



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE POLISILOXANOS
SULFATADOS COMO INHIBIDORES DE LA MINERALIZACIÓN DE
OXALATO CÁLCICO MEDIANTE ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN
IN VITRO”**

FABIAN ALBERTO LUENGO PONCE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas Animales.

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

**SANTIAGO, CHILE
2013**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE POLISILOXANOS
SULFATADOS COMO INHIBIDORES DE LA MINERALIZACIÓN DE
OXALATO CÁLCICO MEDIANTE ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN
IN VITRO”**

FABIAN ALBERTO LUENGO PONCE

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas y Animales.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ANDRÓNICO NEIRA- CARRILLO
PROFESOR CONSEJERO: JOSE LUIS ARIAS
PROFESOR CONSEJERO: EDUARDO KESSI

**SANTIAGO, CHILE
2013**

“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE POLISILOXANOS SULFATADOS COMO INHIBIDORES DE LA MINERALIZACIÓN DE OXALATO CÁLCICO MEDIANTE ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN *IN VITRO*”

“PREPARATION AND EVALUATION OF SULPHATE POLYSILOXANES AS INHIBITORS OF THE MINERALIZATION OF THE CALCIUM OXALATE THROUGH *IN VITRO* CRYSTALLIZATION TESTS”

Fabian Alberto Luengo Ponce

Laboratorio de Materiales Bio-relacionados (CIMAT) Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Financiamiento FONDECYT N° 1110194

Resumen

El oxalato de calcio (CaOx) es el principal componente de los cálculos renales humanos. El CaOx presenta tres polimorfos cristalinos: CaOx monohidratado (COM), dihidratado (COD) y trihidratado (COT), siendo COM encontrados mayormente en pacientes litogénicos. En personas sanas la presencia de determinadas biomoléculas, inhibe la formación de COM y promueve la formación de COD. En este estudio se sintetizaron dos polimetilsiloxanos (PMS) funcionalizados con grupos sulfónicos (I-SO₃H-PMS y II-SO₃H-PMS) y se evaluaron sus efectos modificadores en la cristalización CaOx *in vitro*. Estos polímeros se prepararon mediante reacciones de hidrosilación y sulfonación usando poli (dimetil siloxano-co-hidrógeno metilsiloxano) como polímero de partida. Se preparó un derivado de I-SO₃H-PMS acoplado a una molécula fluorescente fluorescein-5-thiosemicarbazide y se evaluó su efecto como aditivo para conocer la adsorción de SO₃H-PMS en cristales CaOx. El análisis morfológico de cristales de CaOx, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), demostró que cristales monoclinicos COM son formados en ausencia de SO₃H-PMS. Sin embargo, variando la concentración de SO₃H-PMS en los ensayos de cristalización de CaOx se induce una transición de COM a morfologías de tipo multicapa y circular de hojas apiladas y la aparición de cristales COD tetragonales bi-piramidales. Se realizaron análisis de composición química y estructural de los cristales mediante EDS y XRD, respectivamente. Mediante EDS, se determinó la presencia de átomos de Si del polímero SO₃H-PMS, adsorbido en las superficies CaOx y, a través de XRD se describió la formación selectiva de cristales COM y COD. Se obtuvieron formas fluorescentes de CaOx con morfologías truncadas y redondeadas usando el aditivo fluorescente de SO₃H-PMS. En conclusión, se demostró que la presencia de grupos sulfónicos en la cadena principal PMS y la su concentración alteró la morfología, polimorfismo, nucleación y distribución del tamaño de los cristales de CaOx.

Palabras claves

Urolitiasis, polimetilsiloxano sulfonado, oxalato de calcio monohidratado (COM), oxalato de calcio dihidratado (COD)

Abstract

Calcium oxalate (CaOx) is the main component of human kidney stones. CaOx crystals exhibit three crystalline polymorphs: CaOx monohydrate (COM), dihydrate (COD) and trihydrate (COT); were COM being found mostly in lithogenic patients. In healthy persons the presence of specific biomolecules, inhibits COM formation and promotes COD formation. In this study two polydimethylsiloxanes (PMS) functionalized with sulfonic groups (I-SO₃H-PMS y II-SO₃H-PMS) were synthesized, and their effects as modifiers in the crystallization CaOx were evaluated in vitro. These polymers were developed by hydrosilylation and sulfonation reactions using poly (dimethyl siloxane -co-methylsiloxane hydrogen) as starting polymer. A fluorescent derivative of I-SO₃H-PMS was prepared using fluorescein-5- thiosemicarbazide and its additive effect evaluated for the adsorption of SO₃H-PMS in CaOx crystals. Morphological analysis of CaOx crystals, by scanning electron microscopy (SEM), showed that COM monoclinic crystals are formed in the absence of SO₃H-PMS. However, varying the concentration of SO₃H-PMS in CaOx crystallization tests induces a transition from COM type to circular multilayer stacked sheets morphologies and the occurrence of tetragonal bi- pyramidal COD crystals. Chemical and structural composition analyzes of crystals were conducted by XRD and EDS, respectively. By EDS, we determined the presence of Si atoms SO₃H-PMS polymer, adsorbed onto the surfaces CaOx and, by XRD the selective formation of COM and COD crystals, was described. Fluorescent forms of CaOx crystals were obtained with truncated and rounded morphologies using the fluorescent additive SO₃H-PMS. In conclusion, it was demonstrated that the presence of sulfonic acid groups in the main chain PMS and the additive concentration changed the morphology, polymorphism, nucleation and size distribution CaOx crystals.

Keywords

Urolithiasis, sulfonated polymethylsiloxane, Calcium oxalate monohydrate (COM), Calcium oxalate dihydrate (COD)

INTRODUCCIÓN

La biomineralización es un proceso que resulta en la formación de cristales inorgánicos, el cual es llevado a cabo por células especializadas de los organismos vivientes. La biomineralización o cristalización biológica es usualmente un evento esencial y fisiológico en plantas y animales, que da origen a la formación de estructuras con funciones complejas y variadas tales como conchas, huesos y dientes (1). Sin embargo, existe una manifestación patológica de este proceso denominada urolitiasis o formación de cálculos en las vías urinarias (2).

La urolitiasis es un problema de carácter mundial, se estima que la incidencia es cercana al 5% en Norteamérica y Europa. En EEUU la prevalencia en mujeres es menor que en hombres siendo ésta de 5 y 12%, respectivamente (3). A su vez, la recurrencia alcanza un valor de un 75% a los 20 años de presentada la enfermedad (4).

Los cálculos urinarios están compuestos de cristales inorgánicos y orgánicos unidos a proteínas. La cristalización y la subsecuente litogénesis o formación de piedras (litos) puede ocurrir con numerosas moléculas orgánicas presentes en la orina (4). Su formación resulta a partir de un cambio de fase, en la cual, sales disueltas se condensan en sólidos a un determinado

grado de sobresaturación (mayor cantidad de soluto que un solvente es capaz de disolver) (3). Sin embargo, el fenómeno de cristaluria o presencia de cristales en la orina se describe en un porcentaje importante de individuos sanos, por lo que su hallazgo no implica necesariamente la presentación de la enfermedad (5).

