros debido a posibles conformaciones que ellos adoptan en la solución dependiendo de la concentración. De esta manera se produce ordenamientos locales de los grupos funcionales lo que conlleva a su vez a sobresaturaciones locales que genera un polimorfo específico [119]. La posible formación de carbonato de calcio amorfo al usar alginato como agente mineralizador puede ser explicada considerando la capacidad que posee este biopolímero a formar geles en presencia de iones de calcio como consecuencia de la interacción entre el Ca^{2+} y los grupos carboxilos del polímero. La configuración que adquiere el polímero en su estado de gel aumentaría la concentración de este catión al interior del ovillo macromolecular aumentando la sobresaturación y permitiendo que se forme este estado. Esta sobresaturación iría bajando hacia los bordes de las aglomeraciones de cristales. De esta forma, es posible observar la coexistencia de tres de las formas de carbonato de calcio en una misma estructura siguiendo el esquema de la **Figura 3.1.24**. Esta distribución de la concentración de los iones de calcio podría explicar el tipo morfología observada en este crecimiento puesto que la estructura se iría formando en forma concéntrica a partir de un centro de mayor concentración.

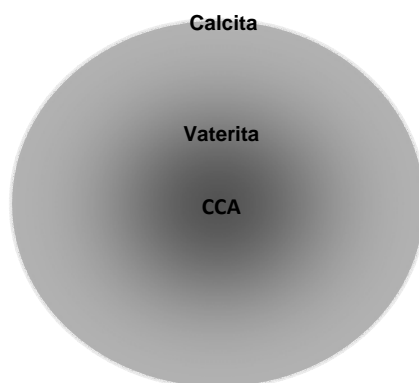


Figura 3.1.24. Posible gradiente de sobresaturación que se observaría en las aglomeraciones de carbonato de calcio obtenidas al usar Alg4% como agente mineralizador. Zonas más oscuras representa mayor sobresaturación. (CCA= carbonato de calcio amorfo).

A diferencia de alginato, los geles de κ -carragenato formados en presencia de iones de calcio son menos consistentes. Esto se debe a que el enlace entre los grupos sulfatos y los iones calcio es más débil que para el observado en alginato. Esto impediría obtener una sobresaturación lo suficientemente alta para formar carbonato de calcio amorfo al interior de κ -carragenato. Esta característica también podría explicar el tipo de crecimiento observado al no existir un centro con una alta concertación de calcio y el crecimiento de cristales de carbonato de calcio podría ser a través del eje axial de la estructura formada por este biopolímero, dando como resultado el crecimiento columnar de los cristales de vaterita.

3.2. Estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador diferentes biopolímeros y mezclas de biopolímeros liofilizados

En estos sistemas se utilizó los biopolímeros Qui, Carr o Alg como agente mineralizador de biomineralización pero a diferencia de la experiencia anterior (sección 3.3), se liofilizaron los biopolímeros antes de sumergirlos en una solución de 0,2 M de CaCl_2 en búfer a pH 9. Después de terminado el periodo de tiempo de exposición de las muestras a CO_2 , estos fueron liofilizados nuevamente para estudiar los cristales de carbonato de calcio obtenidos.

La finalidad de realizar este procedimiento es facilitar los análisis de caracterización pues con el protocolo anterior las muestras se secaban a temperatura ambiente lo que conlleva a que la matriz colapse sobre los cristales y estos estén cubierto por una capa de polímero, lo que a la postre provoca una mayor dificultad en la caracterización por SEM.

3.2.1. Estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador biopolímeros liofilizados

Alginato Liofilizado

Las muestras mineralizadas usando una solución de alginato a 1% p/v (Alg1%) y a 24 horas de cristalización muestran estructuras con formas semiesféricas de aproximadamente 50 μm de diámetro. Esta morfología está en concordancia con el polimorfo de vaterita. Sobre la superficie de estas vateritas se distinguen calcitas romboédricas de un tamaño menor a 1 μm , (**Figura 3.2.1 a**). Al aumentar el tiempo de cristalización a 48 horas, las estructuras predominantes son esferas completas de vaterita, en las que también es posible distinguir en su superficie calcitas romboédricas. En otras zonas hay algunas aglomeraciones de calcitas sin un orden definido (**Figura 3.2.1 b**) Para la solución de Alg4% a 24 horas de cristalización, las estructuras que se observan son algunas aglomeraciones de vateritas esféricas de tamaño similar a su par de concentración menor. Se distinguen otras estructuras formadas por planos prismáticos de calcita pero sin ningún ordenamiento posible de establecer, (**Figura 3.2.1 c**). Para la misma solución a 48 horas de cristalización, las estructuras son en su mayoría vateritas y calcitas

romboédricas aunque de estas últimas se observan dos tipos; cubos con caras lisas y otras donde sólo se distinguen las aristas de estos cubos, (**Figura 3.2.1 d**)

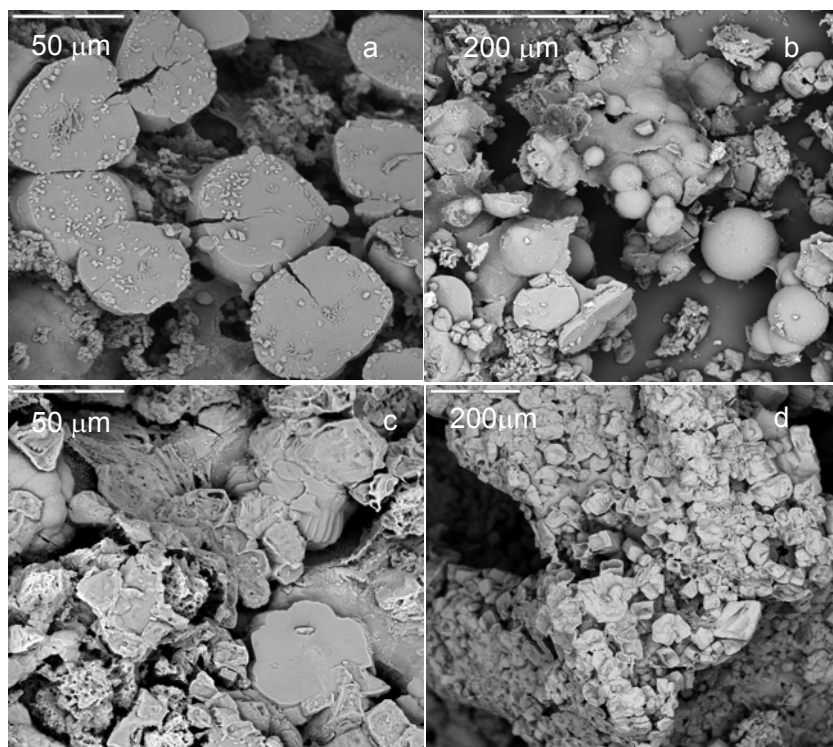


Figura 3.2.1. Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos a diferentes tiempos de cristalización y utilizando como agente mineralizador alginatos liofilizados: a) Alg1% a 24 horas de cristalización; b) Alg1% a 48 horas de cristalización; c) Alg4% a 24 horas de cristalización y d) Alg4% a 48 horas de cristalización.

Probablemente este tipo de calcita (**Figura 3.2.1 d**) no era una estructura compacta sino que sólo en su superficie se ha completado la formación del cristal y que en su interior está aún en solución. De esta manera, durante la liofilización el líquido fue removido del interior haciendo colapsar la estructura. Probablemente, la mayor densidad asociada a la solución más concentrada de Alg4% impide que los cristales se formen homogéneamente pues no fue posible la migración del CO_2 al interior de la estructura manteniendo una mayor cantidad de la solución.

El patrón de DRX (**Figura 3.2.2**), confirma lo observado por SEM donde el polimorfo predominante es la vaterita. Sin embargo, para ambas concentraciones a 48 horas de cristalización se observan señales de calcita para los planos $\{012\}$ y $\{024\}$. Esto da indicios de que este polimorfo tendría una orientación distinta a la que se observa normalmente.

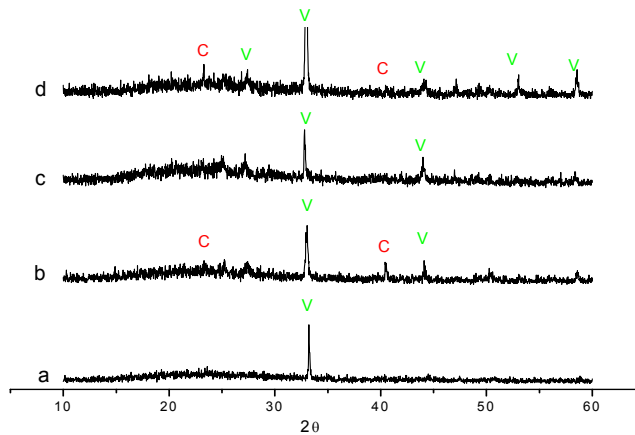


Figura 3.2.2. Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido utilizando como agente mineralizador alginato en dos concentraciones y dos tiempos de cristalizaciones distintos: a) Alg1% a 24 horas de cristalización; b) Alg1% a 48 horas de cristalización; c) Alg 4% a 24 horas de cristalización y d) Alg1% a 48 horas de cristalización.

Carragenato Liofilizado

Los aglomerados que se obtienen en las soluciones de Carr1% a 24 horas de cristalización son en su mayoría estructuras semiesféricas identificadas anteriormente como vateritas, ^[119] **(Figura 3.2.3)**. No se observan otro tipo de estructuras sobre su superficie como en el caso anterior, sólo algunos poros y alguna contracción de su estructura probablemente debido al proceso de liofilización. En otras zonas, se observan planos cristalinos de calcitas cubicas sin una morfología peculiar. La situación es distinta para el tiempo de 48 horas donde las estructuras semiesféricas de vateritas se encuentran junto con conglomerados de calcitas. Estos conglomerados tienen la peculiaridad de que sólo se puede observar la parte exterior de su estructura y se encuentran vacías en su interior. Además, en su centro se puede observar claramente un crecimiento del cristal en forma helicoidal. Este tipo de modificación genera, en algunos casos, estructuras que asemejan a una escalera.

Al usar Carr4%, a 24 horas de cristalización se obtienen estructuras muy parecidas a las obtenidas al usar Alg4% pero a 48 horas, **(Figura 3.2.3 a)**, donde las estructuras de las calcitas colapsaron producto del proceso de liofilización. A 48 horas las estructuras que se observan son en su mayoría semiesferas de vateritas. En ellas se puede apreciar que son formadas por varias capas y ordenadas concéntricamente, **(Figura 3.2.3 b)**.

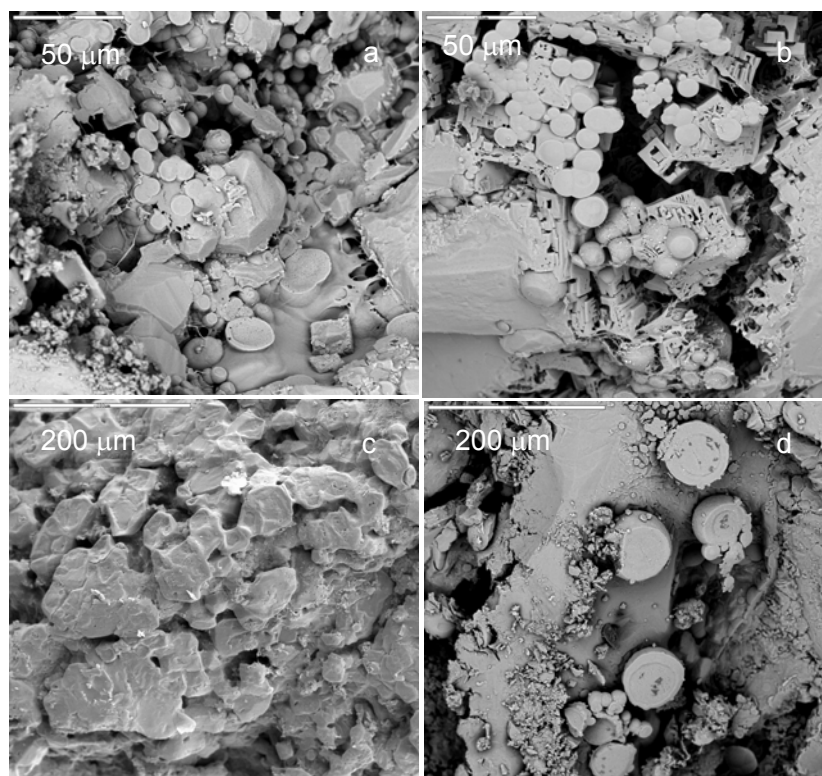


Figura 3.2.3. Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos a diferentes tiempos de cristalización utilizando como agente mineralizador κ -Carragenato liofilizado: a) Carr1% a 24 horas de cristalización; b) Carr1% a 48 horas de cristalización; c) Carr4% a 24 horas de cristalización y d) Carr1% a 48 horas de cristalización.

El análisis DRX (**Figura 3.2.4**) de los cristales de carbonato de calcio en donde se utilizó como agente mineralizador soluciones de κ -Carragenato indica que para ambos tiempos de cristalización y concentraciones de κ -Carragenato se estabiliza vaterita. Cuando se utilizó Carr1% a 48 horas de cristalización, se observa además señales de calcita, (**Figura 3.2.3 b**), donde se distinguen calcitas que se encuentran aglomeradas en forma helicoidal. Probablemente, este tipo de orientación es el que se observa en el patrón de DRX ya que no aparece la señal que corresponde al plano $\{104\}$ sino que las señales en 2θ $23,06^\circ$ y 2θ $47,1^\circ$ correspondientes a los planos $\{012\}$ y $\{024\}$ ^[21].

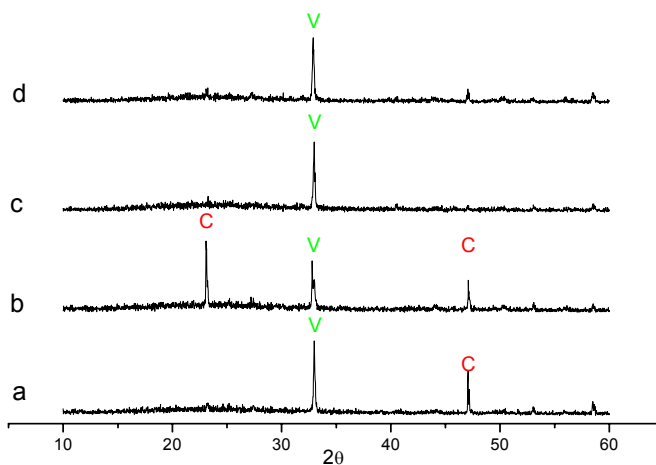


Figura 3.2.4. Patrón de difracción de rayos X para cristales de carbonato de calcio obtenidos al utilizar soluciones de κ -Carragenato como agente mineralizador y para diferentes tiempos de cristalización: a) Carr1%, 24 horas; b) Carr1%, 48 horas; c) Carr4%, 24 horas y d) Carr1%, 48 horas.

Quitosano liofilizado.

Las estructuras obtenidas al utilizar como agente mineralizador quitosano liofilizado, proveniente de la liofilización de una solución de Qui al 1% p/v (Qui1%) y a 24 horas de cristalización, son esfera lisas formadas por capas, las que son identificadas como vateritas, **(Figura 3.2.5 a)**. También es posible observar en otras zonas estructuras cúbicas de calcitas. Estas estructuras no presentan ningún ordenamiento especial sólo se encuentran como cristales aislados. Este hecho es muy diferente a lo que se obtiene para 48 horas de cristalización. Si bien las estructuras esféricas de vateritas se mantienen, aparecen estructuras formadas por una serie de planos cristalinos. Estos planos probablemente provienen de cristales de calcitas parcialmente formadas y que se encuentran aglomeradas en forma espacial, **(Figura 3.2.5 b)**.

Los cristales que se obtienen al usar Qui4% a 24 horas son estructuras esféricas huecas formadas por pequeños cristales de 2 μm , **(Figura 3.2.5 c)**. A 48 horas de cristalización sólo se detectan esferas de vateritas en forma aisladas.

(Figura 3.2.5 d).

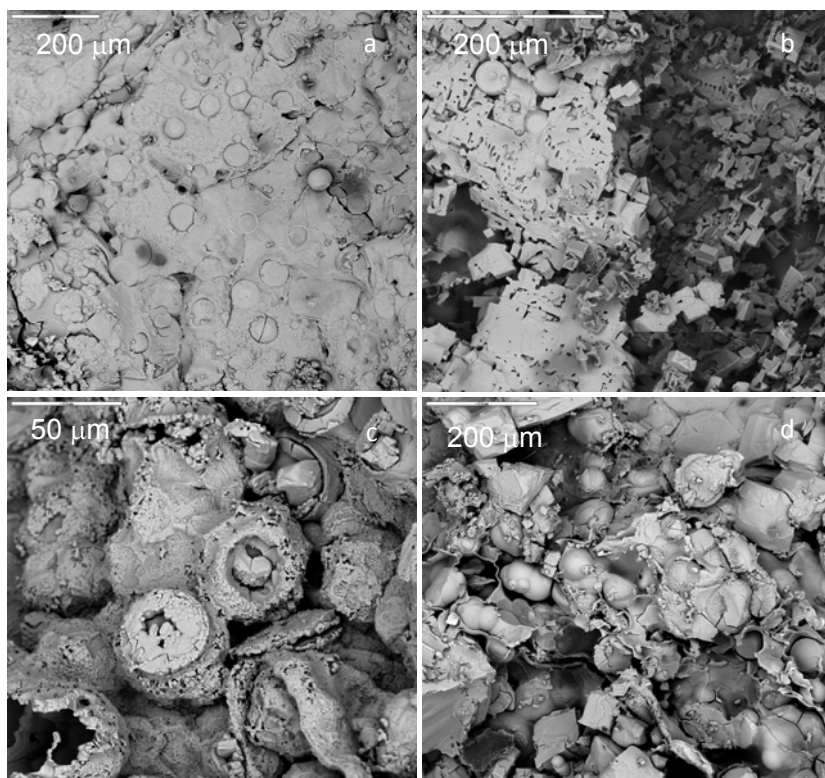


Figura 3.2.5. Micrografía SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos al utilizar Quitosano liofilizado como agente mineralizador y a diferentes tiempos de cristalización: a) Qui1%, 24 horas; b) Qui1%, 48 horas; c) Qui4%, 24 horas y d) Qui1%, 48 horas.

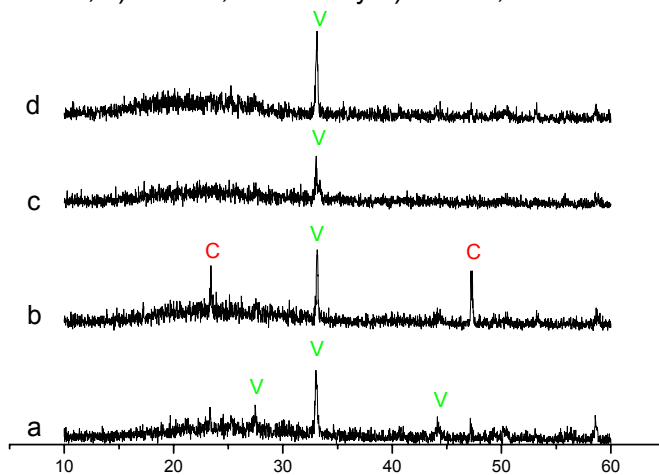


Figura 3.2.6. Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido utilizando como agente mineralizador quitosano liofilizado proveniente de dos soluciones de diferentes concentraciones y a diferente tiempos de cristalización: a) Qui1%, 24 horas; b) Qui1%, 48 horas; c) Qui4%, 24 horas y d) Qui4%, 24 horas.