El principal constituyente cristalino de los cálculos urinarios corresponde a varias formas de oxalato cálcico (CaOx), las que se encuentran en un 70 a 80 % de los cálculos humanos (6). Por otro lado en animales de compañía, la incidencia de CaOx en perros y gatos ha ido adquiriendo una mayor relevancia e incluso se presenta como la principal causa de urolitos en ambas especies durante los últimos años (7, 8). El CaOx presenta tres polimorfos cristalinos (formas diferentes del cristal), como son: Oxalato de Calcio Monohidratado COM ($\text{CaC}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})$), Dihidratado COD ($\text{CaC}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_2$) y Trihidratado COT ($\text{CaC}_2\text{O}_4(\text{H}_2\text{O})_3$), siendo el polimorfo COM (poliforma patológica) el que se encuentra mayormente en los cálculos renales. Por otro lado, el polimorfo COD (forma saludable) se encuentra en menor proporción que COM y se presenta como cristales suspendidos en orina de individuos sanos. Su presencia supone la existencia de un mecanismo de protección contra la formación de cálculos urinarios. Entre los factores implicados en la etiopatogenia de la urolitiasis en mamíferos, se encuentran:

concentración de solutos, inhibidores y promotores de la cristalización urinaria como también las características morfoanatómicas propias del riñón, entre otros (5).

Los inhibidores de la urolitiasis son agentes que retardan los aspectos involucrados en el proceso de formación de cálculos renales tales como: nucleación, crecimiento y agregación de cristales, adhesión a células epiteliales renales, etc. Muchos estudios han abordado el tema de los inhibidores naturales presentes en la orina, describiendo la participación tanto de moléculas de bajo peso molecular, tales como: Pirofosfato, Magnesio, Citrato (2), como de macromoléculas de alto peso molecular tales como: Glicosaminoglicanos (Condroitín sulfato o heparán sulfato), y Proteínas (Osteopontina (OPN), Proteína de Tamm-Horsfall (THP), Nefrocalcina (NC), Protrombina Urinaria Fragmento1 (UPTF-1), etc (2). Debido a la complejidad de la formación de cálculos y los efectos de las proteínas urinarias en muchas etapas del proceso litogénico, las funciones fisiológicas de estas proteínas son difíciles de predecir. Sin embargo, la evidencia acumulada sugiere que las proteínas altamente aniónicas ricas en ácido aspártico y glutámico, se adsorben fuertemente a cristales urinarios e inhiben su crecimiento. Por otro lado, las proteínas débilmente ácidas (PTF1, THP, bikunina, albúmina), al parecer previenen predominantemente la

agregación y/o adherencia de los cristales a las células de la papila renal. Estas interacciones parecen estar relacionados a la carga superficial positiva de cristales COM bajo condiciones fisiológicas (9).

Actualmente, existe un gran interés en comprender el mecanismo por el cual estas moléculas funcionales ejercen su efecto inhibitorio, lo cual permitiría orientar la búsqueda de nuevas funcionalidades químicas, presentes en moléculas sintéticas, susceptibles de interactuar con los cristales de CaOx durante el proceso de formación de cálculos urinarios.

Un tipo de macromoléculas de alto peso molecular recientemente investigada en el laboratorio CIMAT del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, son los derivados de polimetilsiloxano (PMS) los cuales representan una alternativa en el proceso de formación de cálculos urinarios tanto en la prevención como en el tratamiento de la urolitiasis, al tener un amplio uso en el área médica y alimenticia. La superficie funcionalizada de derivados de PMS mediante la adición de grupos químicos aniónicos, permitiría un efecto similar a los inhibidores naturales presentes en la orina, inhibiendo así la biomineralización patológica del CaOx.

Recientemente, el uso de polímeros sintéticos derivados de PMS han sido

descritos como efectivos inhibidores en procesos de cristalización de materiales inorgánicos como por ejemplo, el carbonato de calcio (10). Es conocido que estos polímeros sintéticos o también llamados “Siliconas” poseen una unidad repetitiva básica llamada “siloxano”, de la cual la más ampliamente conocida está constituida por dos grupos metilo unidos lateralmente a cada átomo de silicio. Los PMS representan el mayor componente polimérico del reino inorgánico, los cuales corresponden a cadenas formadas por enlaces esteres de silicio-oxígeno, respectivamente (11). De esta forma, los átomos de silicio además de unirse a grupos orgánicos de metilo pueden enlazarse a otros grupos tales como: etil, propil, trifluoropropil, fenil, vinil, etc.

Estos nuevos grupos laterales orgánicos unidos a la cadena inorgánica de las siliconas le otorgan nuevas propiedades estructurales a los derivados de PMS y numerosas nuevas aplicaciones médicas y tecnológicas. Por ejemplo, las siliconas son comunes en el campo aeroespacial, debido principalmente a su alto rendimiento a bajas y altas temperaturas. En electrónica, son usadas como aislante eléctrico, encapsulamiento de componentes y otras aplicaciones específicas a la fabricación de semiconductores. Su durabilidad a largo plazo ha hecho que las siliconas se usen corrientemente en la industria constructora en productos como: selladores, adhesivos y recubrimientos a prueba de agua. Su

excelente biocompatibilidad hace que muchos derivados de PMS sean muy adecuados para su uso en aplicaciones de cuidado personal, farmacéuticas y médicas (11).

La presente Memoria de Título tiene como objetivo preparar y caracterizar un PDMS funcionalizado con grupos sulfónicos ($\text{SO}_3\text{H-PMS}$) y evaluar su efecto como un inhibidor selectivo de la formación de cristales COM en ensayos de cristalización de CaOx *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Para la preparación de los PMS funcionalizados con grupos sulfónicos ($\text{SO}_3\text{H-PMS}$) y los ensayos de cristalización *in vitro* de CaOx se utilizan los siguientes reactivos y solventes: Polimetilsiloxanos (PMS), estireno (C_8H_8), metilestireno (C_9H_{11}), ácido sulfúrico (H_2SO_4), tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$), diclorometano (CH_2Cl_2), metanol y tris(hidroximetil) aminometano (TRIS). Los solventes $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ y CH_2Cl_2 fueron purificados mediante ebullición y secado con sustancias secantes adecuadas. El H_2SO_4 (96-98%) fue usado como se recibió sin una purificación posterior. El catalizador dicitlopentadienil cloruro de platino (II) (Cp_2PtCl_2) que se utilizó en las reacciones de hidrosilación de

los PMS (copolímeros de PDMS-*co*-PMHS) con los reactivos de estireno y metilestireno, fue sintetizado previamente en el laboratorio CIMAT a partir del ácido hexacloroplatino y dicitlopentadieno. Los copolímeros de PDMS-*co*-PMHS utilizados se sintetizaron a partir de los monómeros cíclicos octametilciclosiloxano (D_4) y 1,3,5,7-tetrametilciclotetrasiloxano (D_4^H) mediante polimerización catiónica por apertura de anillo. Los PDMS-*co*-PHMS a funcionalizados con grupos sulfónicos en esta Memoria de Título poseen razón estequiométrica de 1:1 y 1:4 y pesos moleculares (PM) con valores de 16.349 y 10.143 (g/mol), respectivamente. Por otro lado, en los ensayos de cristalización *in vitro* de CaOx se utilizaron los reactivos de oxalato de sodio ($Na_2C_2O_4$), cloruro de calcio ($CaCl_2$), nitrato de calcio ($Ca(NO_3)_2$), acetato de sodio ($C_2H_3NaO_2$) cloruro de sodio (NaCl) y agua purificada.

Métodos

Funcionalización mediante reacciones de hidrosilación y sulfonación

En la reacción de hidrosilación de los copolímeros PMS se utilizó estireno para el copolímero de mayor peso molecular, y metilestireno para el de menor peso molecular como compuestos insaturados y Cp_2PtCl_2 como catalizador de la reacción de hidrosilación (12). Para esto, el estireno y el metilestireno (20 mol-% en exceso respecto

a la unidad Si-H del PDMS-*co*-PHMS) fueron disueltos en 100 ml de tolueno recién destilado, con una cantidad estequiométrica del copolímero de PDMS-*co*-PHMS correspondiente. La mezcla fue calentada a 85 °C bajo argón y se inyectaron 100 μ l de Cp_2PtCl_2 disueltos en diclorometano. Para ambas reacciones de hidrosilación se utilizaron una proporción molar Pt/SiH de 1.5×10^{-4} . Luego de la reacción de hidrosilación, el exceso de solvente y monómeros sin reaccionar fueron removidos usando un evaporador rotatorio (Heidolph Laborota 4001 efficient-HB digital) conectado a vacío a una velocidad de 90 rpm a 70 °C por una hora.

En la Figura 1 se muestra la reacción de hidrosilación entre el copolímero de PDMS-*co*-PMHS (1:1) modificado con el estireno y la incorporación del grupo estireno en el copolímero obteniendo el copolímero PDMS-*co*-PMHS modificado (Styr-PMS).

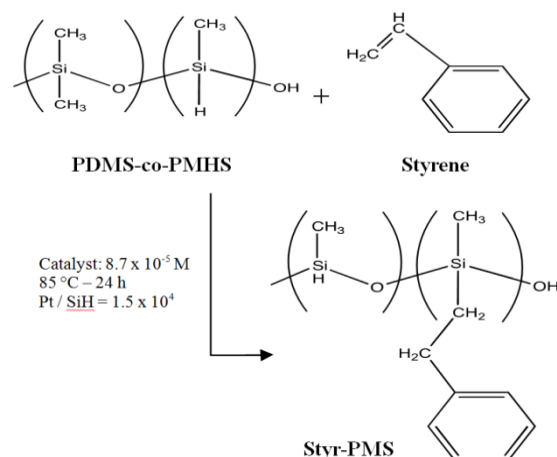


Figura 1. Síntesis del copolímero de PDMS-*co*-PMHS modificado mediante la reacción de hidrosilación.

Ambos copolímeros modificados de PDMS-co-PHMS modificados fueron secados bajo vacío a 40 °C por 72 horas. Los copolímeros funcionalizados de PDMS-co-PHMS con grupos sulfónicos a partir de los copolímeros modificados con estireno y metilestireno fueron preparados disolviendo el copolímero modificado en diclorometano con la cantidad estequiométrica de H₂SO₄ a temperatura ambiente durante toda la noche, después de lo cual la temperatura de la reacción fue incrementada a 80 °C e incubada durante 2 horas. Luego el producto de reacción fue evaporado, y los copolímeros funcionalizados de PDMS-co-PHMS lavados con metanol y secados bajo vacío a 40 °C durante 2 horas.

En la Figura 2 se muestra la reacción de sulfonación entre el copolímero modificado Styr-PMS con el H₂SO₄ y la incorporación del grupo sulfónico en el anillo aromático del grupo estireno obteniendo el copolímero funcionalizado de PDMS-co-PHMS (SO₃H-PMS). En este estudio, los copolímeros de PMS funcionalizados con estireno y metilestireno fueron denominados I-SO₃H-PMS y II-SO₃H-PMS, respectivamente. Para referirnos indistintamente a los polímeros utilizamos el término SO₃H-PMS.

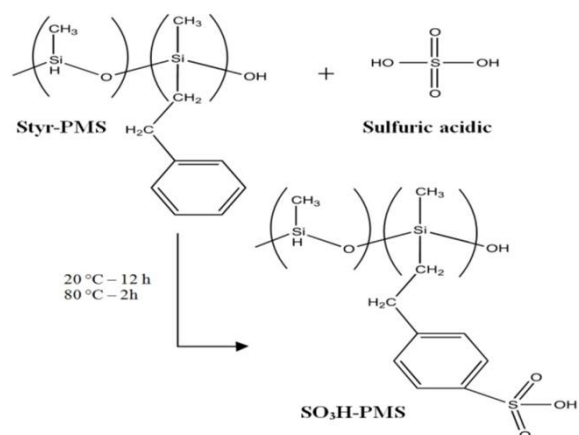


Figura 2. Síntesis de un copolímero de PDMS-co-PHMS funcionalizado con grupos sulfónico (SO₃H-PMS) mediante la reacción de sulfonación.

Acoplamiento de los polímeros funcionalizados a moléculas fluorescentes

Se utilizó Fluorescein-5-thiosemicarbazide (5-FTSC) (Invitrogen ®), como molécula fluorescente acoplada al polímero inicial SO₃H-PMS. La molécula FTSC es capaz de unirse a variados grupos aniónicos y derivados carbonílicos tales como carboxílico, aldehídos y cetonas. Esta capacidad de unión de las moléculas fluorescentes a polímeros fue utilizada como una estrategia de marcaje y de visualización molecular para determinar la adsorción superficial del polímero a los cristales de CaOx. Esta molécula se unió a los grupos aniónicos de SO₃H-PMS mediante una reacción de unión electrostática. La relación molar entre SO₃H-PMS y FTSC se estableció en 1:0,01. Para esto, se preparó una solución de 500 µl de agua purificada con 47 mg de SO₃H-

PMS y se mezcló con una solución de 10 µl de etileno y 0,63 mg de FTSC. Concentraciones más bajas del aditivo fluorescente se obtuvieron mediante dilución. Todas las soluciones fueron incubadas a 4 °C durante 1 hora antes de ser usadas.

Caracterización de los copolímeros de PDMS-co-PHMS funcionalizados

Se utilizó la técnica espectroscópica infrarroja (FTIR) para determinar grupos funcionales químicos contenidos en los polímeros de PDMS-co-PHMS funcionalizados. Esta técnica de FTIR permitió comprobar que los nuevos polímeros funcionalizados fueron realmente obtenidos y que sus estructuras químicas propuestas concuerdan con los productos esperados. Para la interpretación de los espectros de FTIR se utilizaron patrones de absorción de luz infrarroja de enlaces representativos tabulados en literatura (13). Los equipos FTIR que se utilizaron fueron los espectrómetros modelo Brucker Vector 22 y el FTIR Interspectrum Interspec p/n 200-X.

Cristalización de oxalato cálcico in vitro

Para la cristalización de CaOx se utilizaron 2 protocolos, detallados en la tabla 1. Para el protocolo A se utilizó el método descrito por Grohe et al. (9). Se prepararon 2 soluciones stock: la primera contendrá 10

mM de oxalato de sodio, 25mM de acetato de sodio y 375 mM de cloruro de sodio. La segunda solución contendrá 10 mM de nitrato de calcio, 25 mM de acetato de sodio y 375 mM de cloruro de sodio. Las reacciones se realizaron usando una razón de soluciones de 1:1:3, donde la última correspondió a agua desionizada y purificada. Cada solución fue precalentada a 37 °C previo a los ensayos de cristalización. Se realizaron 4 reacciones, cada una de ellas de 2 litros. La primera correspondió al control donde no se agregó aditivo. Luego 3 reacciones realizadas en presencia de SO₃H-PMS en concentraciones de 100, 500 y 1000 mg/l respectivamente, bajo 37 °C a pH de 6.7. Luego de 72 horas la mezcla de cada reacción se centrifugó y el sobrenadante secado a temperatura ambiente durante 72 horas y analizados posteriormente.