Al igual que los casos anteriores, el análisis DRX, **(Figura 3.2.6)** muestra la presencia de vaterita para todas las concentraciones de soluciones de quitosano. Además, los aglomerados de calcita que se obtiene al utilizar Qui1% a 24 horas de cristalización **(Figura 3.2.5 b)** tienen una morfología similar a lo obtenido con Alg1% a 24 horas de cristalización, **(Figura 3.2.3 b)**. Ambos aglomerados muestran exactamente las mismas señales en el patrón de DRX, por lo que se puede concluir que estos aglomerados son de calcita y tienen la misma orientación.

Tabla 7. Resumen de las morfologías y polimorfos obtenidos utilizando como agente mineralizador biopolímeros liofilizados.

Tipo de agente mineralizador y Tiempo de Cristalización (Hrs)	Morfología	Polimorfo*
Alg1%, (24)	Semiesferas planas y romboedros muy pequeños	V y C
Alg1%, (48)	Esferas, cubos	V y C
Alg4%, (24)	Esferas	V
Alg4%, (48)	Esferas y Cubos	V y C
Carr1%, (24)	Semiesferas	V
Carr1%, (48)	Semiesferas y aglomerados de cubos huecos	V y C
Carr4%, (24)	Esferas y cubos colapsados	V y C
Carr4%, (48)	Esferas	V
Qui1%, (24)	Semiesferas	V
Qui1%, (48)	Semiesferas y aglomerados de cubos huecos	V y C
Qui4%, (24)	Esferas huecas	V
Qui4%, (48)	Esferas	V

* V=vaterita; C=calcita

Todos los biopolímeros en sus dos concentraciones fueron capaces de producir tanto el polimorfo más estable, calcita, como estabilizar el polimorfo menos estable, vaterita.

Las estructuras obtenidas al usar soluciones de concentración al 1% p/v de todos los biopolímeros muestran una mayor definición y mayores modificaciones en la morfología de los aglomerados de carbonato de calcio comparados con los obtenidos al usar soluciones al 4% p/v de estos biopolímeros. Una concentración mayor del biopolímero implica mayor viscosidad de la solución resultante. Una viscosidad más alta produce como consecuencia una menor difusión del CO_2 al interior de la solución, lo que disminuye la eficiencia de la formación de los cristales de CaCO_3 .

La mayor afinidad que poseen los grupos carboxilos del alginato por el ión calcio dió como resultado una mayor tendencia a la formación de vaterita por sobre calcita. La presencia de calcita fue detectada a pesar de su tamaño pequeño. Por otro lado, la menor afinidad que poseen los grupos sulfatos del carragenato y aminos de quitosano con el ión calcio permite obtener aglomerados de carbonato de calcio con tamaños similares para ambos polimorfos vaterita y calcita. Para ambos biopolímero se formaron aglomerados espaciales de calcita con morfologías similares pero con idéntica orientación cristalográfica.

3.2.2. Estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador mezclas liofilizadas de quitosano y alginato

Para la preparación de las mezclas se utilizaron soluciones al 1% p/v de ambos biopolímeros. Las mezclas de Qui y Alg se prepararon en las siguientes proporciones: Qui/Alg (1/1), Qui/Alg (1/2), Qui/Alg (1/3), Qui/Alg (2/1) y Qui/Alg (3/1).

Mezcla Qui/Alg (1/1)

A 6 horas de cristalización las estructuras observadas en SEM son aglomerados de cristales largos de un tamaño aproximado de 5 μm . Estos por su morfología corresponden al polimorfo aragonita, **Figura 3.2.7 a**. Además, se distinguen esferas formadas por cristales de calcita

observadas anteriormente. A 8 horas de cristalización, las estructuras se parecen a las de 6 horas, cristales con una forma de paralelepípedo de un ancho de aproximado de $1\ \mu\text{m}$ y un largo cercano a $8\ \mu\text{m}$, **Figura 3.2.7 b**. Estas dimensiones son cercanas a los cristales que forman el nácar ^[120] pero no poseen el ordenamiento que se observa en ese material. A 24 horas, **Figura 3.2.7 c**, el resultado son semiesferas lisas que se ha identificado con antelación como vateritas ^[119] aunque en algunas zonas se distinguen aglomerados similares a los observados a 8 horas.

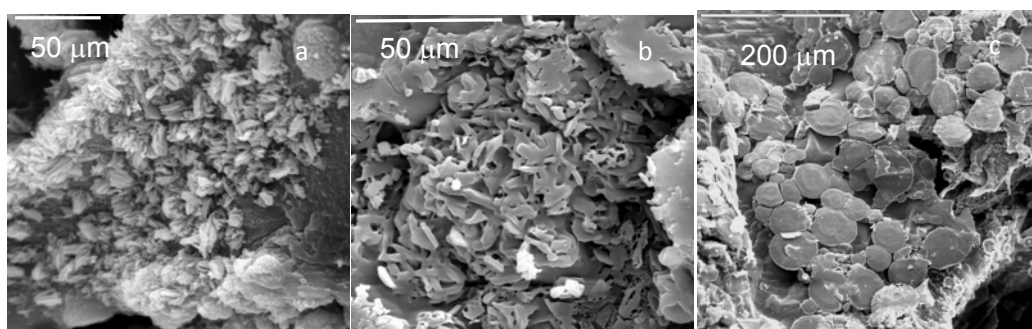


Figura 3.2.7. Micrografía SEM de estructuras de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (1/1) para diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas.

Los análisis de DRX realizados mostraron una mala resolución pero se puede asignar a través de la morfología el tipo de polimorfo obtenido al cabo 6 horas y 24 horas de cristalización. Se encontró que es difícil asignar el polimorfo correspondiente de los cristales obtenidos a 8 horas de cristalización, **Figura 3.2.7**. Un método alternativo es el análisis por FTIR. Por esta vía es posible determinar todos los polimorfos de CaCO_3 tanto los anhidros como los hidratados e incluso el estado amorfo pero no es posible discernir la orientación cristalina.

En la **Figura 3.2.8** se puede observar que el espectro FTIR obtenido muestra una banda de absorción en $877\ \text{cm}^{-1}$ que en conjunto con la banda que aparece en $745\ \text{cm}^{-1}$ identifican al polimorfo vaterita obtenido para ambos tiempos de cristalización de 8 y 24 horas. La banda de absorción en $713\ \text{cm}^{-1}$ junto con la banda de absorción en $877\ \text{cm}^{-1}$ son características del polimorfo calcita, lo que indica que estos dos polimorfos coexisten al usar la mezcla Qui/Alg (1/1) ^[121].

Además de las señales correspondientes a los polimorfos anhidros, se observan las bandas de

absorción centradas en 680 cm^{-1} y 571 cm^{-1} asignada para el polimorfo hidratado $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ^[122].

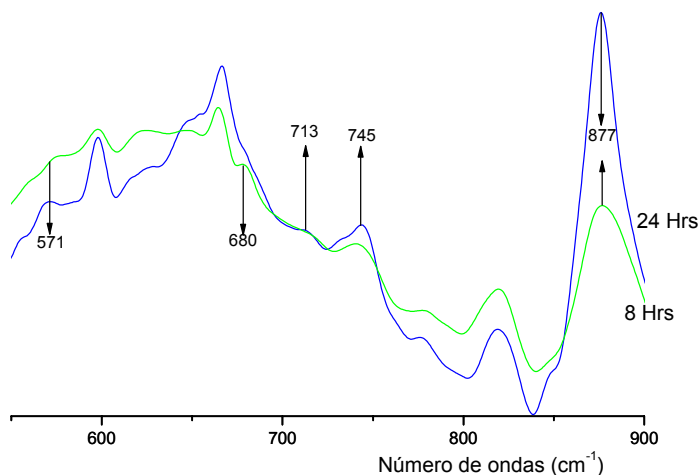


Figura 3.2.8. Espectro FTIR de la mezcla Qui/Alg (1/1) usados como agente mineralizador y después de 8 y 24 horas de cristalización.

Mezcla Qui/Alg (1/2)

Las estructuras observadas por SEM a 6 horas de cristalización (**Figura 3.2.9 a**) asemejan a tabletas de forma hexagonal, aglomeradas sin un orden establecido y sin una morfología atribuible a algún polimorfo conocido, además se observan algunas calitas romboédricas.

A 8 horas (**Figura 3.2.9 b**) las estructuras son semiesferas lisas y otras con pequeños cristales que las rodean con una morfología no identificable. A 24 horas, **Figura 3.2.9 c**, las semiesferas cubren casi completamente la superficie del agente mineralizador dejando la cara plana hacia el exterior. Se observan además en un número menor algunos prismas cristalinos.

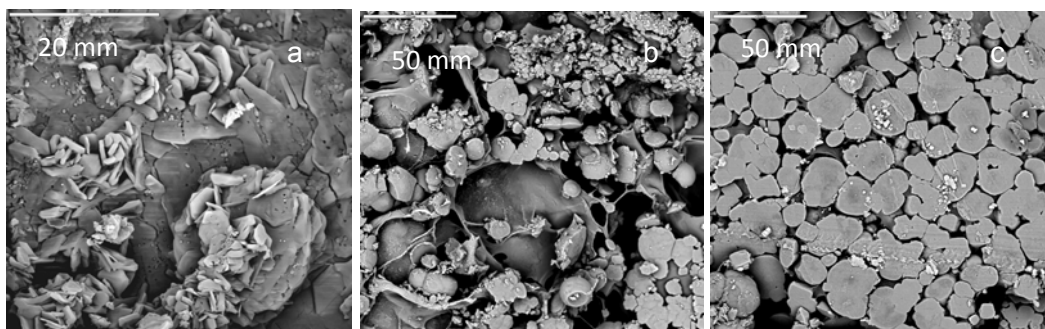


Figura 3.2.9. Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador mezcla Qui/Alg (1/2) para diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas.

El análisis FTIR (**Figura 3.2.10**) da cuenta de que a 6 horas las estructuras hexagonales son calcitas y no se detecta algún otro polimorfo. A 8 horas y 24 horas el polimorfo predominante es vaterita, aunque también se detecta calcita en una menor proporción. Al observar en detalle las bandas de absorción entre 500 cm^{-1} y 780 cm^{-1} , se detecta la presencia de $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, **Figura 3.2.10**.

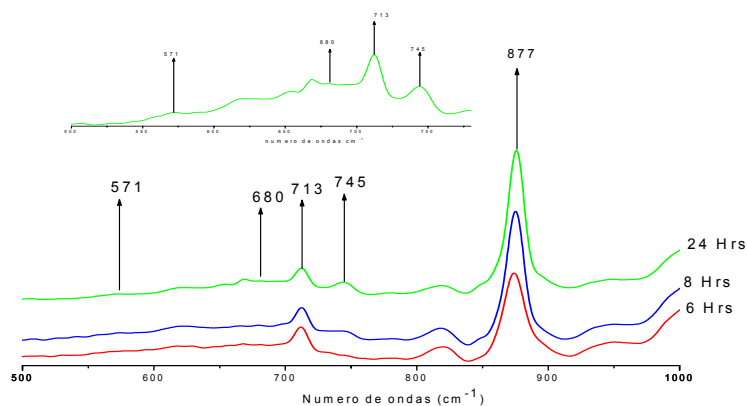


Figura 3.2.10. Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (1/2) usado como agente mineralizador a 6, 8 y 24 horas de cristalización y una ampliación del espectro a 24 horas entre 750 cm^{-1} y 650 cm^{-1} .

Es probable que las estructuras pequeñas correspondan a este estado hidratado de CaCO_3 como un estado de transición que se estabiliza, resultado de la sobresaturación local. La mayor

proporción de alginato podría contribuir a este efecto debido al mayor número de grupos carboxilos los que aumentarían la concentración de iones calcio y como consecuencia estabilizaría un estado metaestable.^[15]

Mezcla Qui/Alg (1/3)

Las estructuras que se observan a 6 horas, **Figura 3.2.11 a**, son las semiesferas anteriormente descritas e identificadas como vateritas ^[119].

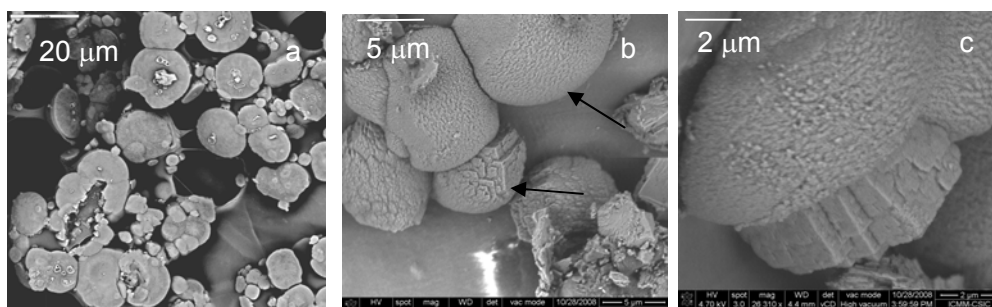


Figura 3.2.11. Micrografía de estructura de CaCO_3 obtenidas en la mezcla Qui/Alg 1/3 a distintos tiempos de exposición. a) 6 horas b) 8 horas y c) 24 horas.

A 8 horas, **Figura 3.2.11 b**, las estructuras son esféricas pero en algunos casos presentan caras planas que podrían asociarse a calcita. A 24 horas, **Figura 3.2.11 c**, las estructuras en su mayoría son esferas de vateritas pero además se detecta el crecimiento de una calcita desde una vaterita, indicio de la transición sólido-sólido ^[110]. Este hecho ha sido observado antes en estos sistemas cuando se utilizaron los solo los biopolímeros como agente mineralizador. La coexistencia de dos polimorfos en una sola estructura es común en sistemas de origen biológico. La morfología de la calcita muestra características de un ordenamiento a nivel nanométrico pues está compuesta por distinto planos de un espesor en esas dimensiones.

El espectro FTIR, (**Figura 3.2.12**) esta en concordancia con lo observado en SEM, pues para todos los tiempos de cristalización se distinguen la banda de absorción en 877 cm^{-1} confirmando la presencia de CaCO_3 independiente del tipo de polimorfo.

La banda de absorción correspondiente a polimorfo Vaterita en 745 cm^{-1} a 6 horas es muy pequeña pero a 8 horas está claramente definida confirmando definitivamente su presencia a 24 horas, donde se distingue una pequeña banda de absorción a 713 cm^{-1} correspondiente al polimorfo calcita.

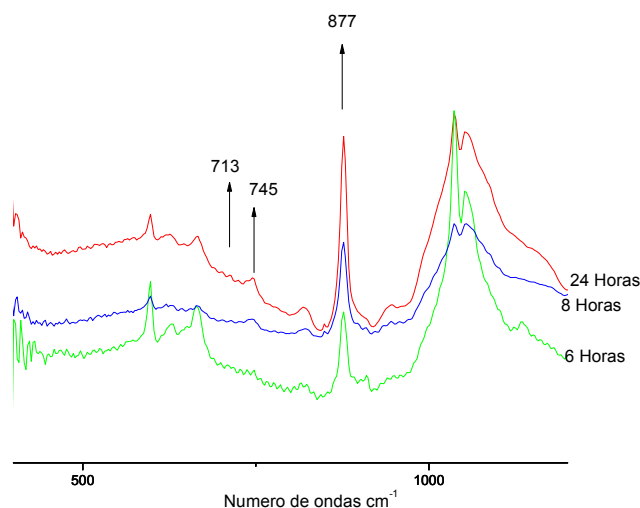


Figura 3.2.12. Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (1/3) usado como agente mineralizador a 6, 8 y 24 horas de cristalización.

Si bien esta composición de la mezcla de Qui y alginato puede estabilizar los polimorfos calcita y vaterita en una misma estructura y donde la presencia de calcita es minoritaria, esto tendría relación con la presencia de un mayor número de grupos carboxilos, lo que propicia la estabilización de un polimorfo metaestable.

Mezcla Qui/Alg (2/1)

Las estructuras resultantes de carbonato de calcio al usar como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (2/1) y para todos los tiempos de cristalización estudiados son calcitas romboédricas. A 6 horas de cristalización, **Figura 3.2.13 a**, los cristales tienen un tamaño aproximado de $4\ \mu\text{m}$ y en algunos casos tienen un orificio al medio, situación anteriormente observada y asignado a una transición sólido-sólido^[110] desde un estado de mayor a uno de menor densidad. Estos cristales son lisos situación distinta a la que se observa a 8 horas de cristalización, **Figura 3.2.13 b**, donde las estructuras romboédricas en algunas caras están redondeadas y todas las caras están formadas por planos cristalino orientados de dimensiones nanométricas, semejante

a lo descrito en algunas estructuras producidas por seres vivos [111]. Este ordenamiento es responsable de su carácter rugoso. Además, dentro de uno de los planos se observa una serie de cristales de aragonita de forma de aguja que crecen desde el cristal de calcita.

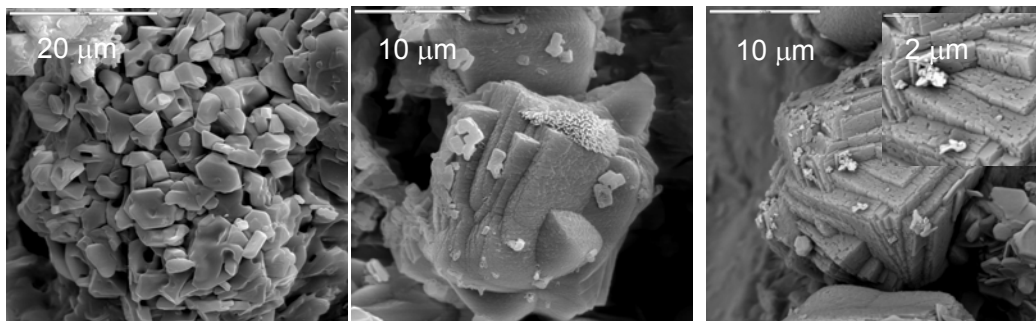


Figura 3.2.13. Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (2/1) a diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas.

Los cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, **Figura 3.2.13 c**, son muy parecido al los que se obtienen a 8 horas (**Figura 3.2.13 b**), pero en este caso, no se obtuvieron caras redondeadas pero si la misma estructura rugosa producto del tipo de crecimiento en capas nanométricas.

El análisis FTIR no muestra la presencia de ningún otro tipo de polimorfo a parte de calcita aunque la imagen de SEM, **Figura 3.2.13 b**, muestra la presencia de aragonita, donde su concentración es muy baja para ser detectada por este método.

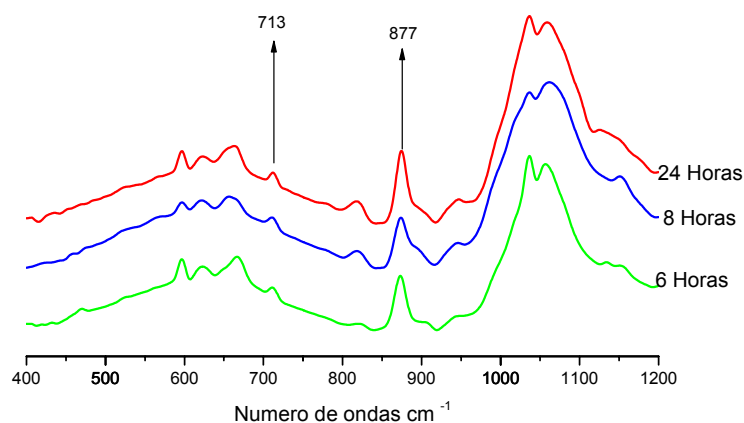


Figura 3.2.14. Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (2/1) usado como agente mineralizador a 6, 8 y 24 horas de cristalización.

Mezcla Qui/Alg 3/1.

A 6 horas de cristalización, **Figura 3.2.15 a**, los aglomerados obtenidos son vateritas con estructuras semiesféricas y lisas y con un orificio en el medio. Esto indica la ocurrencia de la transición desde un estado amorfo^[110] a uno cristalino. En la circunferencia de estas esferas se distinguen aglomeraciones de cristales aciculares. Al aumentar el tiempo a 8 horas, **Figura 3.2.15 b**, se observan estructuras romboédricas de calcitas con una textura granular y además las mismas semiesferas observadas a 6 horas de cristalización, pero en este caso, sin un orden predeterminado. A las 24 horas de cristalización, **Figura 3.2.15 c**, las estructuras obtenidas son bastante diferentes a las obtenidas a 8 horas. En ellas se observan aglomerados circulares pero que en el interior están formados por estructuras aciculares y aglomeradas de un espesor menor que 100 nm.

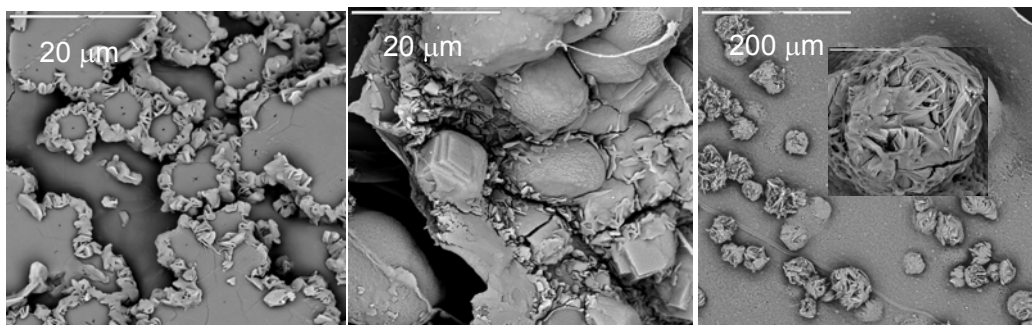


Figura 3.2.15. Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidas usando como agente mineralizador la mezcla Qui/Alg (3/1) a diferentes tiempos de cristalización: a) 6 horas; b) 8 horas y c) 24 horas.

El análisis FTIR, **Figura 3.2.16.**, muestra que a 6 horas de cristalización es posible detectar las bandas de absorción a 877 cm^{-1} y 745 cm^{-1} características del polimorfo vaterita y a 713 cm^{-1} y 858 cm^{-1} características del polimorfo aragonita. Este última banda de absorción aparece como un hombro pues se encuentra fuertemente apantallada por la banda de 877 cm^{-1} . Además aparecen las bandas de absorción a 680 cm^{-1} , 614 cm^{-1} y 572 cm^{-1} correspondientes a $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Estos resultados hacen suponer que las estructuras que rodean a las vateritas semiesféricas están compuestas por esta última fase de CaCO_3 . Los resultados para 8 horas

muestran que ya no se observa la banda de absorción de vaterita a 745 cm^{-1} pero si aparece claramente la banda de absorción correspondiente a calcita en 713 cm^{-1} .

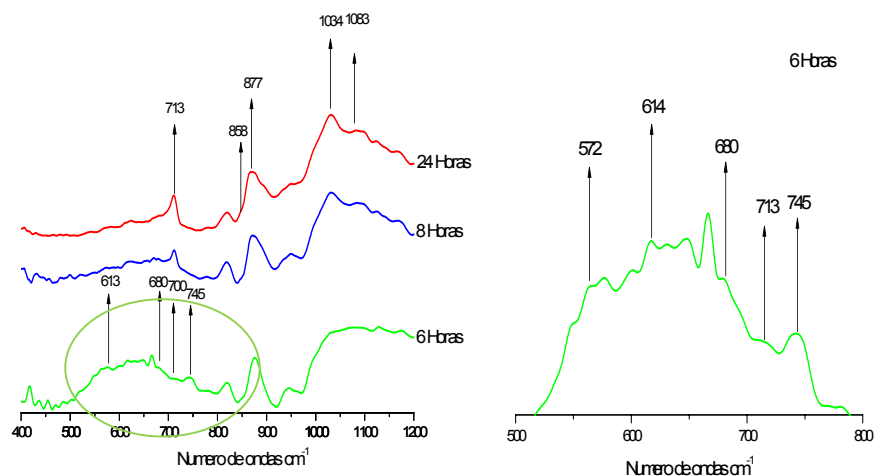


Figura 3.2.16. Espectro FTIR para la mezcla Qui/Alg (3/1) usado como agente mineralizador a 6, 8 y 24 horas de cristalización y una ampliación del espectro a 6 horas entre 500 cm^{-1} y 800 cm^{-1} .

Después de 24 horas de cristalización, las bandas de absorción a 1034 cm^{-1} y 1083 cm^{-1} se resuelven mejor, ambas señales son atribuidas a aragonita. De esta manera, se confirma que los aglomerados aciculares observados en **Figura 3.2.15 c** están compuestos por este polimorfo.

Tabla 8. Resumen de las morfologías y polimorfos obtenidos utilizando como agente mineralizador mezclas de quitosano y alginato liofilizados.

Composición de mezcla de Qui/Alg usado como agente mineralizador	Tiempo de Cristalización (Horas)	Morfología	Polimorfos
1/1	6	Acicular	A
1/1	8	Placas	C, V y $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1/1	24	Semiesferas	V
1/2	6	Placas	C
1/2	8	Esferas	C y V
1/2	24	Semiesferas y romboedros	C, V y $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
1/3	6	Semiesferas	V
1/3	8	Semiesferas, esferas romboedros texturado	V y C
1/3	24	Semiesferas, esferas romboedros texturado	V y C
2/1	6	Romboedros con un orificio	C
2/1	8	Romboedros con vértices curvos texturados	C
2/1	24	Romboedro texturados	C
3/1	6	Semiesferas con un orificio al medio y rodeada de laminas	V, A y $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
3/1	8	Romboedros texturados, laminas y esferas	C y V
3/1	24	Estructuras aciculares esféricas	C, A

Todos los biopolímeros utilizados como agente mineralizador en sus 2 concentraciones fueron capaces de estabilizar los polimorfos de vaterita y calcita, situación que también se observa para las mezclas de Qui y Alg. Sin embargo, al usar como agente mineralizador las mezclas de Qui/Alg se logró estabilizar los polimorfos metaestable de carbonato de calcio. Específicamente, el uso de la mezcla Qui/Alg (1/1) permitió estabilizar el polimorfo aragonita. Al usar una mezcla de composición diferente, Qui/Alg (3/1), se logró obtener además de aragonita, el carbonato de calcio hexahidratado ($\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). La factibilidad de que se pueda obtener mezclas compatibles y homogéneas de Qui y Alg se sustenta en la interacción de los grupos funcionales amino protonado del quitosano y grupos carboxilados del alginato. Esta interacción modifica la densidad de cargas locales que poseen normalmente estos biopolímeros. Como consecuencia de lo anterior, se modifica la sobresaturación de iones de calcio en la superficie del agente mineralizador. La existencia de sobresaturación de iones de calcio probablemente permite estabilizar los polimorfos metaestables de carbonato de calcio como son aragonita y vaterita, además de un polimorfo de transición como es $\text{CaCO}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. La mayor afinidad que poseen los grupos carboxilos del alginato por el ión calcio dió como resultado una mayor tendencia a la formación de vaterita por sobre calcita, aunque este último polimorfo también es detectado aunque su tamaño es muy pequeño. Esta tendencia también se observó en el caso de las mezclas donde la relación de alginato es mayor.

3.3. Cristalización de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador sulfato de quitosano

3.3.1. Síntesis de sulfato de quitosano

La síntesis del sulfato de Qui (QuiS) se realizó por reacción con ácido sulfúrico. Las condiciones de la reacción se encuentran en la sección 2.5.^[76]

El proceso dio como resultado dos productos, uno soluble en agua (QuiS) y otro que precipito en la membrana de diálisis (R1) los que se caracterizaron por FTIR.

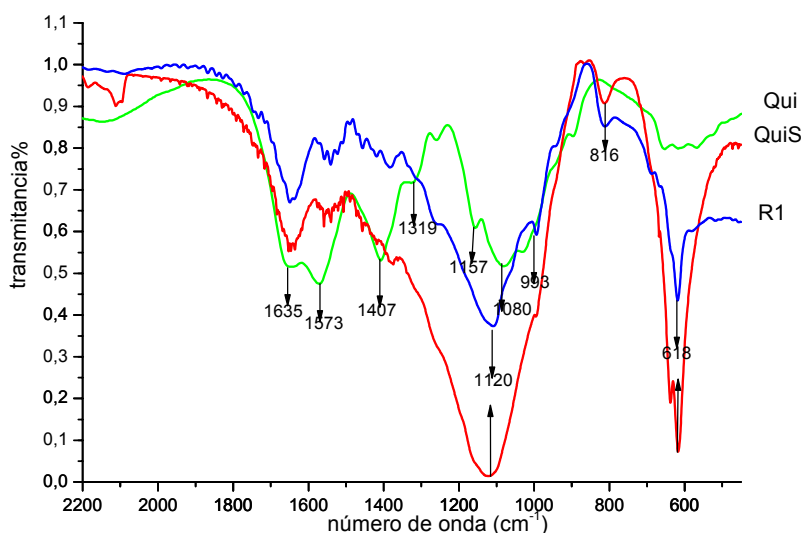


Figura 3.3.1 Espectro FTIR de Qui, sulfato de quitosano (QuiS) y otro producto obtenido (R1) en la síntesis de sulfato de quitosano en pastillas de KBr.

En la **Figura 3.3.1** se comparan los espectros de los productos obtenidos en la reacción de sulfatación de Qui entre 2200 y 450 cm^{-1} . Para el espectro FTIR de Qui se distinguen las bandas características en 1635 cm^{-1} de la amida I, 1573 cm^{-1} amida II $\delta(\text{NH}_2)$, 1407 cm^{-1} $\delta(\text{CH}_2) + \delta(\text{CH}_3)$, 1319 cm^{-1} $\delta(\text{CH})$, 1157 cm^{-1} ν asimétrico del enlace (C–O–C) y en 1080 cm^{-1} ν simétrico del enlace (C–O–C) del anillo de la piranosa^[123].

Para R1 y QuiS las bandas de absorción en 1573 cm^{-1} no se observa y la de 1319 cm^{-1} , 1157 cm^{-1} y 1080 cm^{-1} son apantalladas por la fuerte absorción en 1120 cm^{-1} . Esta última se

debe al *stretching* del grupo C-O-S. Además, la aparición de nuevas bandas de absorción en 816 cm^{-1} correspondiente a la sustitución en el carbono 6 ^[124] y en 618 cm^{-1} atribuida al *bending* de grupo sulfato^[125] confirman que la reacción de sulfatación ha ocurrido efectivamente.

Al compara los espectros de QuiS y R1, se observa que las intensidades de las bandas de absorción en 1120 cm^{-1} , 816 cm^{-1} y 618 cm^{-1} son menores para R1 que para QuiS, indicando que el grado de sulfatación que posee R1 es menor que el producto principal (QuiS). Este hecho es congruente con la diferencia de solubilidad de los productos obtenidos en la reacción de sulfatación de quitosano, donde a mayor grado de sulfatación la solubilidad es mayor. El producto R1 es poco soluble en agua y corresponde a quitosano de menor grado de sulfatación, lo que está de acuerdo con que a una menor sulfatación el biopolímero sea menos soluble y por eso R1 precipite sobre la membrana de diálisis.

3.3.2. Estudio de cristalización de CaCO_3 usando R1 y/o QuiS como agente mineralizador

Ambos productos R1 y QuiS fueron usados como agente mineralizador para la biomineralización de carbonato de calcio por un periodo de 24 horas y empleando el método I de cristalización. Los cristales obtenidos se presentan en la **Figura 3.3.2**.

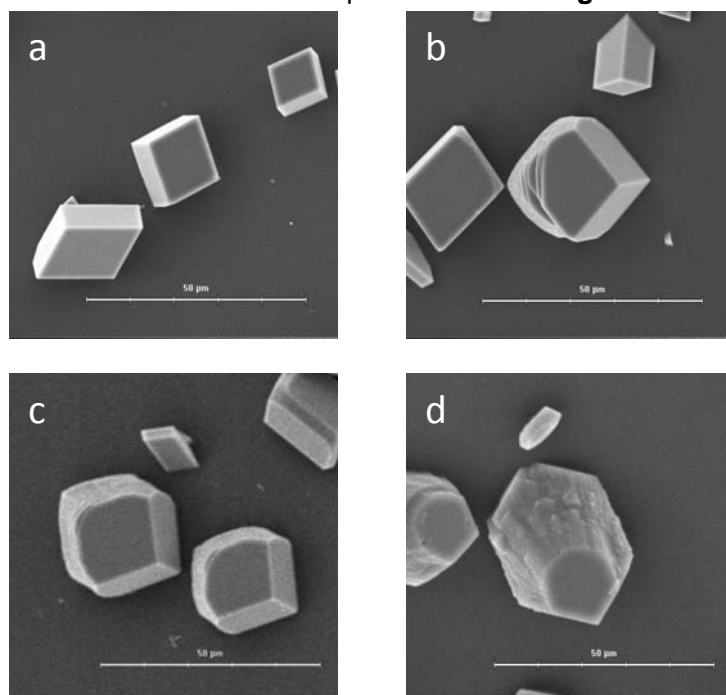


Figura 3.3.2 Cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización y usando R1 o QuiS como agente mineralizador: a) Blanco; b) R1 en presencia de agua; c) R1 y d) QuiS.

Los cristales obtenidos en presencia de R1 y QuiS poseen estructuras romboédricas lo que estaría acorde con el polimorfo de calcita ^[126] (**Figura 3.3.2. a**). Sin embargo, todos muestran modificaciones en una de las caras de los cristales (**Figuras 3.3.2 b**) y **c**). Si bien esta modificación no se incrementa al usar el producto R1 en ausencia de agua, se observa una mayor cantidad de cristales modificados.

El efecto de QuiS sobre la morfología de los cristales de carbonato de calcio es mucho más notorio en comparación con R1 (**Figura 3.3.2. (d)**). Este efecto se ve reflejado en un aumento en la longitud de la diagonal de los cristales (**Figura 3.3.3**).

La diagonal para el blanco mide aprox. 25 μm al igual que los cristales obtenidos en presencia de R1, pero en el caso de QuiS es de 35 μm . El aumento de la longitud de la diagonal esta asociada al crecimiento de los planos cristalinos $\{104\}$ ^[109].

El mayor efecto generado por QuiS esta directamente asociado al mayor número de grupos sulfatos que posee en comparación con R1. Modificaciones similares ha

sido reportado al usar como agente mineralizador un aminoácido que posee grupos carboxilos ^[126].

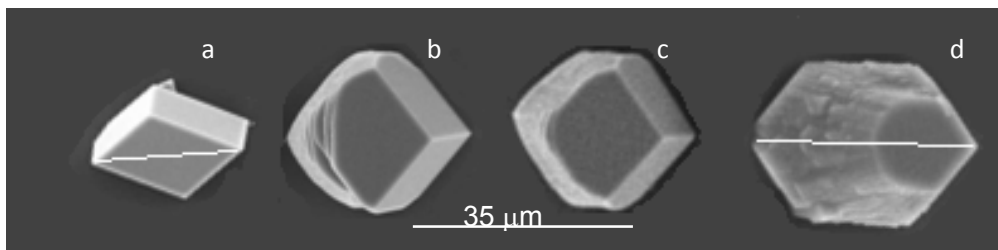


Figura 3.3.3. Diferencia de la longitud diagonal de los cristales de carbonato de calcio obtenidos a 24 horas de cristalización en presencia de R1 y QuiS como agente mineralizador: a) Blanco b); R1 en presencia de agua: c) R1 y d) QuiS.

3.4. Modificación de quitosano mediante injerto y su uso como agente mineralizador para el estudio de cristalización de carbonato de calcio

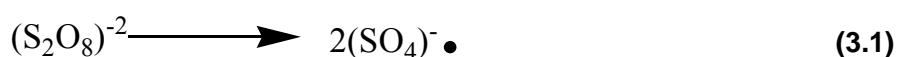
El rol de los grupos funcionales, existentes en las macromoléculas, que son susceptibles a ser cargados, es fundamental en los procesos de biomineralización. Este aspecto ha sido discutido anteriormente en el capítulo I, sección 1.3.3.

3.4.1. Injerto de acrilamida o ácido acrílico en quitosano

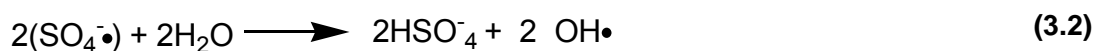
El quitosano puede ser modificado mediante reacciones de injerto de un monómero vinílico que contiene determinados grupos funcionales. El objetivo de esta modificación es introducir nuevos grupos funcionales en las cadenas de este biopolímero^[127] y al mismo tiempo incrementar el número y tipo de grupos funcionales, lo que podrían afectar el proceso de cristalización de carbonato de calcio.

Para la síntesis de quitosano modificado por injerto se utilizaron dos monómeros distintos: ácido acrílico y acrilamida a dos concentraciones diferentes de persulfato de potasio (KPS) como iniciador de la reacción de polimerización.

El persulfato es utilizado frecuentemente como iniciador redox para los procesos de polimerización en soluciones acuosas. El proceso de formación del radical está compuesto por una serie de etapas iniciadas por la descomposición térmica. **Ecuación 3.1**

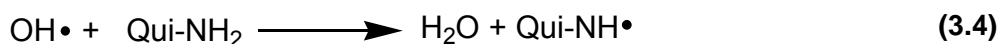


El ión radical sulfato en combinación con el agua produce el radical hidroxilo **Ecuación 3.2** el que recombinándose produce agua **Ecuación 3.3**,



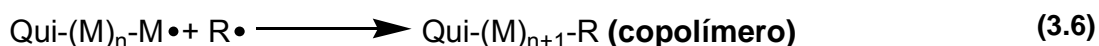
La formación y participación de los radicales $\bullet\text{OH}$ en reacciones de injerto de monómeros vinílicos iniciados por KPS en celulosa ha sido reportado por un gran número de investigadores [128].

El posible mecanismo de la formación de sitios radicalarios sobre Qui puede ser postulado por analogía con la celulosa y considerando que el Qui puede actuar como un agente reductor débil, las principales reacciones que conducen al injerto de un monómero vinílico sobre este biopolímero, son:



, donde: Qui-H representa al biopolímero de Qui, Qui \bullet representa el radical del Qui, M es un monómero vinílico y P \bullet el radical del homopolímero de M.

Las reacciones que ponen término al crecimiento de las cadenas injertadas y de homopolimerización son las siguientes:



Donde R \bullet representa OH \bullet , SO₄⁻ \bullet .