Para el protocolo B se utilizó un método similar al descrito por Kulaksizoglu et al. (14). Se utilizaron 2 soluciones stock: la primera contiene 1 mM de oxalato de sodio. La segunda contiene 10 mM de cloruro de calcio. Diferentes reacciones se realizaron con una razón de soluciones de 1:1. Se realizaron 5 reacciones, cada una de ellas de 20 ml. La primera sin aditivo como control, y 2 consecutivas donde se utilizaron SO₃H-PMS como aditivo en concentraciones de 16, 47, 160 y 470 mg/l, respectivamente. Las reacciones se realizaron a temperatura ambiente, a pH controlado en un rango de 3

a 6. Luego de 72 horas, las muestras fueron preparadas para ser evaluadas dependiendo de la técnica utilizada.

Para los ensayos de cristalización de CaOx en presencia de SO₃H-PMS fluorescente, se utilizó el protocolo B para las reacciones de cristalización, en tubos de ensayo de 30 ml. Se realizaron 4 reacciones en presencia de SO₃H-PMS fluorescente desde la solución stock descrita previamente, las que se realizaron de la siguiente forma: 100 µl de la solución inicial se adicionó como aditivo a la reacción de 470 mg/l, mientras que las de menores concentraciones 160, 47 y 16 mg/l se obtuvieron mediante diluciones a partir de la solución stock de 1:3, 1:10 y 1:30, respectivamente. Se mantuvieron durante 72 horas, a temperatura ambiente.

Tabla 1. Protocolos de cristalización de CaOx.

	Protocolo A	Protocolo B
Ca (mmol/l)	2	5
Ox (mmol/l)	2	0.5
Relación Ca:Ox	1:1	10:1
PMS (mg/l)	100, 500, 1000	16, 47, 160, 470
pH	6.7	3 - 6
T° (C)	37°	ambiente
Tiempo de reacción (h)	72	72

Caracterización de los cristales de oxalato de calcio

La evaluación morfológica de los cristales de CaOx obtenidos en los ensayos de cristalización *in vitro* se realizó mediante microscopía electrónica de barrido SEM usando un microscopio Tesla BS 343 A y un microscopio Zeiss 1540 XB. Posteriormente, los cristales CaOx fueron fijados a soportes metálicos y sombreados con oro en un equipo sombreador Electron Microscopy Sciences EMS-550 (Automated Sputter Coated).

La determinación de la composición química de los cristales de CaOx se realizó mediante un microscopio electrónico de barrido asociado a un detector con energía dispersiva (SEM-EDS) LEO 1420VP.

La adsorción de SO₃H-PMS a los cristales de CaOx se determinó mediante el análisis morfológico de los cristales de CaOx marcados con fluorescencia usando un microscopio óptico Nikon Eclipse E-600 conectado a un computador con software morfométrico (Image Pro-Plus, Media Cybernetics, USA). Las imágenes de los cristales fluorescentes fueron registradas a distintos aumentos (4x, 10x, y/o 40x) con una resolución de 2560 x 1920 pixeles mediante una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA).

La determinación de los polimorfos de los cristales de CaOx obtenidos en los ensayos de cristalización se realizó usando difracción de rayos X (XRD). La difracción de rayos X es una técnica de caracterización cristalográfica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal lo que permite dilucidar la estructura cristalina de éste. Los difractogramas de XRD se realizaron en cristales obtenidos con los polímeros funcionalizados SO₃H-PMS. Todos los difractogramas de XRD se obtuvieron en un equipo Siemens D-5000X.

Se utilizó la técnica espectroscópica infrarroja (FTIR) para determinar grupos químicos contenidos en los cristales y, obtener de esta forma la distribución de las fases de los cristales en las muestras. Los equipos FTIR que se utilizaron fueron los espectrómetros modelo Brucker Vector 22 y el FTIR Interspectrum Interspec p/n 200-X.

Mediante potencial zeta se determinó la densidad de carga superficial de los cristales de CaOx obtenidos en presencia de SO₃H-PMS, utilizando un analizador Zeta Plus (Brookhaven Instruments). El potencial zeta corresponde a la densidad de carga de un polielectrolito y se define como la diferencia de potencial promedio que existe en la doble capa eléctrica en la zona de corte entre la partícula cargada móvil y la fase líquida inmóvil de la partícula en suspensión. Las medidas de potencial zeta

se realizaron en cubetas desechables usando muestras de cristales formados en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de SO₃H-PMS. Para esto, 1.6 mg de cada muestra fue diluido en 5 ml de solución de KCl 1 mM.

Se realizaron mediciones cinéticas mediante espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) con el objeto de revelar el comportamiento cinético de cristalización en presencia del polímero. Se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Rayleigh UV-2601.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación y caracterización de los polímeros funcionalizados SO₃H-PMS

La preparación de los polímeros SO₃H-PMS usados como aditivos en las cristalizaciones *in vitro* de CaOx involucraron 2 etapas. Primero el PDMS-co-PMHS inicial fue modificado a través de la reacción de hidrosilación y luego los polímeros funcionalizados SO₃H-PMS se obtuvieron mediante una reacción de funcionalización usando grupos sulfónicos. La estructura del polímero usado como aditivo fue confirmada por análisis FTIR (Fig. 3). La ausencia de la banda de absorción 2100 cm⁻¹ en el aditivo polimérico, que corresponde a la unión Si-H presente en el polímero inicial, confirmaría la reacción de hidrosilación. La reacción de

sulfonación puede ser evidenciada debido a la presencia de bandas de vibración de grupos sulfónico (-SO₃H), en los picos de absorción 1040 y 1180 cm⁻¹ (15).

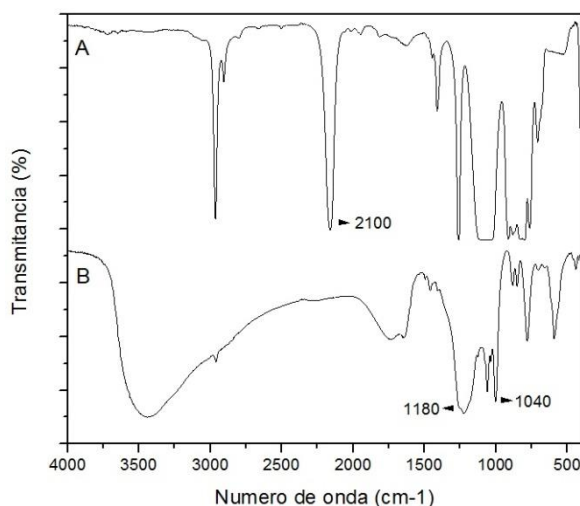


Figura 3. FTIR de polímero inicial (A) y SO₃H-PMS (B).

Efectos del aditivo polimérico en las fases y morfología de los cristales generados

Se llevaron a cabo cristalizaciones de oxalato de calcio *in vitro* en presencia de ambos aditivos poliméricos SO₃H-PMS para evaluar su influencia en la distribución de fase y morfología de estos cristales, y determinar su posible rol inhibitor selectivo de estos cristales. Para esto, las técnicas SEM y XRD fueron utilizadas para determinar la distribución de fases de los cristales, y sus respectivas morfologías. El protocolo A (ver Tabla 1) fue utilizado para la realización de los ensayos de cristalización de CaOx.

La influencia de los aditivos poliméricos a diferentes concentraciones, frente a los cristales formados en los ensayos descritos, se evidencia tanto en la distribución de las fases, como en la morfología de estos, los cuales presentan patrones clásicamente distinguibles. En el ensayo control (Fig. 4B, 4C), se presentó sólo una fase, COM, la cual describe una morfología con caras planas (100), con presencia de porosidad (010) (121), y bordes aguzados, descripción típica de COM. Morfológicamente, estos cristales presentaron caras (010) planas y superficie homogéneas, con una longitud de 20-25 µm y un ancho de 8-10 µm.