Se utilizaron quitosanos de alto peso molecular (QuiAPM) y de bajo peso molecular (QuiBPM). El procedimiento de esta síntesis y la purificación de quitosanos modificados se han descrito en las secciones 2.6 y 2.6.1 respectivamente. Los parámetros de injerto, (**sección 2.6.2**), como son el porcentaje de injerto (%G), la eficiencia de injerto (%E) y la razón entre la longitud de la

cadena de polímero vinílico injertada y la longitud de la cadena del quitosano (R) para poliacrilamida y poli (ácido acrílico) esto se encuentra resumido en las **Tablas 9 y 10**, respectivamente.

Los parámetros calculados para el quitosano injertado con poliacrilamida (Qui-g-PAAM) presentado en la **Tabla 9**, muestran valores similares para las dos concentraciones de iniciador y utilizando quitosano de alto peso molecular. La situación es distinta cuando se emplea quitosano de bajo peso molecular, donde el valor de eficiencia de injerto para la concentración más alta de iniciador es menor en comparación con el porcentaje injerto cuando se utilizó una concentración menor de iniciador. No hemos encontrado una explicación racional para este comportamiento.

Tabla 9. Parámetros de injerto obtenidos para Quitosano injertado con poliacrilamida y usando dos concentraciones diferentes de iniciador ($K_2S_2O_8$).

	QuiAPM		QuiBPM	
	$[K_2S_2O_8] 1 \times 10^{-2}$ (M)	$[K_2S_2O_8] 2 \times 10^{-2}$ (M)	$[K_2S_2O_8] 1 \times 10^{-2}$ (M)	$[K_2S_2O_8] 2 \times 10^{-2}$ (M)
%G	129	125	127	73
%E	53,8	52,1	52,9	30,6
R	2,9	2,8	2,9	1,7

Una situación contraria se presenta para el injerto de poli (ácido acrílico) en quitosano (Qui-g-PAA) (**Tabla 10**). En este caso los parámetros son prácticamente los mismos para ambas concentraciones de iniciador cuando se utiliza quitosano de bajo peso molecular, pero el quitosano de alto peso molecular muestra valores de un 80% menor para la concentración mayor de $K_2S_2O_8$. En ambos casos las cadenas más cortas mostraron ser menos eficientes.

Tabla 10. Parámetros obtenidos para Quitosano injertado con poli (ácido acrílico) y usando dos concentraciones diferentes de iniciador ($K_2S_2O_8$)

	QuiAPM		QuiBPM	
	$[K_2S_2O_8] 1 \times 10^{-2}$ (M)	$[K_2S_2O_8] 2 \times 10^{-2}$ (M)	$[K_2S_2O_8] 1 \times 10^{-2}$ (M)	$[K_2S_2O_8] 2 \times 10^{-2}$ (M)
%G	205	179	266	244
%E	61,4	53,7	79,9	73,4
R	4,6	4	6	5,5

Evidencia de injerto mediante análisis FTIR

Si bien el aumento del peso molecular del quitosano después de la reacción de injerto con respecto al peso inicial del quitosano usado como sustrato para injertar es indicio de que la reacción ha ocurrido, la existencia del injerto puede ser confirmada por análisis FTIR en base a la presencia de absorciones de grupos funcionales específicos provenientes de los grupos o cadenas injertadas.

En el espectro FTIR de Qui (**Figura 3.4.1**), se distinguen las bandas de absorción características a 3432 cm^{-1} (O-H *stretching* apantallando al N-H), 2923 cm^{-1} y 2881 cm^{-1} (C-H *stretching*), 1645 cm^{-1} (amida I, C-O *stretching* del grupo acetilo), 1577 cm^{-1} (amida II, N-H *stretching*), 1380 cm^{-1} (*bending* asimétrico del C-H del grupo CH_2) y 1076 cm^{-1} (*stretching* del puente de oxígeno del enlace glucosamina) ^[123].

En el espectro de quitosano injertado con acrilamida (**Figura 3.4.1**), además de las bandas de absorción características del quitosano, aparece una nueva banda de absorción en 1673 cm^{-1} que corresponde al grupo carbonilo de la poliacrilamida, lo que confirma la existencia de cadenas de poliacrilamida injertadas en quitosano. Esta misma banda de absorción aparece en 1670 cm^{-1} para el homopolímero de acrilamida. Por otro lado, las bandas de absorción en 1577

cm^{-1} y 1645 cm^{-1} correspondiente a amida I y II del quitosano son apantalladas por la fuerte absorción del grupo carbonilo de la PAAM.

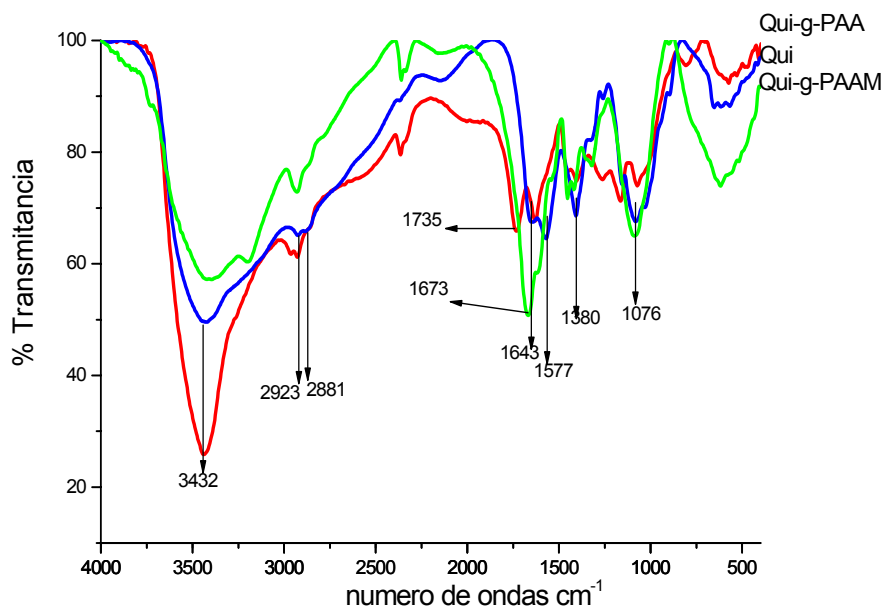


Figura 3.4.1. FTIR de Qui, Qui-g-PAA y Qui-g-PAAM en pastillas de KBr.

Para el quitosano injertado con poli (ácido acrílico) (PAA), la banda de absorción del grupo carbonilo del PAA aparece en 1735 cm^{-1} . La aparición de esta nueva banda de absorción en el espectro de quitosano modificado con el ácido acrílico junto con el corrimiento de la banda de absorción en 1380 cm^{-1} (amida II) confirma el injerto de este monómero.

3.4.2. Estudio de cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador quitosanos modificados por injerto

Los quitosanos modificados por injerto fueron empleados como agente mineralizador para el estudio de cristalización de carbonato de calcio utilizando el método I por periodos de 24 y 48 horas. Además, se utilizó el quitosano sin modificar como experimento de control. Los cristales obtenidos fueron observados por SEM (**Figura 3.4.2**).

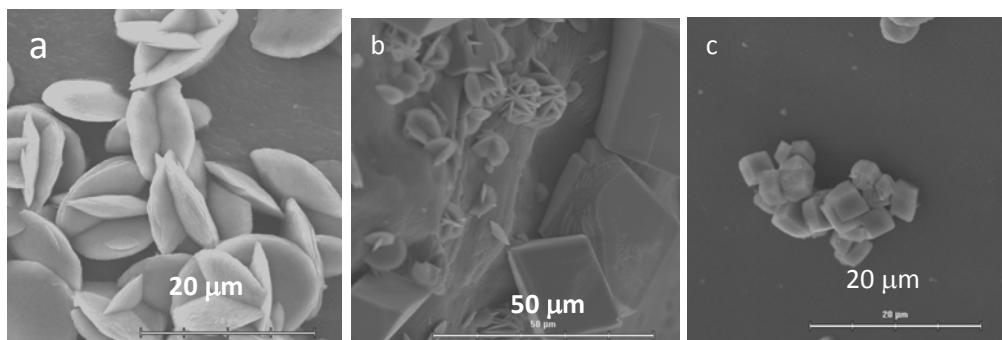


Figura 3.4.2. Micrografías SEM de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando: a) quitosano de alto peso molecular y 24 horas de cristalización; b) quitosano de alto peso molecular y 48 horas de cristalización y c) quitosano de bajo peso molecular y 24 horas de cristalización.

Los cristales de CaCO_3 en presencia de Qui de alto peso molecular, (QAPM), muestran una morfología similar a tabletas (**Figura 3.4.2 a**) esta estructura se ha caracterizado como vaterita [129]. Además es posible observar a 48 horas no sólo vaterita sino que también calcitas romboédricas (**Figura 3.4.2 b**). Al usar Qui de bajo peso molecular (QBPM), no se observa vateritas, sólo calcitas aisladas. Esto hace suponer que la capacidad de mantener una alta sobresaturación disminuye con la disminución del peso molecular, lo que evitaría la estabilización de un polimorfo metaestable como la vaterita. [15]

3.4.3. Cristalización de carbonato de calcio sobre quitosano injertado con poli (ácido acrílico) (Qui-g-PAA)

Los cristales obtenidos en presencia de Qui-g-PAA demuestran la influencia de los grupos funcionales carboxilos sobre la cristalización. El resultado obtenido al usar QuiAPM son estructuras muy pequeñas sin una forma definida (**Figura 3.4.3 a**). Este efecto se incrementa al aumentar la concentración inicial del iniciador en la reacción de injerto (**Figura 3.4.3 b**).

El uso de un agente mineralizador obtenido mediante la modificación de un Qui de bajo peso molecular (QuiBPM) genera estructuras de CaCO_3 con una morfología tipo toroide (**Figura 3.4.3 c**) [130], las que decrecen en tamaño (**Figura 3.4.3 d**) al usar un agente mineralizador obtenido

mediante la modificación de quitosano por injerto donde se utilizó la mayor concentración de iniciador (**Tabla 10**).

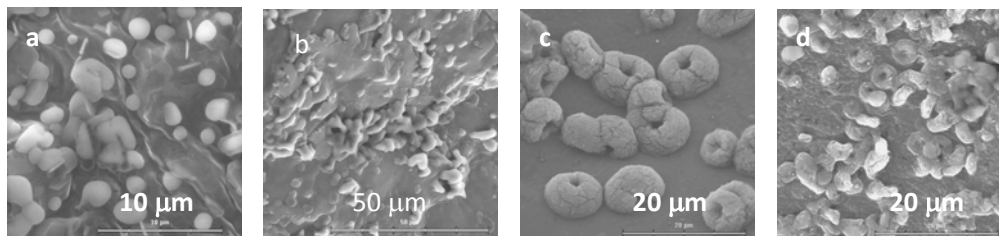


Figura 3.4.3. Micrográficas SEM de cristales de carbonato de calcio obtenidos usando como agente mineralizador: a) QuiAPM-g-PAA usando 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; b) QuiAPM-g-PAA usando 2×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; c) QuiBPM-g-PAA usando 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; d) QuiBPM-g-PAA usando 2×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización.

El orificio observado en las estructuras de las **Figura 3.4.3 c y d** puede ser producto del proceso de transición sólido-sólido desde un fase de mayor densidad a una de menor.^[110]

Si bien el análisis de DRX no muestra ninguna señal definida (**Figura 3.4.4**), esto podría sugerir que esta estructura es un tipo de aglomerado amorfo, situación difícil de comprobar debido a la baja concentración y pequeño tamaño de estos aglomerados de carbonato de calcio.

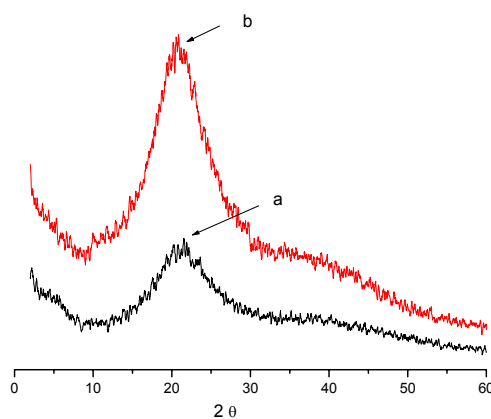


Figura 3.4.4. Patrones de DRX para: a) QuiBPM y b) Aglomerados de CaCO_3 obtenidas utilizando QuiBPM-g-PAA .

Al observar con detenimiento estos aglomerados, no se distingue ninguna estructura prismática que pudiera sugerir la presencia de calcita o aragonita, es más factible que sea vaterita lo que tendría relación de alguna manera con la presencia de los grupos carboxilatos que incrementaría la sobresaturación local de iones de calcio y así estabilizar una fase metaestable como la vaterita^[15].

Por otro lado, al usar un agente mineralizador obtenido mediante la modificación de quitosano en la cual se utilizó la mayor concentración de iniciador (KPS), generó un efecto inhibitor de la cristalización ya que se observa una disminución de los tamaños de los aglomerados^[131].

3.4.4. Cristalización de carbonato de calcio sobre quitosano injertado con poliacrilamida (Qui-g-PAAM)

Las estructuras obtenidas a 24 horas de cristalización y utilizando como agente mineralizador quitosano de bajo peso molecular injertado con PAAM con 1×10^{-2} M de iniciador (**Figura 3.4.2 a**), presentan una forma similar (vaterita) a la observada en **Figura 3.4.5 a**, pero en este caso se encuentran aglomeradas en torno a una franja, la que podría ser inducida por una mayor concentración local del injerto. Esta mayor concentración local podría explicar de alguna manera la estabilización de la fase metaestable vaterita^[15].

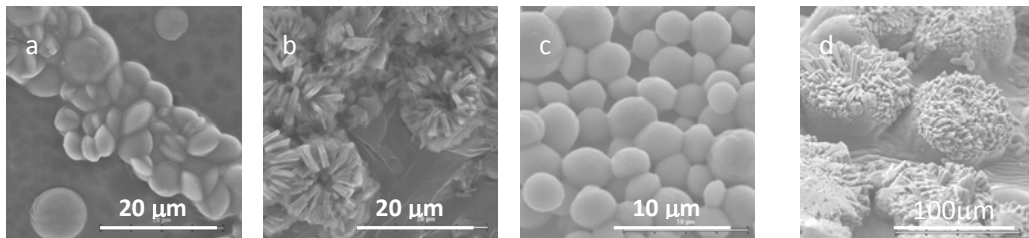


Figura 3.4.5 Micrografías SEM de aglomerado de sales de calcio obtenidos usando quitosano injertado con poliacrilamida como agente mineralizador: a) QuiBPM-g-PAAM con 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; b) y c) QuiBPM-g-PAAM con 2×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización; d) QuiAPM-g-PAAM con 1×10^{-2} M de iniciador y 24 horas de cristalización.

Claramente, el incremento de la concentración del iniciador genera un cambio en el agente mineralizador, lo que se manifiesta en las diferentes estructuras de las sales de calcio obtenidas. En la **Figura 3.4.5 c** se distingue con claridad cristales esféricos que son identificados como vaterita. En otra zona (**Figura 3.4.5 b**) se observa estructuras con forma de flor. Esta morfología no corresponde a ninguna estructura estándar de CaCO_3 descrita en la literatura, pues como se discute a continuación corresponde a CaSO_4 debido al uso de KPS con iniciador de la polimerización

Cuando se utiliza el sustrato Qui-g-PAAM preparado a partir de QAPM con 1×10^{-2} M de iniciador, los cristales obtenidos tienen forma de paralelepípedos los que se ordenan formando un mesocristal (**Figura 3.4.5 d**).

El análisis de DRX (**Figura 3.4.6**) nos da cuenta que el aglomerado de cristales obtenidos con forma de flor no corresponde a CaCO_3 sino que a $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

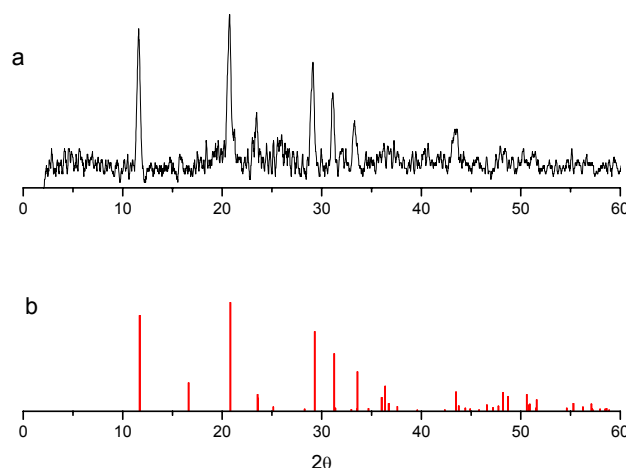


Figura 3.4.6. Patrón de DRX de: a) cristales obtenidos usando Qui-g-PAAM como agente mineralizador; b) patrón de difracción de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

El origen de los grupos SO_4^{-2} se debe a que en este caso el iniciador utilizado para la reacción de injerto fue $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. La descomposición térmica de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ en presencia de agua produce como producto final grupos sulfatos que pueden generar sulfato de calcio. **Página 95**

A pesar del proceso de purificación realizado al quitosano injertado mediante un lavado exhaustivo, no fue posible extraer todo el residuo (ión sulfato) producto de la descomposición de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. La presencia de azufre en los quitosanos injertados con PAAM fue comprobada

mediante el análisis elemental. El análisis elemental realizado a los quitosanos injertados con poliacrilamida muestra la existencia de azufre (**Tabla 11**). Además en el espectro FTIR se observa la señal del grupo sulfato en 1088 cm^{-1} (**Figura 3.4.1**).

Tabla 11. Resultados del análisis elemental realizado a Qui-g-PAAM a distintas concentraciones de iniciador.

Agente de mineralización	%N	%C	%O	%S
QuiAPM-g-PAAM $1 \times 10^{-2}\text{ M K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	13,8	41,2	7,9	1,2
QuiAPM-g-PAAM $2 \times 10^{-2}\text{ M K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	12,2	39,7	7,0	1,5
QuiAPM-g-PAA $1 \times 10^{-2}\text{ M K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	1,88	47,6	7,0	0
QuiAPM-g-PAA $1 \times 10^{-2}\text{ M K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	1,68	46,8	6,0	0

La posible asociación selectiva de iones sulfato y el grupo amido de la PAAM puede impedir la remoción completa de los iones sulfato. Como consecuencia de lo anterior, se precipita $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Considerando que la constante de producto de solubilidad de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ es $3,14 \times 10^{-5}$ [132] y el de la calcita es $3,36 \times 10^{-9}$ [132], la calcita es aproximadamente 10000 veces menos soluble (más estable) que $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Sin embargo, se forma el sulfato de calcio bajo estas condiciones de cristalización.

En las estructuras obtenidas a 48 horas de cristalización se distingue una disminución en el espesor de los cristales que forman los mesocristales. Además se pueden identificar pequeñas esferas que posiblemente sean de CaCO_3 . (**Figura 3.4.7**).

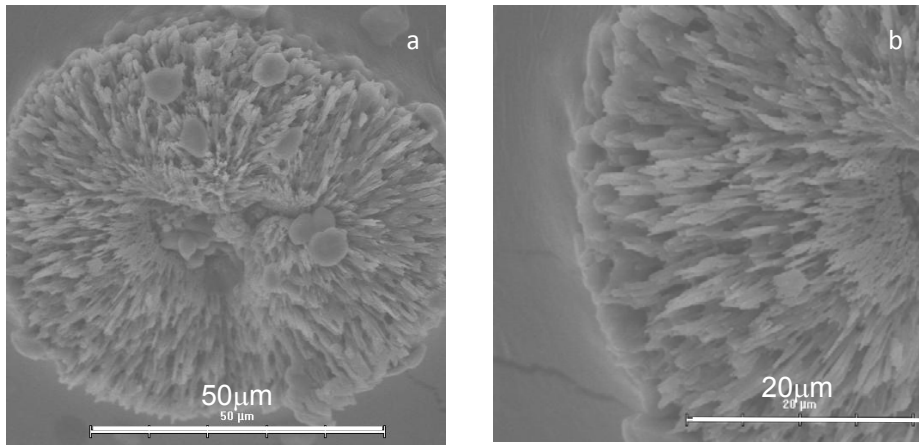


Figura 3.4.7 Micrografías SEM de aglomerado de sales de calcio obtenidos usando quitosano injertado con poliacrilamida como agente mineralizador: a) y b) QuiAPM-g-PAAM con 2×10^{-2} M de iniciador y 48 horas de cristalización.

Tabla 12. Sales de calcio obtenidos al usar diferentes quitosanos injertados como agente mineralizador.

Template	Morfología	Sales de calcio
Qui-g-PAAM (QAPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-1}	Rosetas	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$
Qui-g-PAAM (QAPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-2}	Rosetas	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$
Qui-g-PAAM (QBPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-1}	Esferas irregulares	$CaCO_3$
Qui-g-PAAM (QBPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-1}	Rosetas/ Esferas irregulares	$CaSO_4 \cdot 2H_2O$ / $CaCO_3$
Qui-g-PAA (QAPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-1}	Esferas irregulares pequeñas	$CaCO_3$
Qui-g-PAA (QAPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-2}	Esferas irregulares pequeñas	$CaCO_3$
Qui-g-PAA (QBPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-1}	Toroidal	$CaCO_3$
Qui-g-PAA (QBPM) $K_2S_2O_8$ 1×10^{-1}	Toroidal	$CaCO_3$

3.5. Estudio de cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador mezclas de quitosano con PAAM

Las mezclas se prepararon usando una solución de ácido acético al 2% p/v. Estas mezclas contenían 0,5 g de Qui, 0,2 g de acetato de calcio y cantidades variables de PAAM entre 0,1 y 0,3 g en un volumen total de 50 mL.

Durante la preparación de cada mezcla se mantuvo una purga constante de Argón con la finalidad de evitar que durante la agitación se incorpore CO_2 a la solución. Cada una de las mezclas fueron expuestas a CO_2 por períodos de 2, 4, 6, 8, 24 y 48 horas según lo descrito en el **Capítulo 2.9.1**. Las muestras mineralizadas fueron analizadas por DRX y SEM.

Todas las muestras presentan un comportamiento similar, ya que en las primeras horas de cristalización no se observa ningún aglomerado de CaCO_3 y sólo a partir de las 6 horas es posible detectar algunas estructuras no definidas. A las 8 horas de cristalización es posible distinguir depósitos formados por láminas para las concentraciones de 0,1g y 0,2 g de PAAM. A 48 horas todas las mezclas muestran aglomerados similares de CaCO_3 con tamaños cercanos a 100 μm de diámetro (**Figura 3.5.1**).

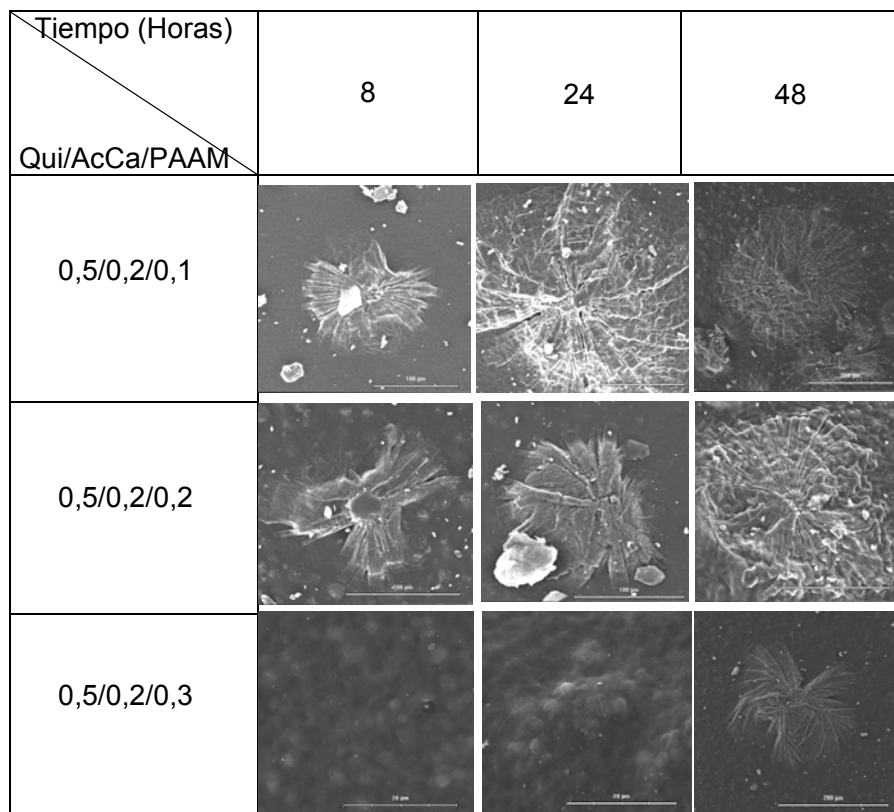


Figura 3.5.1. Micrograffías SEM de aglomerados de CaCO_3 en función del tiempo y la composición del híbrido binario Qui/AcCa/PAAM.

Si bien esta supra estructura muestra un ordenamiento similar al que posee la aragonita, las pequeñas partes que lo conforman no son cristales aciculares sino prismáticos los que podría dar señales de que son cristales de calcita. Llama la atención que la estructura recuerda un ordenamiento muy similar al observado en la estructura del nácar^[133, 134].

El análisis de DRX, **Figura 3.5.2**, nos muestra que los aglomerados con crecimiento radial están formados por calcitas, ya que se observa el pico en 2θ $29,5^\circ$ característico del plano {104} de este polimorfo. Sin embargo, estas señales tienen intensidades distintas dependiendo de la cantidad de PAAM en la mezcla. Cuando la cantidad de PAAM en la mezcla es 0,3 g, la señal

es difícil de detectar debido a su baja intensidad. La situación es diferente cuando la cantidad de PAAM es menor que 0,3 g.

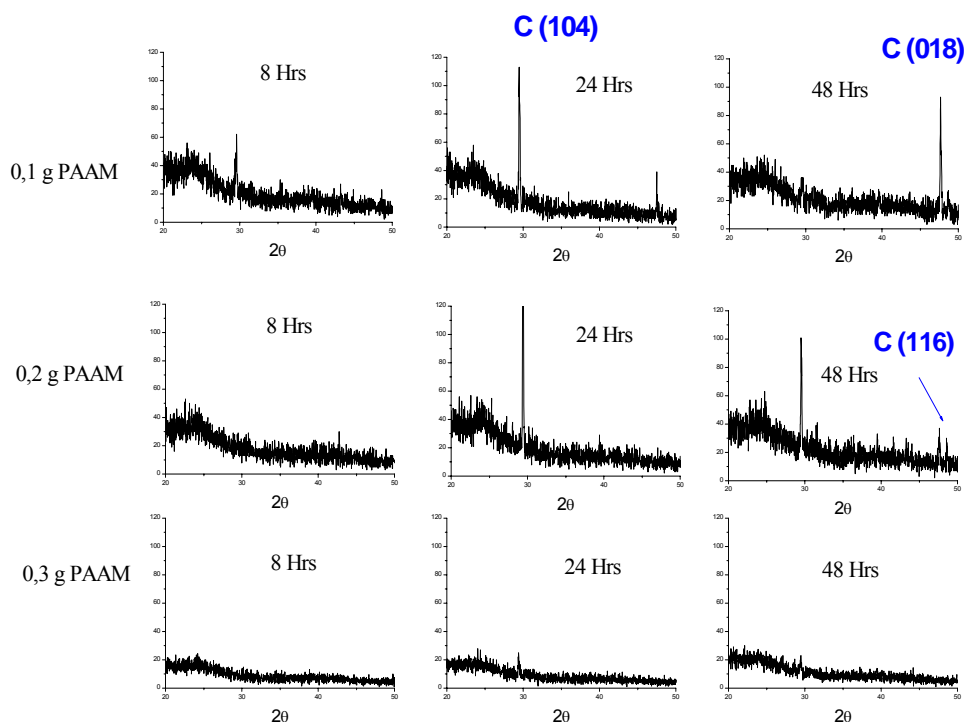


Figura 3.5.2. Patrones de DRX de cristales de carbonato de calcio obtenido al usar mezclas de Qui/AcCa /PAAM conteniendo diferentes cantidades de PAAM y a diferentes tiempos de cristalización.

Para ambas cantidades, 0,1 g y 0,2 g de PAAM y 24 horas de cristalización, la señal correspondiente al plano {104} de calcita es claramente identificable, pero a 48 horas de cristalización ocurren cambios. Cuando la cantidad de PAMM es de 0,2 g la señal del plano {104} experimenta una baja en su intensidad con respecto a la obtenida en 24 horas pero se incrementa la intensidad de la señal en $2\theta = 47,5^\circ$ que corresponde al plano {018} de calcita^[21]. Esta señal no fue detectada anteriormente, lo que hace suponer que pudo haber ocurrido un cambio de orientación de la calcita en estas condiciones. Para el sustrato donde la cantidad de PAAM es 0,1 g y a 24 horas de cristalización, la señal del plano {104} está acompañada por la señal del plano {018}, pero a 48 horas de exposición ocurre un incremento de la intensidad de

esta señal en desmedro de la señal del plano {104}, incluso siendo esta ultima difícil de detectar (**Figura 3.5.3**).

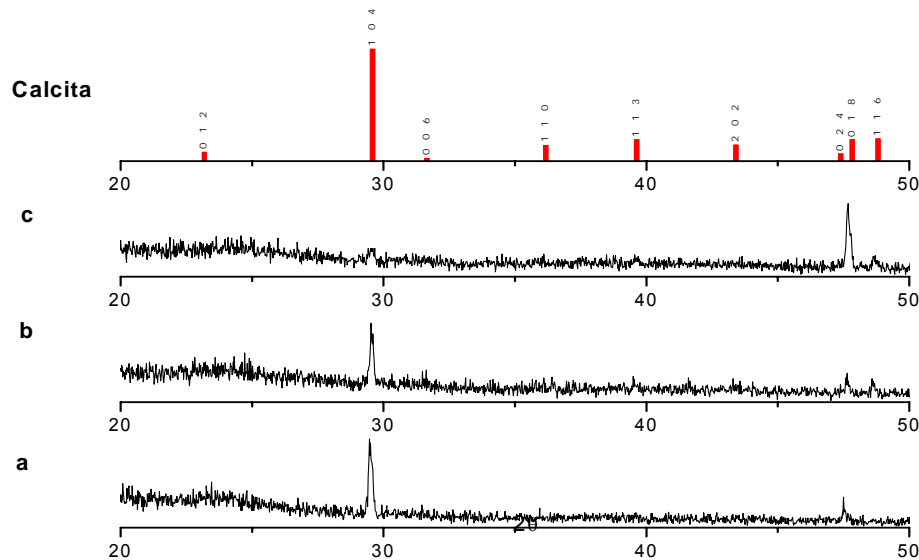


Figura 3.5.3. Patrones de difracción de rayos x de carbonato de calcio obtenido al usar como agente mineralizador mezclas de Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/PAAM) conteniendo diferentes cantidades de PAAM y comparación con el patrón de DRX de Calcita: a) 0,1g de PAAM y 24 horas de cristalización; b) 0,2 g de PAAM y 48 horas de cristalización; c) 0,1g de PAAM y 48 horas de cristalización.

Por otro lado, en la naturaleza los bivalvos perteneciente a la familia de los Ostreoides tienen una concha formada por calcitas ordenadas en forma laminar.^[120]

Los aglomerados de cristales de carbonato de calcio obtenidos al usar Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,1) como agente mineralizador y a 48 horas de cristalización muestran un ordenamiento similar al que se observa en la concha de estos seres vivos, (**Figura 3.5.4. a, b, c**).

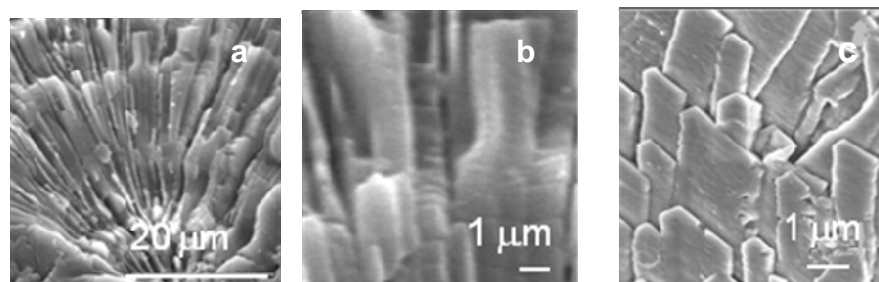


Figura 3.5.4. Micrografías SEM de estructuras tipo nácar formado por calcita obtenidos a 48 horas de cristalización: a) y b) obtenidas usando Qui/ AcCa / PAAM (0,5/0,2/0,1); c) *Ostrea edulis* Linnaeus.

Cada una de estas estructuras está ordenada, como hemos mencionado antes, por láminas formadas por monocristales de calcita. Al observar con un mayor aumento la **Figura 3.5.4 a**, se puede detectar los desplazamientos para las estructuras obtenidas (**Figura 3.5.4 b**). Este resultado también se observa al utilizar como agente mineralizador Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,2) a 48 horas de mineralización (**Figura 3.5.5 a**), pero no se obtiene al usar Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,3), (**Figura 3.5.5 b**).

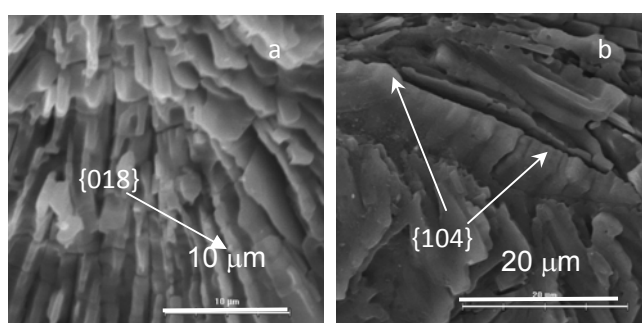
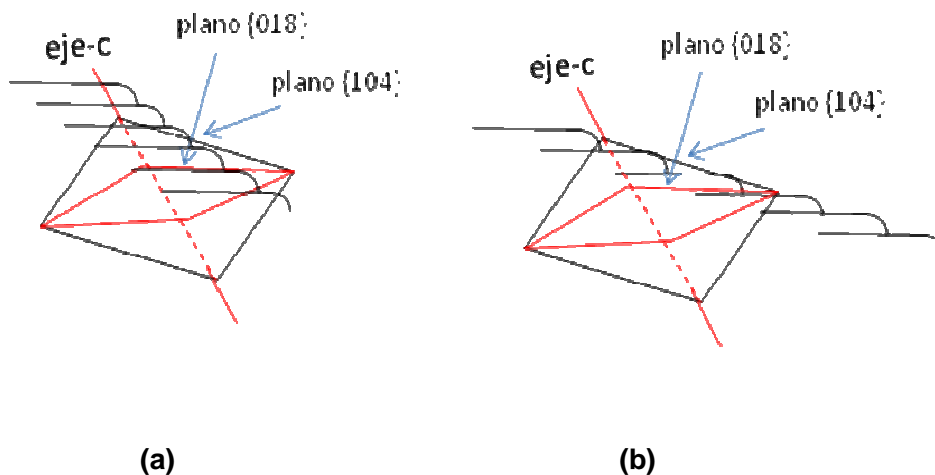


Figura 3.5.5. Micrografías SEM de aglomerados de CaCO_3 obtenidos a 48 horas de cristalización y utilizando como agente mineralizador: a) Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,2) y b) Qui/AcCa/PAAM (0,5/0,2/0,3).

Los análisis DRX muestran que a menor proporción de PAAM en la mezcla Qui/AcCa/PAAM, la intensidad de la señal del plano {018} de calcita es mayor. La mayor intensidad de la señal en $47,8^\circ 2\theta$ en el patrón de DRX es producto de una orientación en el plano {018}.

El **Esquema 3.5.1** muestra los dos posibles desplazamientos de los planos cristalinos de los aglomerados de la calcita. El plano más expuesto es el $\{104\}$ que es el que normalmente se observa (**Esquema 3.5.1 a**). Cuando existe un desplazamiento en la estructura del aglomerado, el plano más expuesto es el $\{018\}$, (**Esquema 3.5.1 b**).



Esquema 3.5.1. Esquema de aglomerados de CaCO_3 con diferente orientación cristalina: a) orientado en el plano $\{104\}$ y b) orientado en plano $\{018\}$.

Por otra parte, la distancia entre los átomos de calcio en la celda unitaria para el plano $\{104\}$ es $4,941 \text{ \AA}$ y $4,005 \text{ \AA}$ y para el plano $\{018\}$ es $4,941 \text{ \AA}$ y $6,3601 \text{ \AA}$.^[21] Esto significa que existe una menor distancia interatómica para el plano $\{104\}$ que para el plano $\{018\}$, (**Figura 3.5.6**). Un mayor número de grupos amidos en la mezcla Qui/AcCa/PAAM haría más factible la formación de un plano en el que los átomos de calcio se encuentran a una menor distancia, plano más denso. De esta manera, es probable que a una menor proporción de PAAM en la mezcla exista una mayor distancia entre grupos amidos, lo que proporcionaría una distribución de cargas que estaría de acuerdo con las distancias del plano $\{018\}$.

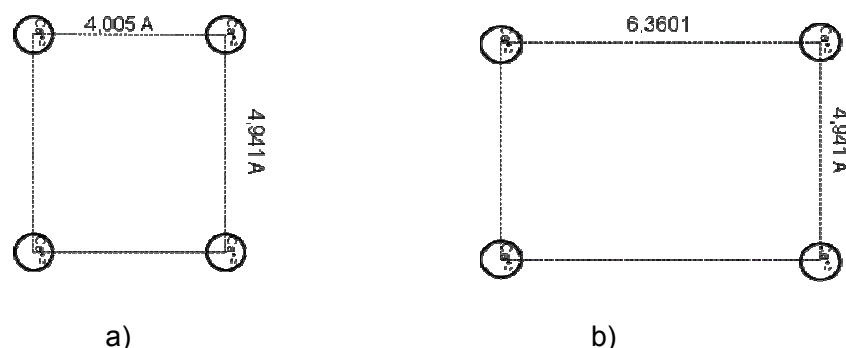


Figura 3.5.6. Distancias entre los átomos de calcio en la celda unitaria de calcita para los planos: a) {104} y b) {018}.

Se ha observado que los polímeros en solución muestran diferentes conformaciones dependiendo de su concentración. Estas conformaciones van desde lo que se conoce como un ovillo estadístico en soluciones concentradas hasta una conformación de cadenas aisladas en soluciones muy diluidas^[135]. Es probable que la conformación que adopten el Qui y la PAAM en la mezcla se aproxime a una conformación de cadenas aisladas. Esto se puede inferir ya que la solución obtenida al mezclar el Qui con la PAAM es completamente homogénea y al hecho que el grupo carbonilo de la poli(acrilamida) forma una interacción de tipo culómbica con el grupo amino protonado del quitosano. Esto puede resultar en la formación de una estructura supramolecular donde las cadenas poliméricas se encuentran en paralelo. Debido a lo anterior, es posible que el crecimiento de los aglomerados de CaCO_3 sea de tipo laminar.