Los cristales formados en presencia de 100 mg/l de I-SO₃H-PMS (Fig. 4D, 4E, 4F), mantienen la presencia exclusiva de la fase COM, sin embargo, la morfología de estas evidencia algunas alteraciones, las que varían dependiendo a cuál cara corresponda. Es así como, la cara (100) presentó una forma cóncava y una superficie con una superficie lisa, mientras que las caras (010) y (121) describen una forma plana y superficies escoriadas. Los bordes mantienen cierta agudeza pero no se muestran definidas en comparación a la muestra control. La distribución de tamaños es heterogénea con longitudes que varían de 20-100 µm, y ancho de 10-30 µm.

En presencia de 500 mg/l de I-SO₃H-PMS (Fig. 4G, 4H, 4I), los cristales describen una morfología aún más diferenciada, además

de la aparición de una segunda fase del cristal CaOx, COD. En primer lugar, los bordes de los cristales, presumiblemente COM, se pierden completamente. La cara (100) se pliega sobre sí misma y ésta queda como una pequeña depresión, en donde las caras (010) opuestas tienden a unirse por sus bordes paralelos, quedando la cara (121) sólo como ápices de estos cristales. Grohe *et al.* (9), describe un comportamiento similar de cristalización de la fase COM formados en presencia de diferentes formas de osteopontina. La mayor parte de la superficie del cristal corresponde a la cara (010), la que describe una forma de “*hojas apiladas*”. La distribución de tamaños se mantiene heterogénea variando de 30-100 μm de longitud y 20-50 μm de ancho. Los cristales COD se presentaron en menor cantidad en comparación a los COM. Además, su morfología varió de tipo estrellada con cuatro extremos, a bi-piramidal de base

cuadrada. Los tamaños cristalinos se presentan homogéneos. Se aprecian lados de iguales dimensiones, las que varían de 30-50 μm .

Los cristales formados en presencia de 1000 mg/l de I-SO₃H-PMS (Fig. 4J, 4K, 4L), mantienen una mezcla de fases COM y COD, con una clara superioridad numérica para COM. El crecimiento de la cara (010) de los cristales COM es tal que, en la mayoría de estos, la cara (100) está completamente plegada sobre sí misma y se confunde con las hojas apiladas de la cara (010). Tal es el crecimiento hacia los costados de las caras (010), que el cristal ha tomado una forma esferoidal, con polos mas aplanados los cuales corresponderían a las caras (121). El tamaño de las esferas varió de 25-60 μm de diámetro. Los cristales COD, se evidencian con dificultad, pero aún mantienen su forma bi-piramidal característica.

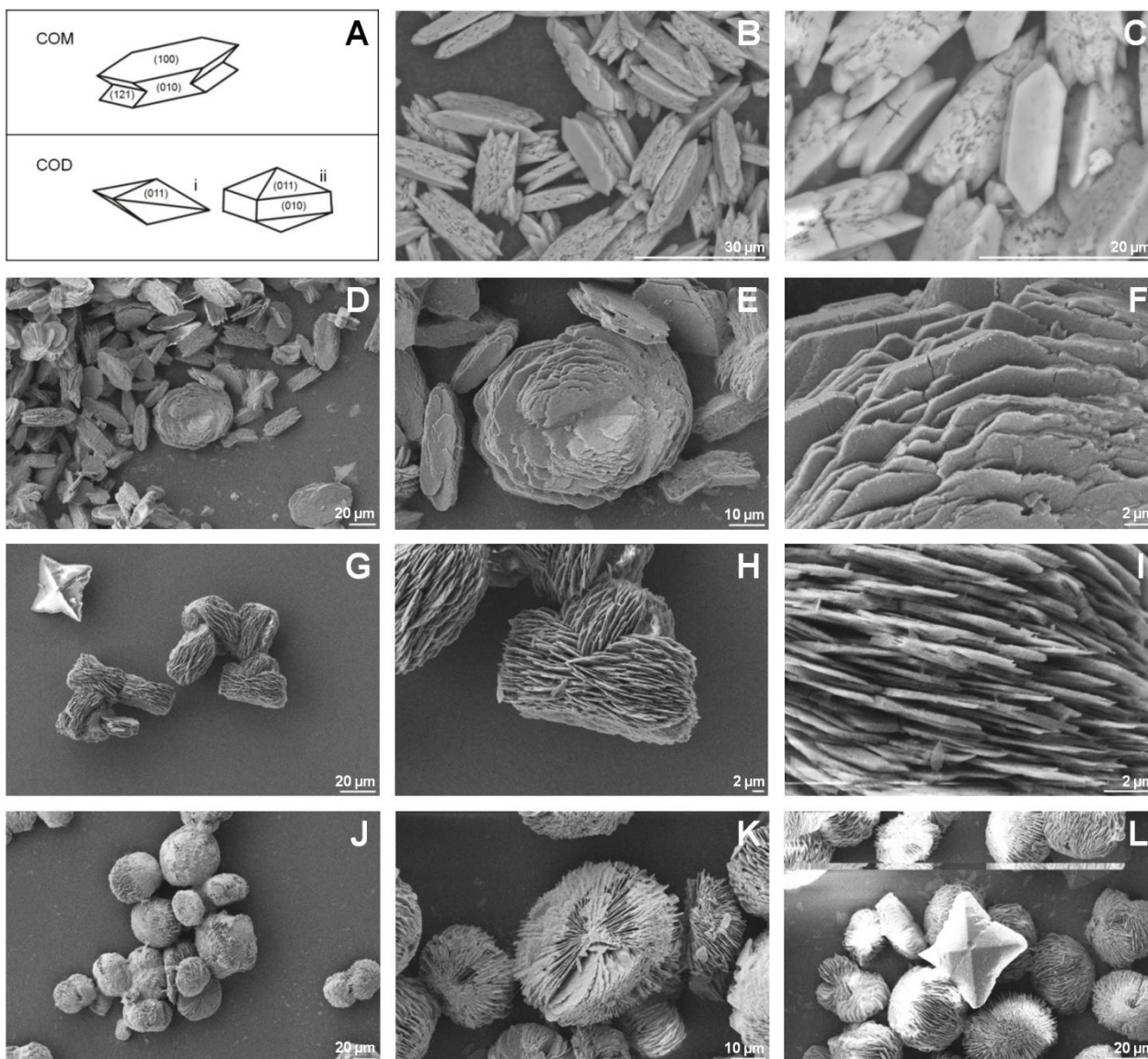


Figura 4. Imágenes SEM de cristales de CaOx formados en presencia de I-SO₃H-PMS, a 37 °C por 72 horas: Esquemas de caras de cristales COM y COD (bipirámide tetragonal “i”, prisma tetragonal “ii”) (A), control sin aditivo (B, C), 100 mg/l (D, E, F), 500 mg/l (G, H, I), 1000 mg/l (J, K, L).

La técnica analítica de XRD fue utilizada para entregar información cristalográfica de los cristales y complementar las imágenes SEM obtenidas de ellos y determinar la o las fases de los cristales de CaOx descritos en las muestras. Cuando no se utilizó aditivo (control), los resultados del análisis de XRD mostró un difractograma con un

patrón característico de COM (Fig. 5A). Picos cristalinos de difracción de cristales COM aparecen en los valores de 2 theta (θ) de 14,92° para la reflexión (-101), 24,37° para la reflexión (020), 30,11° para la reflexión (-202) y de 38,18° para la reflexión (130). El patrón de difracción se mantiene para el resto de las muestras donde se

utilizó I-SO₃H-PMS como aditivo en las cristalizaciones *in vitro* (Fig. 5B, 5C, 5D), lo cual sugiere que los cristales con forma esférica corresponderían a cristales COM modificados.