3.6. Estudio de cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador películas híbridas órgano - inorgánicas

Trabajos anteriores relacionados con la preparación de películas híbridas órgano-inorgánicas han demostrado la factibilidad de incorporar polímeros orgánicos a redes inorgánicas que contienen grupos amino en su estructura^[102, 103]. Por ejemplo, es posible obtener películas híbridas constituidas por Qui y sílice mediante el método de sol-gel al emplear

tetraetilortosilicato (TEOS) o 3-aminopropil trietoxisilano (APS) como precursores de la red inorgánica.

Las películas híbridas organo - inorgánicas fueron obtenidas a partir de Qui como fase orgánica y un sol precursor inorgánico, TEOS o poliaminopropilsiloxano (PAPS) con el fin de lograr la compatibilización de ambas fases. Cabe destacar que el sistema silicio/quitosano forma películas transparentes solamente cuando se emplea un sol precursor de sílice con un tiempo de hidrólisis de 24 horas y a 60 °C. Para este caso específico el catalizador utilizado fue HCl.^[106]

Estas películas fueron preparadas en distintas proporciones molares a las que además se les incorporan el ión calcio mediante la adición de acetato de calcio (AcCa). Al utilizar el grupo acetato no se incorpora un anión extra al híbrido, lo que no incorporaría una variable más al sistema.

A partir de las mezclas binarias de quitosano y red inorgánica conteniendo acetato de calcio, se obtiene películas homogéneas y transparentes, lo que indica que no hay separación de fases de los componentes orgánico e inorgánico y que existe una compatibilización a nivel molecular. Esta compatibilidad entre las fases orgánica e inorgánica se logra mediante puente de hidrógeno entre los grupos amidos residuales del Qui y del Qui protonado con los grupos silanoles de la sílice ^[101] (Figura 3.6.1).

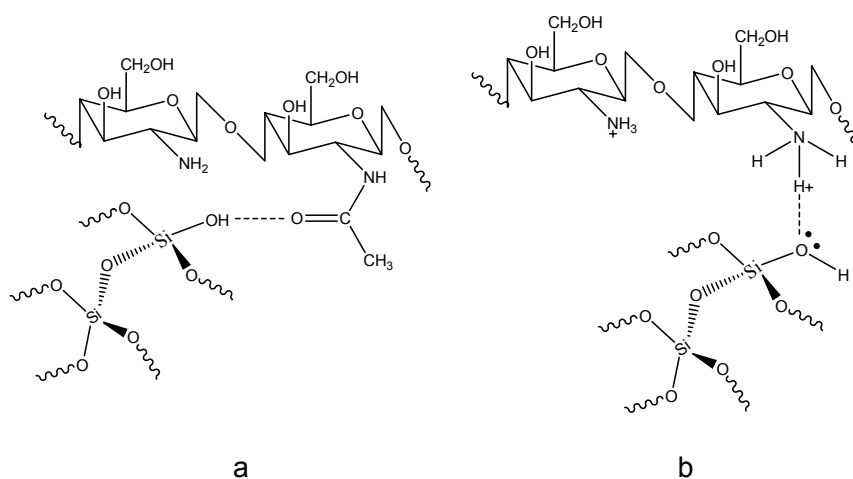


Figura 3.6.1. Posible formación de puentes de hidrógeno entre la red inorgánica y Qui: a) con grupos amidos residuales, b) con grupos aminos protonados

Se incorporo sulfato de quitosano (QuiS) como un cuarto componente a los híbridos terciarios con el fin de aumentar el tipo y el número de los grupos funcionales. Esto modificaría las interacciones que se producen en la red que generaría cambios en el entorno donde se produciría la formación de carbonato de calcio. Las interacciones antes mencionadas serian también las responsables de la compatibilización de las películas cuaternarias.

A continuación se muestra en la **Tabla 13**, las diferentes razones molares en las diferentes películas híbridas formadas junto con sus propiedades físicas.

Tabla 13. Composición y propiedades de híbridos organo-inorgánicos binarios y ternarios.

Componentes del híbrido	Relación molar de los componentes	Propiedades*
Qui/TEOS/AcCa	1:0.6:1	F,T
Qui/PAPS/AcCa	1:0.6:1	F,T
Qui/TEOS/QuiS/AcCa	1:1:0.4:0.5	F,T
Qui/PAPS/QuiS/AcCa	1:1:0.4:0.5	F,T

* T= (transparente) y F= (flexible)

3.6.1. Cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador híbridos binarios organo-inorgánicos

Cada una de las mezclas híbridas fue usada como agente mineralizador para la cristalización de carbonato de calcio siguiendo el método II (**sección 2.9.2**) y por periodos de tiempo de 2, 4, 6, 24 y 48 horas. La caracterización de los aglomerados de carbonato de calcio se realizó mediante difracción de rayos X (DRX) y microscopia electrónica de barrido (SEM).

Sistema Qui/TEOS

En la **Figura 3.6.2** se observa el patrón de DRX para los aglomerados de carbonato de calcio obtenidos al usar el sistema híbrido binario Qui/TEOS/ como agente mineralizador, donde claramente se distingue la señal a $29,5^\circ 2\theta$ correspondiente a calcita. Esta señal se mantiene a través del tiempo y aumenta su intensidad con el tiempo hasta las 24 horas de cristalización. A 48 horas de cristalización la situación es distinta debido a que además de la señal de calcita también se observa una señal a $25,5^\circ 2\theta$, no observada con anterioridad, que es incluso de mayor intensidad que la de calcita. Además se distinguen los picos en $39,4^\circ 2\theta$ y $47,6^\circ 2\theta$ todas correspondientes a la fase vaterita.

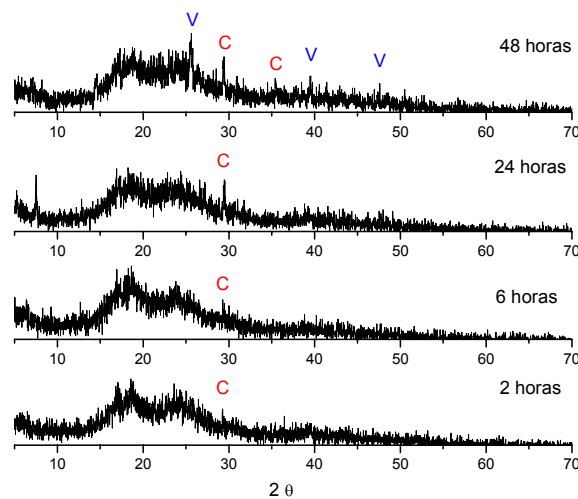


Figura 3.6.2. Patrón de difracción de rayos X para carbonato de calcio obtenido al utilizar como agente mineralizador Qui/TEOS y por periodos de 2, 6, 24 y 48 horas de cristalización. C =calcita y V= Vaterita.

Las micrografías de los aglomerados obtenidos a 24 horas de cristalización, (Figura 3.6.3. a.) presentan cristales prismáticos, todos ellos aglomerados sobre la superficie sin un orden definido. Según lo establecido por DRX estos cristales corresponderían a calcita.

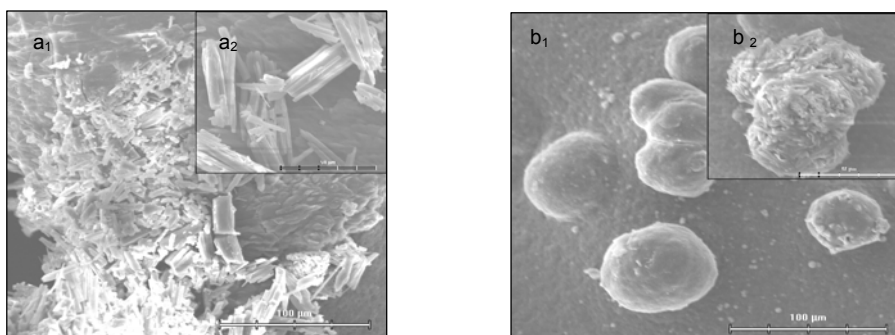


Figura 3.6.3. Micrografía SEM de carbonato de calcio obtenido al usar Qui/TEOS como agente mineralizador: a₁) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, 670X; a₂) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, 1700X; b₁) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización 670X y b₂) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización 1700X.

Como se puede apreciar de la **Figura 3.6.3 a**, los aglomerados obtenidos de calcita poseen una morfología distinta a los cristales romboédricos, esto al cabo 48 horas de cristalización cambian su forma ya además su fase (**Figura 3.6.3. b**). A éste tiempo, los aglomerados tienen una morfología esférica con un tamaño aproximado 50 µm. En algunos casos, se podría suponer que los cristales crecieron en el interior de la mezcla y aflorando sobre la superficie de la matriz con la morfología esférica característica de la vaterita. Las esferas lisas no son las únicas que se observan, pues existen otras donde su superficie está formada por cristales prismáticos similares a los observados en la superficie. A un tiempo menor de cristalización, la estructura estaría formada por cristales de calcita rodeando la estructura esférica. Esto explicaría la coexistencia de diferentes fases en una misma estructura de CaCO₃, explicitada mediante el análisis de DRX (**Figura 3.6.2**). El mayor tiempo de cristalización estaría favoreciendo la formación de vaterita debido al aumento de la sobresaturación.

Sistema Qui/PAPS

Al observar el patrón de DRX en la **Figura 3.6.4.**, se aprecia la permanencia a través del tiempo del pico en 29,5 2θ, característico de calcita. Además se observa que a partir de 6 horas aparecen dos picos ubicados en 37,1° 2θ y 38,4° 2θ; ambas señales se identifican con el polimorfo de aragonita, fase muy difícil de estabilizar debido a que su estabilidad termodinámica

intermedia. Ésta se encuentra entre vaterita y calcita, pero muy cercana a esta última. Esta es la razón para la complejidad de su obtención *in vitro*.

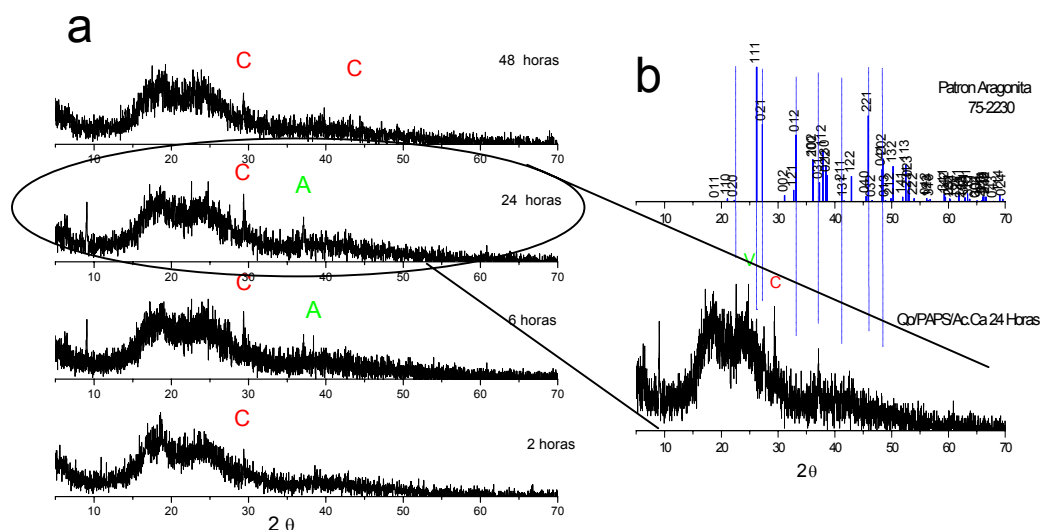


Figura 3.6.4. Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio utilizando como agente mineralizador Qui/PAPS: a) Tiempo de cristalización 2, 6, 24 y 48 horas. C =calcita y A= Aragonita; b) 24 horas de cristalización y comparación con el patrón de aragonita.

Al igual que el caso de cristalización por 6 horas, a 24 horas se observan los picos característicos de aragonita, pero además se distingue la señal de vaterita ubicada en $24,5^\circ 2\theta$. Para este sistema híbrido binario y tiempo de exposición es posible identificar los tres polimorfos anhidros de CaCO_3 . Este resultado es muy distinto al que se obtiene a 48 horas de cristalización, ya que en este caso sólo es posible distinguir las señales de calcita.

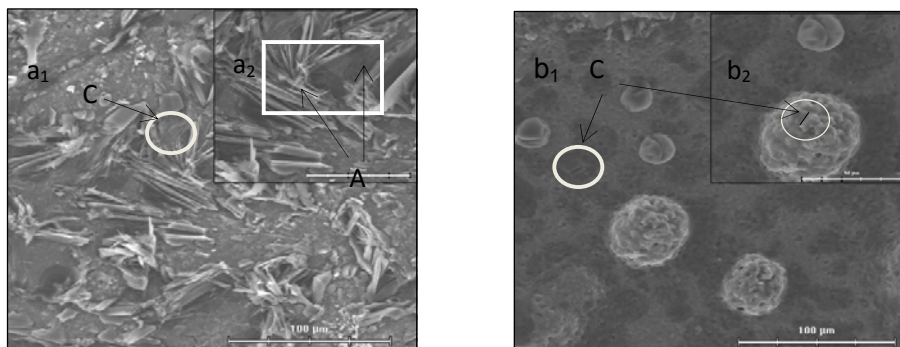


Figura 3.6.5. Micrografía SEM de cristales de carbonato de calcio obtenidos al usar Qui/PAPS como agente mineralizador: a₁) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, 670X; a₂) cristales obtenidos a 24 horas de cristalización, 1700X; b₁) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización, 670X; b₂) cristales obtenidos a 48 horas de cristalización, 1700X. C= calcita y A= aragonita

En la **Figura 3.6.5 a** se pueden observar estructuras romboédricas alargadas en la que se distinguen planos prismáticos. Esta morfología podría ser atribuida a calcitas orientadas en algún plano cristalino específico, a menos que este plano sea distinto al {104}, plano más denso de la calcita. No es posible diferenciar por DRX algún crecimiento preferencial de un cristal común de calcita, como el que se encuentra indicado por un círculo en la **Figura 3.6.5 a₁ y b₁**.

El patrón de difracción de rayos X para esta muestra, indica no sólo la presencia de calcita sino que de los otros dos polimorfos anhidros de carbonato de calcio. La aragonita se distingue del resto de las fases debido a que su morfología normal es acicular, la que se puede identificar en la **Figura 3.6.5 a₂** marcada con un rectángulo. El polimorfo vaterita no fue posible de identificar por esta técnica.

El cambio que ocurre al aumentar el tiempo de cristalización es dramático ya que a 48 horas de cristalización sólo se observa calcita en el patrón de DRX, **Figura 3.6.4**. Esto se comprueba en la micrografía SEM de la **Figura 3.6.5 b₁ y b₂**, donde la única estructura observada son aglomeraciones esféricas formadas por calcitas.

Una estructura similar fue reportada ^[136] en la que se propone un posible mecanismo para esta estructura (**Figura 3.6.6**).

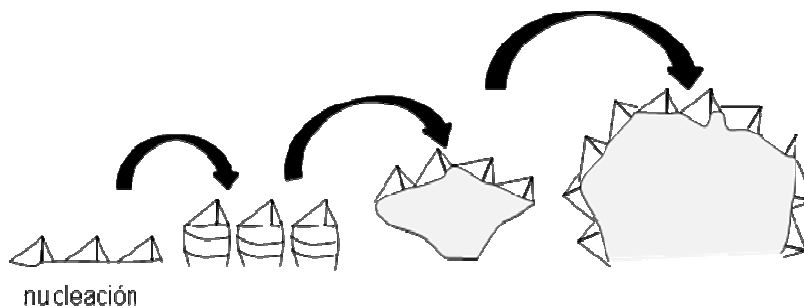


Figura 3.6.6. Esquema del posible mecanismo de formación de aglomeraciones de calcitas. ^[136]

Las diferencias observadas en los cristales de CaCO_3 , indica que la morfología y estabilidad termodinámica, para este caso, pueden ser influenciadas por el tipo de precursor de silano incorporado a la mezcla que conforma el híbrido. Cada uno de los precursores tiene una estructura distinta. En un caso ideal, la red generada por TEOS debería resultar homogénea pues todos los sustituyentes que tiene el átomo de silicio son iguales (**Figura 1.5.3**). Esto no ocurre para el caso de poliaminopropilsiloxano (PAPS) ya que este posee un grupo aminopropil, lo que genera diferencia en la estructura de la red inorgánica y por lo tanto diferencia de cargas e interacciones distintas con la fase orgánica comparadas con el TEOS (**Figura 3.6.7**).

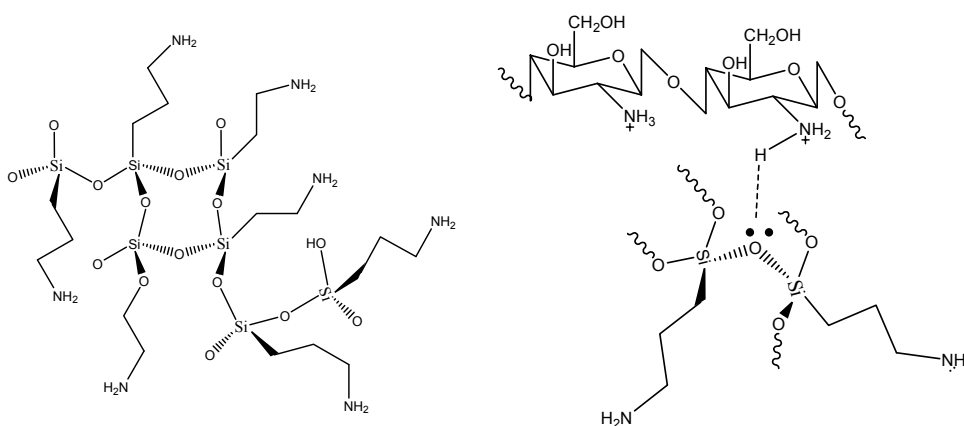


Figura 3.6.7. a) Esquema de la red inorgánica utilizando poliaminopropilsiloxano (PAPS) como precursor en el proceso sol-gel y b) posible interacción entre la red inorgánica y la fase orgánica.

3.6.2. Cristalización de carbonato de calcio usando como agente mineralizador híbridos terciario órgano-inorgánicos

Sistema Qui/TEOS/QuiS

En la sección 3.2. se observó el efecto que posee el quitosano sulfatado (QuiS) en la cristalización del CaCO_3 . Ese estudio se realizó en un medio acuoso. La incorporación de QuiS a esta matriz órgano-inorgánico proporciona grupos iónicos que deberían participar en el proceso de la cristalización del CaCO_3 .

Los aglomerados obtenidos se analizaron por SEM (**Figura 3.6.8**). Esta figura muestra estructuras circulares sin una morfología que pueda ser asociada a formas estándares de los polimorfos de carbonato de calcio. Estas estructuras a 24 horas de cristalización presentan una serie de grietas y un orificio en el medio. A 48 horas de cristalización, la morfología es similar al obtenido por 24 horas pero ha perdido altura y no se observa el orificio del medio. Este orificio esta asociado a un estado de transición de fase sólido-sólido observado en la transición de un polimorfo de mayor densidad a uno de menor densidad ^[110].