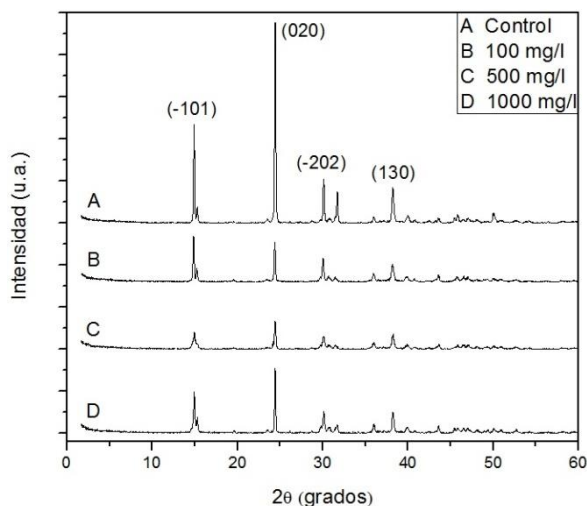


Figura 5. Difractogramas de rayos X pertenecientes a cristales de CaOx formados en presencia de I-SO₃H-PMS, a 37 °C por 72 h: Control sin aditivo (A), 100 mg/l (B), 500 mg/l (C), 1000 mg/l (D).

Adicionalmente, se realizó un análisis mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) a los cristales formados en presencia de I-SO₃H-PMS, para complementar información estructural de estos a las técnicas previas. Se utilizaron patrones infrarrojos de COM y COD puros de piedras naturales, como referencia (16). Los resultados FTIR de los cristales se muestran en la figura 6. La principal banda de estiramiento del carbonilo anti-simétrico específico a la familia del oxalato corresponde a 1620 cm⁻¹ para COM, valor muy cercano a los obtenidos en totalidad de las muestras, y en

ningún caso cercanos al del COD, correspondiente a 1640 cm⁻¹. Semejante situación se describe para la banda secundaria de estiramiento del carbonilo, el cual se sitúa en 1315-1316 cm⁻¹ para COM, y que se desplaza a 1324-1325 cm⁻¹ para el COD, donde los valores de todas las muestras se identifican solo con aquella descrita para COM. Ambas fases de los cristales describen una banda ancha de agua con una banda de absorción en 3485 cm⁻¹, el cual se describe dentado para COM y pierde definición para COD. Las muestras en ningún caso evidencian valores cercanos a las bandas de absorción secundarias de 912 y 611 cm⁻¹ correspondientes a COD, pero si a los valores de 948, 885 y 663 cm⁻¹ pertenecientes a COM. Por lo tanto, estos resultados realizados a la muestra control como aquellas con I-SO₃H-PMS a diferentes concentraciones, evidencian un patrón similar en donde se confirma la presencia de cristales COM. La existencia de cristales COD no puede comprobarse en base a los resultados descritos, esto debido a que COM proporciona dos o tres veces vibraciones más intensas que los cristales COD, y en consecuencia, más difíciles de reconocer que COM en un espectro mixto (17). A su vez, la presencia esporádica de cristales COD con respecto a COM constatada en las imágenes SEM, podría explicar los resultados FTIR y de XRD con respecto a cristales COD.

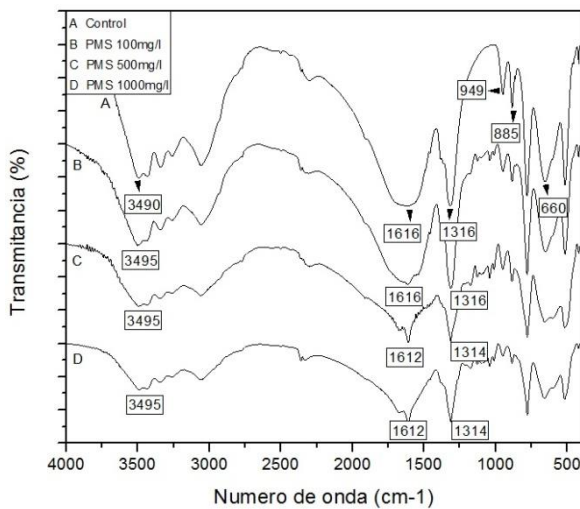


Figura 6. Espectro FTIR de cristales CaOx formados en presencia de I-SO₃H-PMS, a 37 °C por 72 horas: Control sin aditivo (A), 100 mg/l (B), 500 mg/l (C), 1000 mg/l (D).

La evidencia del aditivo I-SO₃H-PMS como un efectivo modificador, en donde éste altera la morfología de los cristales y la distribución de fases de los cristales formados desde una presencia exclusiva de COM (control), hacia una mezcla de fases COM y COD, la cual es promovida a medida que aumenta la concentración del polímero, son respaldados por experimentos que utilizan tanto ensayos en orina humana sana como de individuos litogénicos (18), y de cristalización en presencia de algunos inhibidores naturales en orina (9). El cambio en la morfología de la fase COM se debería a la presencia de estos compuestos naturales.

Es bien conocido que la mayor parte de las pequeñas y macromoléculas presentes en orina tienen regiones polianiónicas. Estas funcionalidades químicas son susceptibles

de interactuar con regiones específicas de los cristales. La cara principal (100) de los cristales COM posee iones que emergen oblicuamente hacia la superficie del cristal junto a un patrón denso de iones Ca²⁺ expuestos. Esto significa que la cara (100) posee iones ricos en Ca²⁺ y que, por ende, están cargados positivamente. De esta forma, moléculas cargadas negativamente pueden interactuar fuertemente con iones Ca²⁺ densamente empaquetados dentro de la cara (100) a través de unión electrostática y así bloquear el crecimiento de COM (18). Sin embargo, no todas las caras expresan la misma distribución elemental. Es así como la cara (121) es menos rica en iones Ca²⁺ que la cara (100), mientras que la cara (010) exhiben una superficie rica en iones de oxalato (C₂O₄²⁻) en comparación a las caras (100) y (121) (9). De esta manera, las moléculas cargadas negativamente interactúan en menor grado con estas caras, especialmente la cara (010), permitiendo un crecimiento con menor restricción en estas, a lo largo de la cara (100).

El fenómeno antes descrito puede explicarse de la siguiente forma. A niveles bajos de sobresaturación cercanos al estado de equilibrio, tienen lugar formas monoclinicas de cristales COM. Sin embargo, a medida que aumenta la sobresaturación, aparecen formas dendríticas de los cristales para posteriormente desarrollarse morfologías

denominadas esferulitas. Estas, son una forma de agregados policristalinos que crecen bajo condiciones de alta fuerza de inducción. Esto puede deberse a que los cristales, durante el crecimiento, se dividen pero sólo se separan parcialmente como resultado de defectos estructurales o cuando diferentes iones son incorporados como impurezas (19). De esta forma macromoléculas con sitios iónicos, mediante la adhesión a una cara del cristal, pueden estar actuando como centros de nucleación de nuevos cristales mediante el uso de los radicales restantes, resultando finalmente en acumulación de cristales. A medida que la agregación aumenta, los cristales individuales aparecen más en forma laminar, donde aquellos más externos se pliegan sobre sí mismos para desarrollar la forma esférica final.

Por lo tanto, la distribución de ambos iones en la matriz del cristal de CaOx, y la consecuente expresión específica de las cargas en cada cara de su superficie, explicarían la alteración morfológica del cristal COM en nuestros ensayos. En los cristales COD, las caras (011) y (010), incluyen moléculas de agua en alta concentración que se alternan con capas de agua pura, reduciendo en gran medida la carga iónica superficial de los cristales. De esta forma los cristales COD interactúan en menor grado con las moléculas urinarias negativamente cargadas, promoviéndose la formación de estas en la orina (18). Al

respecto, en nuestros ensayos frente a la presencia de mayores concentraciones de SO₃H-PMS, se evidencia la promoción de cristales COD, con un cambio mínimo en la morfología típica de éstos. Sin embargo, la presencia de cristales COD frente a COM se mantiene cuantitativamente escasa, aún en altas concentraciones de I-SO₃H-PMS.

Las imágenes SEM y difractogramas XRD de los cristales formados en presencia del segundo aditivo II-SO₃H-PMS, evidencian una muy baja influencia de este aditivo polimérico en la formación de los cristales. Las imágenes SEM de cristales formados en presencia de 100 y 500 mg/l de II-SO₃H-PMS muestran cristales de CaOx con morfologías y tamaños indistinguibles de aquellos obtenidos en la muestra control, los cuales corresponden a la fase COM típica. Estos resultados se ven respaldados por los difractogramas de XRD de los cristales obtenidos en presencia de ambas concentraciones de II-SO₃H-PMS, los cuales corresponden a un único patrón de difracción característicos de COM.

En base a esta evidencia, las técnicas restantes de caracterización de los cristales se utilizaron sólo para aquellos formados en presencia del polímero I-SO₃H-PMS por su mejor efecto como aditivo.

Análisis elemental de la superficie de los cristales de CaOx

La finalidad del análisis elemental de la superficie de los cristales obtenidos a diferentes concentraciones de I-SO₃H-PMS, es dilucidar los elementos constitutivos de la superficie de los cristales de CaOx y relacionarlos con los hallazgos de morfología y distribución de fases en los ensayos de cristalización *in vitro* bajo cada concentración del aditivo. Al respecto, para pesquisar la presencia del polímero en la superficie de los cristales, se consideró el silicio (Si) como un elemento constitutivo específico del aditivo polimérico. Para la realización de la prueba se utilizó el procedimiento A.

El análisis de energía dispersiva de rayos X (EDS) de los cristales muestra valores para Ca y Si, tanto porcentaje de peso como porcentaje atómico (Fig. 8), en la superficie de los cristales. Para determinar la afinidad del polímero por la superficie del cristal, se utilizó la razón Ca/Si con los valores de porcentaje atómico (20), los cuales fueron comparados entre sí en base a las concentraciones del aditivo y fases de los cristales. Los valores de Ca/Si obtenidos se muestran en figura 7. Las muestras

analizadas correspondientes al control y a una concentración de 100 mg/l de I-SO₃H-PMS, no presentaron valores de Si detectables. La razón Ca/Si obtenidos al comparar los cristales COM formados en presencia de 500 y 1000 mg/l de aditivo fue de 36.68 y 20.5, respectivamente. Esto significa que la presencia del átomo de Si en la superficie de los cristales COM fue más significativo a mayor concentración del polímero. Por otro lado, al comparar el Si en la superficie de las fases de los cristales formados en presencia de 1000 mg/l, las razones Ca/Si fueron de 20.5 y 88.5 para COM y COD, respectivamente. La presencia del Si en la superficie de los cristales COM es al menos 4 veces mayor que en la superficie de los cristales COD.

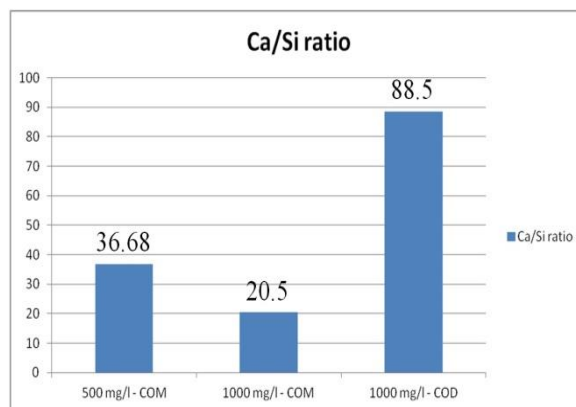


Figura 7. Comparación de porcentaje átomos de Ca y Si obtenidos mediante análisis EDS de cristales COM y COD, a 500 y 1000 mg/l de aditivo I-SO₃H-PMS.

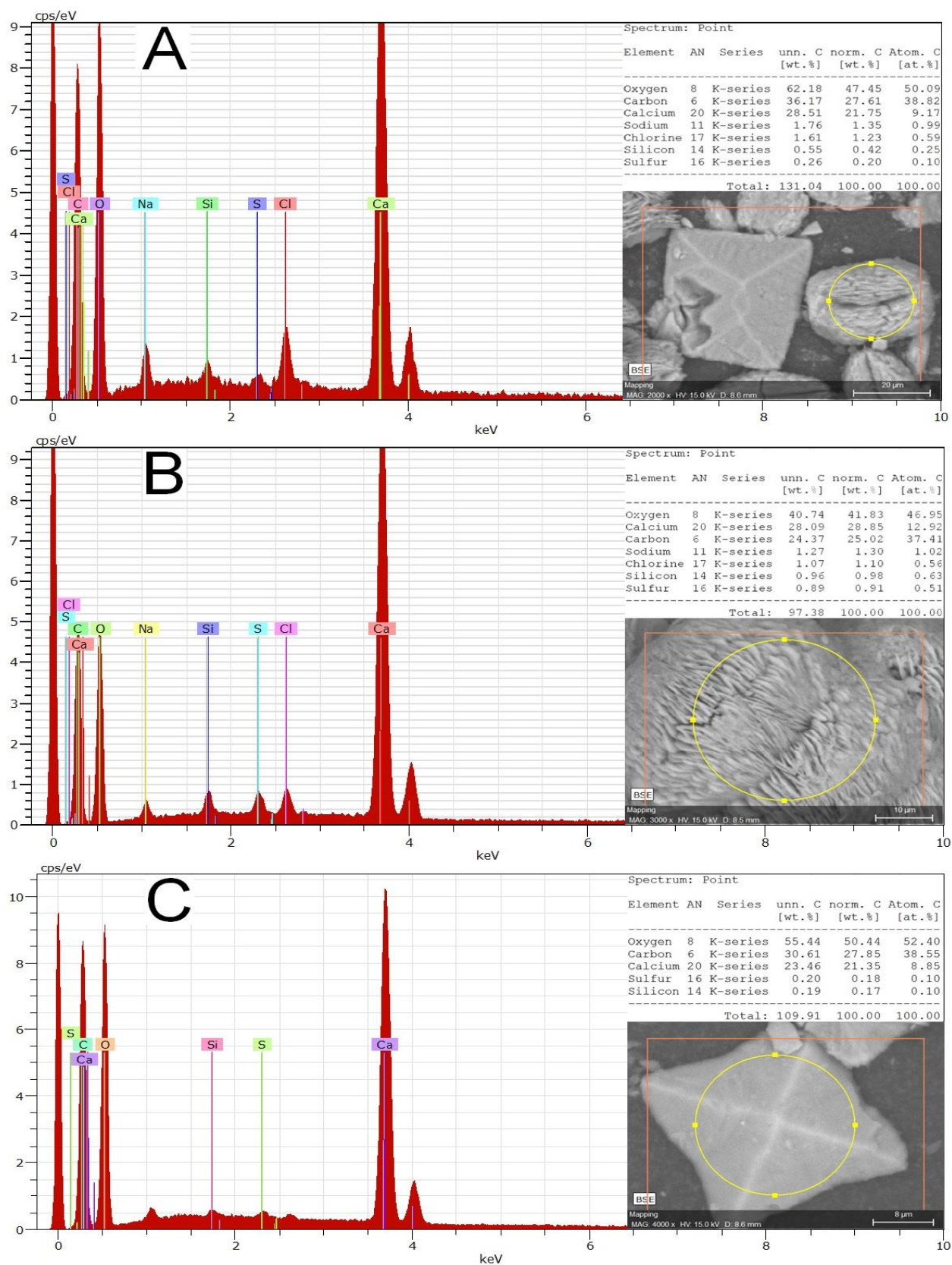


Figura 8. Análisis elemental SEM-EDS de cristales de CaOx en presencia de I-SO₃H-PMS a diferentes concentraciones. 500 mg/l (A), 1000 mg/l (B, C). La composición química elemental fue obtenida del área interna del círculo amarillo demarcado.