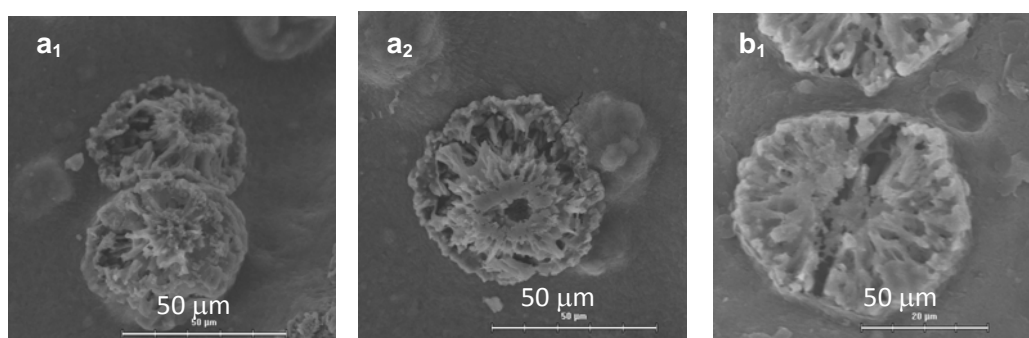


Figura 3.6.8. Micrografías SEM de CaCO_3 obtenidos al usar como agente mineralizador Qui/TEOS/QuiS: a₁) y a₂) a 24 horas de cristalización; b₁) a 48 horas de cristalización.

El análisis de DRX realizado a las aglomeraciones de la **Figura 3.6.8**, reveló que la estructura corresponde a calcita. Este hecho, no se esperaba, ya que no fue posible ubicar algún plano prismático que normalmente esté asociado con este polimorfo. La señal característica de la calcita en $29,5 \text{ } 2\theta$ (**Figura 3.6.9**) no se presenta como un pico agudo. Este hecho puede ser explicado debido a que la estructura no presenta un ordenamiento completamente cristalino y/o debido a que los cristales que forman la estructura son de tamaño muy pequeño, por lo que aumenta la dispersión de la señal.

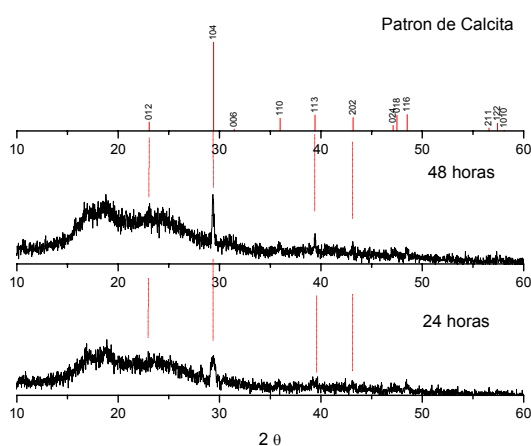


Figura 3.6.9. Patrón de difracción de rayos x para carbonato de calcio obtenido al usar como agente mineralizador Qui/TEOS/QuiS/AcCa para 24 y 48 horas de cristalización y la comparación con el patrón de calcita (código 24-007).

La **Figura 3.6.10** muestra la influencia de los grupos iónicos sobre el proceso de cristalización de CaCO_3 . Se puede observar de esta figura que al disminuir la relación molar de QuiS en un 50% (inicialmente 0,2) que es posible distinguir calcitas con su forma tradicional, pero con un orificio en el medio (**Figura 3.6.10 a₁**), similar al observado en la **Figura 3.6.10 b₁**. Esto sugiere que este polielectrolito sería el responsable del cambio de morfología de CaCO_3 en este sistema mostrando un efecto completamente distinto al que se había observado anteriormente (**Figura 3.3.2**) donde el sulfato de quitosano (QuiS) era el único componente externo que participaba en la cristalización.

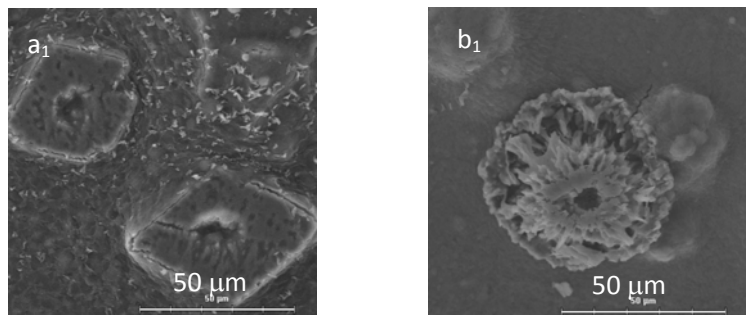


Figura 3.6.10. Micrografías SEM de calcita obtenida al usar el híbrido Qui/TEOS/QuiS como agente mineralizador y para 24 horas de cristalización. a1) contenido de QuiS en el híbrido=0,1 M y b1) contenido de QuiS en el híbrido =0,2M.

Sistema Qui/PAPS/QuiS

La micrografía SEM obtenida para este sistema, **Figura 3.6.11 a**, muestra estructuras de cristales de CaCO_3 de tipo agujas. Al observar estos cristales con un mayor aumento, se percata que su morfología es congruente con la de aragonita. En la **Figura 3.6.11 b**, se observan con mayor claridad cristales de aragonita tipo agujas muy delgadas formando semi-rosetas.

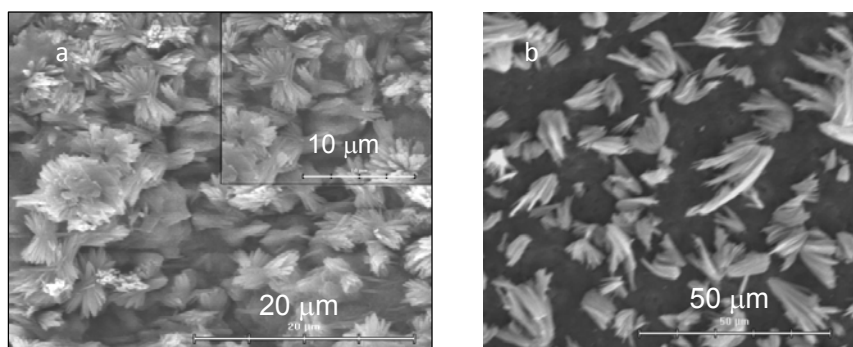


Figura 3.6.11. Micrografías SEM de aragonitas obtenidas al usar el híbrido Qui/PAPS/QuiS/AcCa como agente mineralizador y después de 24 horas de cristalización. a) cristales tipo rosetas y b) cristales aciculares.

Dada la gran cantidad de cristales tipo agujas presentes, no es posible observar cristales romboédricos de calcita sobre la superficie de la película híbrida. Los resultados obtenidos por SEM indicaron que la morfología de los cristales es fuertemente controlada por la presencia de grupos NH_2 provenientes de PAPS y sulfatos provenientes de QuiS en el híbrido, los que pueden interactuar electrostáticamente con iones de calcio durante la nucleación y posterior crecimiento de los cristales de CaCO_3 .

El cambio de TEOS por APS en el híbrido muestra un cambio en el patrón de difracción de rayos X a 24 horas de cristalización (**Figura 3.6.12**). Se distinguen señales a $2\theta = 26,7^\circ$; $27,5^\circ$; $41,6^\circ$ y $45,8^\circ$ correspondientes a aragonita y a $2\theta = 29,4^\circ$ correspondiente al plano $\{104\}$ de calcita. En el caso de los cristales de CaCO_3 obtenidos a 48 horas de cristalización, sólo se identificaron señales a $2\theta = 29,4^\circ$ y $2\theta = 39,4^\circ$ correspondiente a calcita (**Figuras 3.6.12 y 3.6.13**).

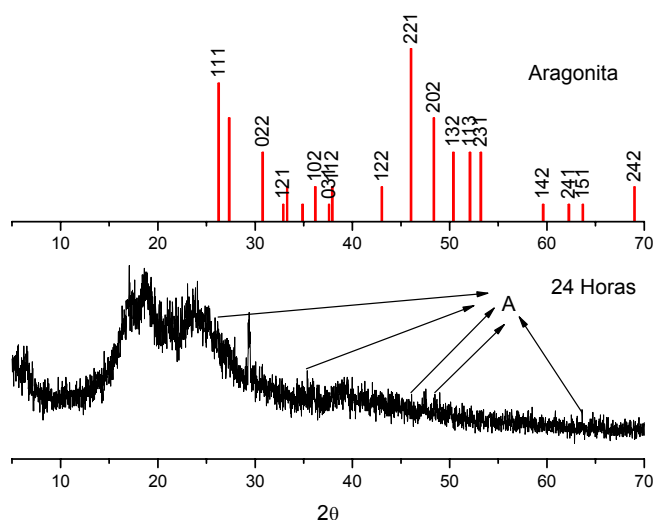


Figura 3.6.12. Patrón de difracción de rayos X para carbonato de calcio obtenido al usar Qui/PAPS/QuiS como agente mineralizador para 24 horas de cristalización y la comparación con el patrón de aragonita.

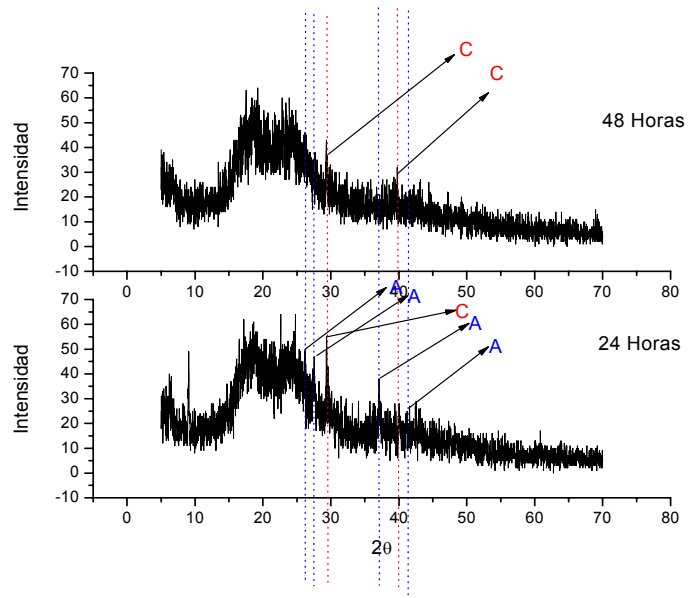


Figura 3.6.13. Patrón de difracción de rayos X de carbonato de calcio obtenido al usar Qui/PAPS/QuiS como agente mineralizador para 24 y 48 horas de cristalización. A = aragonita y C = calcita.

Tabla 14. Resumen de las morfologías y polimorfos obtenidos utilizando como agente mineralizador los híbridos órgano-inorgánico. C calcitas; A= aragonitas y V = Vateritas

Tipo de híbrido y Relación molar de sus componentes	Tiempo de cristalización (Horas)	Morfología y polimorfos
Qui/TEOS/AcCa (1:0,6:1)	24	C laminares
Qui/TEOS/AcCa (1:0,6:1)	48	C laminares y V esféricas
Qui/APS/AcCa (1:0,6:1)	24	C y A
Qui/APS/AcCa (1:0,6:1)	48	Aglomerados esféricos de C
Qui/TEOS/QuiS/AcCa (1:1:0,4:0,5)	24	C esféricas deformadas
Qui/TEOS/QuiS/AcCa (1:1:0,4:0,5)	48	C planas deformadas
Qui/APS/QuiS/AcCa (1:1:0,4:0,5)	24	Aragonitas rosetas
Qui/APS/QuiS/AcCa (1:1:0,4:0,5)	48	C

4. Conclusiones

Al usar alginato, κ -carragenato, quitosano e híbridos órgano-inorgánicos como agente mineralizador se obtuvieron aglomerados de cristales de carbonato de calcio con polimorfos calcita y/o vaterita que en algunos casos son parte de una sola estructura. Además, el uso de estos sustratos produjo cambios en la morfología de ambos polimorfos.

La estabilización de vaterita fue observada para todos los agentes mineralizadores pero con una mayor prevalencia para los que tienen como parte de su estructura grupos aniónicos.

La estabilización de aragonita fue posible al usar como agente mineralizador los híbridos órgano-inorgánicos y las mezclas Qui/Alg; para esta última también se identificó carbonato de calcio hexahidratado.

La modificación de las orientaciones cristalográficas distinta a los planos más densos, sólo se observó para calcita al utilizar κ -carragenato liofilizado y quitosano liofilizado como agente mineralizador. Este mismo efecto se obtuvo también al usar quitosano y el método de cristalización de *spin-coating* y las mezclas Qui/PAAM.

Se obtuvo cambios en la morfología del polimorfo calcita al usar como agente mineralizador quitosano modificado por sulfatación.

Se obtuvieron estructuras de carbonato de calcio con morfología toroidal no reportada anteriormente al usar quitosano injertado con poli (ácido acrílico) y la formación de sulfato de calcio al usar quitosano injertado con poli acrilamida. Este último se atribuyó a la interacción entre los grupos sulfatos provenientes de persulfato de potasio usado como iniciador en la reacción de injerto y los grupos amidos de la poliacrilamida.

Para el agente mineralizador Qui/TEOS/QuiS la morfología es distinta a la observada normalmente. Los híbridos Qui/TEOS generaron calcitas laminares y vateritas esféricas, Qui/PAPS y Qui/APS/QuiS dieron origen aragonitas con aglomeraciones de rosetas.

5. Bibliografia

1. Mann, S., et al., *Crystallization at Inorganic-organic Interfaces: Biominerals and Biomimetic Synthesis*. Science, 1993. **261**(5126): p. 1286-1292.
2. Calvert, P. and P. Rieke, *Biomimetic Mineralization in and on Polymers*. Chem Mater, 1996. **8**: p. 1715-27.
3. Stupp, S.I. and P.V. Braun, *Molecular manipulation of microstructures: biomaterials, ceramics, and semiconductors*. Science, 1997. **277**(5330): p. 1242-8.
4. Aksay, I.A., et al., *Biomimetic Pathways for Assembling Inorganic Thin Films*. Science, 1996. **273**(5277): p. 892-8.
5. Bunker, B.C., et al., *Ceramic Thin-Film Formation on Functionalized Interfaces Through Biomimetic Processing*. Science, 1994. **264**(5155): p. 48-55.
6. Mann, S., *Molecular tectonics in biomineralization and biomimetic materials chemistry*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 499-505.
7. Campbell, A.A., *Interfacial regulation of crystallization in aqueous environments*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 1999. **4**(1): p. 40-45.
8. Jackson, A.P., J.F.V. Vincent, and R.M. Turner, *Comparison of nacre with other ceramic composites* Journal of Materials Science, 1990. **25**(7): p. 3173-78.
9. Smith, B.L., et al., *Molecular mechanistic origin of the toughness of natural adhesives, fibres and composites*. Nature, 1999. **399**(6738): p. 761-763.
10. Levine, I., *FISICOQUIMICA*, ed. MCGRAW-HILL. Vol. I. 2004.
11. Wu, W. and G.H. Nancollas, *Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: a comparison with other methods*. Advances in Colloid and Interface Science, 1999. **79**(2-3): p. 229-279.
12. Mullin, J.W., *Crystallization*. 4 ed, ed. B. Heinemann. 1993, Oxford.
13. Mersmann, A., *Crystallization Technology Handbook*. 1995, New York: Marcel Dekker Inc
14. Threlfall, T., *Structural and Thermodynamic Explanations of Ostwald's Rule*. Organic Process Research & Development, 2003. **7**(6): p. 1017-1027.
15. Gosele, W., et al., *Feststoffbildung durch Kristallisation und Fällung*. Chemie Ingenieur Technik, 1990. **62**(7): p. 544-552.
16. Meldrum, F.C., *Calcium carbonate in biomineralisation and biomimetic chemistry*. International Materials Reviews, 2003. **48**: p. 187-224.

17. Aizenberg, J., et al., *Factors Involved in the Formation of Amorphous and Crystalline Calcium Carbonate:; A Study of an Ascidian Skeleton*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(1): p. 32-39.
18. Lippmann, F., *Sedimentary carbonate minerals*, ed. Springer-Verlag. 1973, Berlin.
19. Morse, J.W., R.S. Arvidson, and A. Luttge, *Calcium carbonate formation and dissolution*. Chem Rev, 2007. **107**(2): p. 342-81.
20. Dove, P.M., J.J. De Yoreo, and S. Weiner, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry Volume*. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, ed. Biomineralization. Vol. 54. 2002.
21. <http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>. 2004
22. Weiner, S. and L. Addadi, *Design strategies in mineralized biological materials*. Journal Materials Chemistry., 1997. **7**: p. 689-702.
23. Weedon, M.J. and P.D. Taylor, *Calcitic Nacreous Ultrastructures in Bryozoans: Implications for Comparative Biomineralization of Lophophorates and Molluscs*. Biol Bull, 1995. **188**(3): p. 281-292.
24. KOJIMA, Y., et al., *Controls of Polymorphism and Morphology of Calcium Carbonate Compounds Formed by Crystallizing Amorphous Calcium Carbonate Hydrate*. Journal of the Ceramic Society of Japan, 1994. **102**(1192): p. 1128-1136.
25. Söhnel, O. and J.W. Mullin, *Precipitation of calcium carbonate*. Journal of Crystal Growth, 1982. **60**(2): p. 239-250.
26. Kitano, Y., K. Park, and D.W. Hood, *Pure Aragonite Synthesis* Journal of Geophysical Research, 1962. **67**(12): p. 4873-4874.
27. Wang, L., I. Sondi, and E. Matijevic, *Preparation of Uniform Needle-Like Aragonite Particles by Homogeneous Precipitation*. Journal of Colloid and Interface Science, 1999. **218**(2): p. 545-553.
28. Chakrabarty, D. and S. Mahapatra, *Aragonite crystals with unconventional morphologies*. Journal Materials Chemistry, 1999. **9**: p. 2953-2957.
29. Dupont, L., F. Portemer, and M. Figlarz, *Synthesis and study of a well crystallized CaCO₃ vaterite showing a new habitus*. Journal Materials Chemistry, 1997. **7**: p. 797-800.
30. Clarkson, J.R., T.J. Price, and C.J. Adams, *Role of metastable phases in the spontaneous precipitation of calcium carbonate*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1992. **88** (2): p. 243-249.
31. Kamiya, K., S. Sakka, and K. Terada, *Aragonite formation through precipitation of calcium carbonate monohydrate*. Materials Research Bulletin, 1977. **12**(11): p. 1095-1102.

32. Tracy, S.L., C.J.P. François, and H.M. Jennings, *The growth of calcite spherulites from solution: I. Experimental design techniques*. Journal of Crystal Growth, 1998. **193**(3): p. 374-381.
33. Weiner, S. and L. Hood, *Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation*. Science, 1975. **190**(4218): p. 987-9.
34. Ogino, T., T. Suzuki, and K. Sawada, *The rate and mechanism of polymorphic transformation of calcium carbonate in water*. Journal of Crystal Growth, 1990. **100**(1-2): p. 159-167.
35. Mucci, A. and J.W. Morse, *The incorporation of Mg²⁺ and Sr²⁺ into calcite overgrowths: influences of growth rate and solution composition*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1983. **47**(2): p. 217-233.
36. Berner, R.A., *The role of magnesium in the crystal growth of calcite and aragonite from sea water*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 1975. **39**(4): p. 489-494, IN3, 495-504.
37. Brecevic, L., et al., *Effect of divalent cations on the formation and structure of calcium carbonate polymorphs*. Journal Materials Chemistry, 1996. **92**(6): p. 1017– 1022.
38. Mann, S., et al., *Morphological influence of functionalized and non-functionalized α,- w dicarboxylates on calcite crystallization*. Journal Materials Chemistry, 1990. **86**(10): p. 1873–1880.
39. Buhleier, E., W. Wehner, and F. Vögtle, *"Cascade"- and "Nonskid-Chain-like" Syntheses of Molecular Cavity Topologies* Synthesis, 1978. **1**: p. 155–158.
40. Naka, K., et al., *The effect of an anionic starburst dendrimer on the crystallization of CaCO₃ in aqueous solution*. Chemical Communications, 1999. **1**: p. 1931 - 1932.
41. Donners, J.J.J.M., et al., *Amorphous calcium carbonate stabilised by poly(propylene imine) dendrimers* Chemical Communications, 2000: p. 1937 - 1938.
42. Ziegler, A., *X-ray microprobe analysis of epithelial calcium transport*. Cell Calcium, 2002. **31**(6): p. 307-321.
43. DeOliveira, D.B. and R.A. Laursen, *Control of Calcite Crystal Morphology by a Peptide Designed To Bind to a Specific Surface*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(44): p. 10627-10631.
44. Gower, L.A. and D.A. Tirrell, *Calcium carbonate films and helices grown in solutions of poly(aspartate)*. Journal of Crystal Growth, 1998. **191**(1-2): p. 153-160.
45. Li, C., G.D. Botsaris, and D.L. Kaplan, *Selective in Vitro Effect of Peptides on Calcium Carbonate Crystallization*. Crystal Growth & Design, 2002. **2**(5): p. 387-393.

46. Kandori, K., K. Kon-no, and A. Kitahara, *Dispersion stability of nonaqueous calcium carbonate dispersion prepared in water core of W/O microemulsion*. Journal of Colloid and Interface Science, 1987. **115**(2): p. 579-582.
47. Dominic Walsh, B.L.S.M., *Morphosynthesis of Calcium Carbonate (Vaterite) Microsponges*. Advanced Materials, 1999. **11**(4): p. 324-328.
48. Kim, I.W., R.E. Robertson, and R. Zand, *Effects of Some Nonionic Polymeric Additives on the Crystallization of Calcium Carbonate*. Crystal Growth & Design, 2005. **5**(2): p. 513-522.
49. Agarwal, P. and K.A. Berglund, *In Situ Monitoring of Calcium Carbonate Polymorphs during Batch Crystallization in the Presence of Polymeric Additives Using Raman Spectroscopy*. Crystal Growth & Design, 2003. **3**(6): p. 941-946.
50. Yu, Q., et al., *The effect of polyacrylamide on the crystallization of calcium carbonate: Synthesis of aragonite single-crystal nanorods and hollow vaterite hexagons*. Journal of Crystal Growth, 2006. **286**(1): p. 178-183.
51. Wang, C., et al., *Synthesis of nanosized calcium carbonate (aragonite) via a polyacrylamide inducing process*. Powder Technology, 2006. **163**(3): p. 134-138.
52. Rautaray, D., et al., *Biological Synthesis of Stable Vaterite Crystals by the Reaction of Calcium Ions with Germinating Chickpea Seeds*. Crystal Growth & Design, 2005. **5**(2): p. 399-402.
53. Wei, H., et al., *Influence of polyvinylpyrrolidone on the precipitation of calcium carbonate and on the transformation of vaterite to calcite*. Journal of Crystal Growth, 2003. **250**(3-4): p. 516-524.
54. Hosoda, N., A. Sugawara, and T. Kato, *Template Effect of Crystalline Poly(vinyl alcohol) for Selective Formation of Aragonite and Vaterite CaCO₃ Thin Films*. Macromolecules, 2003. **36**(17): p. 6449-6452.
55. Zhang, S. and K.E. Gonsalves, *Influence of the Chitosan Surface Profile on the Nucleation and Growth of Calcium Carbonate Films*. Langmuir, 1998. **14**(23): p. 6761-6766.
56. Miloscaron Sedlák, H.C., *Synthesis of Double-Hydrophilic Block Copolymers with Hydrophobic Moieties for the Controlled Crystallization of Minerals*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2001. **202**(4): p. 587-597.
57. Marentette, J.M., J.N.E. Stöckelmann, and W.H. Meyer, *Crystallization of CaCO₃ in the presence of PEO-*block*-PMAA copolymers*. Advanced Materials, 1997. **9**(8): p. 647-651.
58. Colfen, H. and M. Antonietti, *Crystal Design of Calcium Carbonate Microparticles Using Double-Hydrophilic Block Copolymers*. Langmuir, 1998. **14**(3): p. 582-589.

59. Cölfen, H. and Q. L., *A Systematic Examination of the Morphogenesis of Calcium Carbonate in the Presence of a Double-Hydrophilic Block Copolymer*. Chemistry, 2001. **7**(1): p. 106-116.
60. Liang, P., et al., *Petunia-Shaped Superstructures of CaCO₃ Aggregates Modulated by Modified Chitosan*. Langmuir, 2004. **20**(24): p. 10444-10448.
61. Cölfen, H., *Double-Hydrophilic Block Copolymers: Synthesis and Application as Novel Surfactants and Crystal Growth Modifiers*. Macromolecular Rapid Communications, 2001. **22**(4): p. 219-252.
62. Cölfen, H., et al., *Mineralization in complex fluids*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2007. **303**(1-2): p. 46-54.
63. Page, M.G. and H. Colfen, *Improved Control of CaCO₃ Precipitation by Direct Carbon Dioxide Diffusion: Application in Mesocrystal Assembly*. Crystal Growth & Design, 2006. **6**(8): p. 1915-1920.
64. Heywood, B.R. and S. Mann, *Template-directed nucleation and growth of inorganic materials*. Advanced Materials, 1994. **6**(1): p. 9-20.
65. Mann, S., *Molecular recognition in biomineralization*. Nature, 1988. **332**(6160): p. 119-124.
66. Rajam, S., et al., *Oriented crystallization of CaCO₃ under compressed monolayers. Part 1.—Morphological studies of mature crystals*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1991.(87): p. 727-735.
67. Rajam, S., et al., *Oriented crystallization of CaCO₃ under compressed monolayers. Part 2.—Morphological studies of mature crystals*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1991(87): p. 735-743.
68. Heywood, B.R. and S. Mann, *Molecular Construction of Oriented Inorganic Materials: Controlled Nucleation of Calcite and Aragonite under Compressed Langmuir Monolayers*. Chemistry of Materials, 1994. **6**(3): p. 311-318.
69. Fernandez, M.S., et al., *Partial biomimetic reconstitution of avian eggshell formation*. Journal of Structural Biology, 2004. **148**(1): p. 1-10.
70. Simon Champ, et al., *Hydrogen-Bonded Molecular Ribbons as Templates for the Synthesis of Modified Mineral Phases*¹³. Angewandte Chemie International Edition, 2000. **39**(15): p. 2716-2719.
71. Simon Champ, J.A.D.P.S.F.B.R.H.M.M., *Hydrogen-Bonded Molecular Ribbons as Templates for the Synthesis of Modified Mineral Phases*¹³. Angewandte Chemie International Edition, 2000. **39**(15): p. 2716-2719.

72. Buijnsters, P.J.J.A., et al., *Oriented Crystallization of Calcium Carbonate under Self-Organized Monolayers of Amide-Containing Phospholipids*. Langmuir, 2001. **17**(12): p. 3623-3628.
73. Xu, G., et al., *Biomimetic Synthesis of Macroscopic-Scale Calcium Carbonate Thin Films. Evidence for a Multistep Assembly Process*. Journal of the American Chemical Society, 1998. **120**(46): p. 11977-11985.
74. Hosoda, N. and T. Kato, *Thin-Film Formation of Calcium Carbonate Crystals: Effects of Functional Groups of Matrix Polymers*. Chemistry of Materials, 2001. **13**(2): p. 688-693.
75. Falini, G., S. Fermani, and A. Ripamonti, *Oriented crystallization of octacalcium phosphate into beta-chitin scaffold*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2001. **84**(3-4): p. 255-258.
76. Muzzarelli, R.A.A., *Chitin and its derivatives: New trends of applied research*. Carbohydrate Polymers, 1983. **3**(1): p. 53-75.
77. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
78. Cartier, N., A. Domard, and H. Chanzy, *Single crystals of chitosan*. International Journal of Biological Macromolecules, 1990. **12**(5): p. 289-294.
79. Rinaudo, M., M. Milas, and P.L. Dung, *Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion*. International Journal of Biological Macromolecules, 1993. **15**(5): p. 281-285.
80. Zhang, S. and K.E. Gonsalves, *Synthesis of calcium carbonate-chitosan composites via biomimetic processing*. Journal of Applied Polymer Science, 1995. **56**(6): p. 687-695.
81. Zhang, F., et al., *Study of growth of calcium carbonate crystals on chitosan film*. Materials & Design, 2006. **27**(5): p. 422-426.
82. Payne, S.R., M. Heppenstall-Butler, and M.F. Butler, *Formation of Thin Calcium Carbonate Films on Chitosan Biopolymer Substrates*. Crystal Growth & Design, 2007. **7**(7): p. 1262-1276.
83. Kato, T., et al., *Effects of macromolecules on the crystallization of CaCO₃ the Formation of Organic/Inorganic Composites*. Supramolecular Science, 1998. **5**(3-4): p. 411-415.
84. Wada, N., et al., *Formation of thin calcium carbonate films with aragonite and vaterite forms coexisting with polyacrylic acids and chitosan membranes*. Journal of Colloid and Interface Science, 2004. **279**(1): p. 167-174.
85. Kotachi, A., T. Miura, and H. Imai, *Polymorph Control of Calcium Carbonate Films in a Poly(acrylic acid)/Chitosan System*. Crystal Growth & Design, 2006. **6**(7): p. 1636-1641.

86. Sugawara, A. and T. Kato, *Aragonite CaCO₃ thin-film formation by cooperation of Mg²⁺ and organic polymer matrices* Chemical Communications, 2000(6).
87. Didymus, J.M., et al., *Influence of low-molecular-weight and macromolecular organic additives on the morphology of calcium carbonate*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1993.(15): p. 2891- 2900.
88. Manoli, F. and E. Dalas, *The effect of sodium alginate on the crystal growth of calcium carbonate*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2002. **13**(2): p. 155-158.
89. Verraest, D.L., et al., *Carboxymethyl inulin: A new inhibitor for calcium carbonate precipitation* Journal of the American Oil Chemists' Society, 1996. **73**(1): p. 55-62.
90. Ajikumar, P.K., B.J.M. Low, and S. Valiyaveetil, *Role of soluble polymers on the preparation of functional thin films of calcium carbonate*. Surface and Coatings Technology, 2005. **198**(1-3): p. 227-230.
91. Butler, M.F., et al., *Calcium Carbonate Crystallization in the Presence of Biopolymers*. Crystal Growth & Design, 2006. **6**(3): p. 781-794.
92. Yang, L., et al., *Interfacial molecular recognition between polysaccharides and calcium carbonate during crystallization*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2003. **97**(4): p. 377-383.
93. Falini, G., M. Gazzano, and A. Ripamonti, *Crystallization of calcium carbonate in presence of magnesium and polyelectrolytes*. Journal of Crystal Growth, 1994. **137**(3-4): p. 577-584.
94. Arias, J.L., et al., *Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering*. Journal of Materials Chemistry, 2014. **14**(14): p. 2154 - 2160.
95. Giuseppe Falini, S.F.M.G.A.R., *Biomimetic Crystallization of Calcium Carbonate Polymorphs by Means of Collagenous Matrices*. Chemistry - A European Journal, 1997. **3**(11): p. 1807-1814.
96. Falini, G., *Crystallization of calcium carbonates in biologically inspired collagenous matrices*. International Journal of Inorganic Materials, 2000. **2**(5): p. 455-461.
97. Tas, A.C., *Monodisperse Calcium Carbonate Microtablets Forming at 70C in Prerefrigerated CaCl₂ Gelatin Urea Solutions*. International Journal of Applied Ceramic Technology, 2008.
98. J. Zhan, H.P.L.C.Y.M., *Biomimetic Formation of Porous Single-Crystalline CaCO₃ via Nanocrystal Aggregation*. Advanced Materials, 2003. **15**(7-8): p. 621-623.
99. Grassmann, O., G. Muller, and P. Lobmann, *Organic/Inorganic Hybrid Structure of Calcite Crystalline Assemblies Grown in a Gelatin Hydrogel Matrix:; Relevance to Biomineralization*. Chemistry of Materials, 2002. **14**(11): p. 4530-4535.

100. Sakka, S. and K. Kamiya, *Glasses from metal alcoholates*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1980. **42**(1-3): p. 403-421.
101. Hench, L.L. and J.K. West, *The sol-gel process*. Chemical Reviews, 1990. **90**(1): p. 33-72.
102. Brinker, C.J. and G.W. Scherer, *Sol --> gel --> glass: I. Gelation and gel structure*. Journal of Non-Crystalline Solids, 1985. **70**(3): p. 301-322.
103. Norisuye, T., et al., *Time-Resolved Dynamic Light Scattering Study on the Dynamics of Silica Gels during Gelation Process*. Macromolecules, 2000. **33**(3): p. 900-905.
104. Wong, K.K.W., et al., *Polymer-mediated crystallisation of inorganic solids: calcite nucleation on the surfaces of inorganic polymers*. Journal of Materials Chemistry, 1994. **4**(9): p. 1387 - 1392.
105. Neira-Carrillo, A., et al., *Selective crystallization of calcium salts by poly(acrylate)-grafted chitosan*. Journal of Colloid and Interface Science, 2005. **286**(1): p. 134-141.
106. Martínez, Y., et al., *Hybrid ternary organic-inorganic films based on interpolymer complexes and silica*. Polymer, 2004. **45**(10): p. 3257-3265.
107. Díaz-Dosque, M., et al., *Use of biopolymers as oriented supports for the stabilization of different polymorphs of biomineralized calcium carbonate with complex shape*. Journal of Crystal Growth, 2008. **310**(24): p. 5331-5340.
108. Cölfen, H., *Precipitation of carbonates: recent progress in controlled production of complex shapes*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2003. **8**(1): p. 23-31.
109. Orme, C.A., et al., *Formation of chiral morphologies through selective binding of amino acids to calcite surface steps*. Nature, 2001. **411**(6839): p. 775-779.
110. Suzuki, M., H. Nagasawa, and T. Kogure, *Synthesis and Structure of Hollow Calcite Particles*. Crystal Growth & Design, 2006. **6**(9): p. 2004-2006.
111. Cölfen, H. and S. Mann, *Higher-Order Organization by Mesoscale Self-Assembly and Transformation of Hybrid Nanostructures*. Angewandte Chemie International Edition, 2003. **42**(21): p. 2350-2365.
112. Doncel-Pérez, E., et al., *Gelation under dynamic conditions: A strategy for in vitro cell ordering*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2006. **17**(9): p. 795-802.
113. Falshaw, R., H.J. Bixler, and K. Johndro, *Structure and performance of commercial kappa-2 carrageenan extracts: I. Structure analysis*. Food Hydrocolloids, 2001. **15**(4-6): p. 441-452.
114. Huang, J.H., Z.F. Mao, and M.F. Luo, *Effect of anionic surfactant on vaterite CaCO₃*. Materials Research Bulletin, 2007. **42**(12): p. 2184-2191.

115. Addadi, L., S. Raz, and S. Weiner, *Taking Advantage of Disorder: Amorphous Calcium Carbonate and Its Roles in Biomineralization*. *Advanced Materials*, 2003. **15**(12): p. 959-970.
116. Fabritius, H. and A. Ziegler, *Analysis of CaCO₃ deposit formation and degradation during the molt cycle of the terrestrial isopod Porcellio scaber (Crustacea, Isopoda)*. *Journal of Structural Biology*, 2003. **142**(2): p. 281-291.
117. Boddu, V.M., et al., *Removal of Hexavalent Chromium from Wastewater Using a New Composite Chitosan Biosorbent*. *Environmental Science & Technology*, 2003. **37**(19): p. 4449-4456.
118. Kumar, M.N.V.R., et al., *Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives*. *Chemical Reviews*, 2004. **104**(12): p. 6017-6084.
119. Naka, K., S.-C. Huang, and Y. Chujo, *Formation of Stable Vaterite with Poly(acrylic acid) by the Delayed Addition Method*. *Langmuir*, 2006. **22**(18): p. 7760-7767.
120. Checa, A.G., F.J. Esteban-Delgado, and A.B. Rodríguez-Navarro, *Crystallographic structure of the foliated calcite of bivalves*. *Journal of Structural Biology*, 2007. **157**(2): p. 393-402.
121. Vagenas, N.V., A. Gatsouli, and C.G. Kontoyannis, *Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy*. *Talanta*, 2003. **59**(4): p. 831-836.
122. Coleyshaw, E.E., G. Crump, and W.P. Griffith, *Vibrational spectra of the hydrated carbonate minerals ikaite, monohydrocalcite, lansfordite and nesquehonite*. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2003. **59**(10): p. 2231-2239.
123. Zou, C., et al., *Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity in vitro*. *Carbohydrate Polymers*, 2008. **73**(2): p. 322-331.
124. Koleva, B.B., et al., *Bis(tyrammonium) sulfate dihydrate: Crystal structure, solid-state IR-spectroscopic and theoretical characterization*. *Journal of Molecular Structure*, 2008. **888**(1-3): p. 138-144.
125. Baran, E.J., *Spectroscopic investigation of the VO₂⁺/chitosan interaction*. *Carbohydrate Polymers*, 2008. **74**(3): p. 704-706.
126. Addadi, L., et al., *A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: Relevance to biomineralization*. *Biological Sciences: Biophysics*, 1987. **84**: p. 2732-2736.
127. Yazdani-Pedram, M., A. Lagos, and P.J. Retuert, *Study of the effect of reaction variables on grafting of polyacrylamide onto chitosan*. *Polymer Bulletin*, 2002. **48**(1): p. 93-98.

-
128. Stannett, V.T., *The chemistry and technology of cellulosic copolymers*, A. Hebeish and J. T. Guthrie, Springer-Verlag, New York, 1981, 351 pp. Price: \$87.30. Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition, 1981. **19**(11): p. 576.
129. Mukkamala, S.B., C.E. Anson, and A.K. Powell, *Modelling calcium carbonate biomineralisation processes*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2006. **100**(5-6): p. 1128-1138.
130. Weisstein, E.W. "Torus." *From MathWorld*. 2008; Available from: <http://mathworld.wolfram.com/Torus.html>.
131. Jenkins, D.W. and S.M. Hudson, *Review of Vinyl Graft Copolymerization Featuring Recent Advances toward Controlled Radical-Based Reactions and Illustrated with Chitin/Chitosan Trunk Polymers*. Chemical Reviews, 2001. **101**(11): p. 3245-3274.
132. Lide, D.R., *CRC Handbook of Chemistry and Physics, 87th Edition*. 2007. **I**.
133. Jacob, D.E., et al., *Nanostructure, composition and mechanisms of bivalve shell growth*. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2008. **72**(22): p. 5401-5415.
134. Rousseau, M., et al., *Dynamics of sheet nacre formation in bivalves*. Journal of Structural Biology. **In Press, Uncorrected Proof**.
135. Manning, G.S., *A comparison of Manning's polyelectrolyte theory with the cylindrical Gouy model*. Comments. The Journal of Physical Chemistry, 1978. **82**(21): p. 2349-2351.
136. Hou, W.-T. and Q.-L. Feng, *Morphologies and Growth Model of Biomimetic Fabricated Calcite Crystals Using Amino Acids and Insoluble Matrix Membranes of Mytilus edulis*. Crystal Growth & Design, 2006. **6**(5): p. 1086-1090.