Se determinó la densidad de carga en la superficie de cristales mediante potencial zeta. Se midieron cristales formados en presencia de 0, 100, 500 y 1000 mg/l de I-SO₃H-PMS como aditivo polimérico en los ensayos de cristalización. Los resultados mostraron que a concentraciones más altas del aditivo I-SO₃H-PMS durante el ensayo de cristalización, la densidad de carga en la superficie de los cristales presentó valores cada vez más negativos, siendo estos de -5,27 mV, -53,43 mV, -50,51 mV y -64,30 mV, respectivamente. Scurr y Robertson. [21], sugieren que las sustancias macromoleculares tales como GAGs se adhieren reversiblemente a la superficie de los cristales de CaOx aumentando la carga negativa en la superficie de estos, fortaleciendo a su vez la fuerza de repulsión eléctrica entre los cristales. Por lo tanto, la agregación y el crecimiento de los cristales se inhiben. También ha sido sugerido que la fuerza de los efectos inhibitorios puede depender de la densidad de carga negativa que contiene o al número de iones sulfato, así como la distancia entre los iones sulfato en la propia molécula (22).

Adsorción del SO₃H-PMS fluorescente a los cristales de CaOx

Los ensayos de cristalización de CaOx en presencia de I-SO₃H-PMS acoplado a la molécula fluorescente FTSC, fueron realizados para evaluar cualitativamente la adsorción de I-SO₃H-PMS a la superficie del

crystal. Como procedimiento de cristalización se utilizó el protocolo B.

La molécula fluorescente acoplada al aditivo I-SO₃H-PMS, no parece haber influenciado en la distribución de fases en los cristales, ni en la morfología de estos. Los patrones de alteración antes descritos en las imágenes SEM, se mantienen. Los cristales COM se evidencian con mayor fluorescencia que los cristales COD. En la figura 9, en nivel de fluorescencia de la fase COM es significativamente mayor que la fase COD, la cual se muestra prácticamente translúcida. Por otro lado, en estos ensayos fue posible confirmar la presencia de los cristales COD.

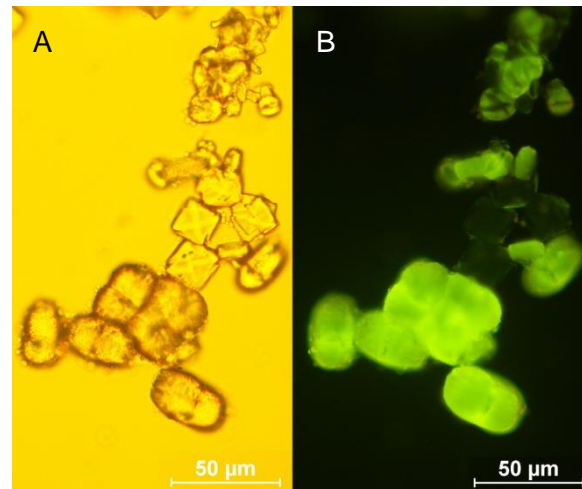


Figura 9. Imagen de microscopía óptica de fluorescencia de cristales CaOx formados en presencia de 160 mg/l de I-SO₃H-PMS fluorescente, a 37°C por 72 horas: Modo óptico (a), modo fluorescencia (b).

La técnica de microscopía óptica de fluorescencia reafirma la mayor afinidad del I-SO₃H-PMS, como molécula polianiónica,

por el cristal COM en comparación a COD, debido a la menor carga catiónica superficial de esta última.

Adicionalmente, en la presente Memoria de Tesis se realizaron mediciones cinéticas usando espectrofotometría ultravioleta-visible (UV-VIS) con el objeto de revelar el comportamiento cinético de cristalización en presencia de I-SO₃H-PMS. El protocolo usado corresponde al B. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 620 nm durante 20 minutos a partir de la iniciación de las reacciones de cristalización. Los resultados se muestran en la figura 10. El incremento en la absorbancia refleja un aumento de partículas en función del tiempo. Este incremento corresponde a la tasa de formación de nuevas partículas cristalinas, y en consecuencia, nucleación. Cuando el equilibrio ha sido alcanzado la absorbancia disminuye, lo cual implica que no se han formado nuevas partículas debido a agregación de cristales (14). El pico de mayor absorción UV muestra entonces el equilibrio entre nucleación y agregación. Las muestras indican un patrón de picos de absorción UV entre 2 a 10 minutos a partir del comienzo de la reacción, el cual se explica por este límite nucleación/agregación. Sin embargo, cuando la concentración del aditivo se incrementa, la intensidad del pico de absorbancia disminuye, sugiriendo que el tiempo de nucleación se extiende más allá

de 20 minutos, alargando con ello el periodo de inducción de la cristalización.

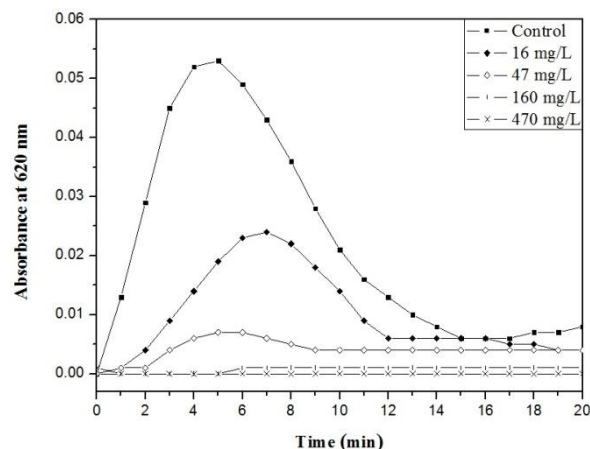


Figura 10. Mediciones cinéticas UV-VIS de cristales de CaOx formados en presencia de I-SO₃H-PMS, usando el Protocolo B. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 620 nm durante 20 minutos de iniciada las cristalizaciones. Las concentraciones de I-SO₃H-PMS fueron de 0 mg/l (control), 16 mg/l, 47 mg/l, 160 mg/l, y 470 mg/l.

Este comportamiento es abordado por Akin *et al.* (23), quien sugiere que aditivos con grupos aniónicos en altas concentraciones, aumentan la fuerza iónica donde pueden producirse interacciones con los iones de carga positiva (Ca²⁺). Si el inhibidor es rápidamente absorbido, el núcleo se mantiene subcrítico y eventualmente desaparece por disolución. Los polianiones del inhibidor estarán disponibles para absorciones repetidas de núcleos de desarrollo reciente. Esto conduce eventualmente a la descomposición y desintegración de un número de embriones disponibles antes que pueda tener lugar un mayor crecimiento. De este modo se obstaculiza la expansión del núcleo más allá

de su tamaño crítico. Así, los polímeros prolongarán los períodos de inducción mediante la reducción efectiva del número de sitios de crecimiento activos a través de la adsorción sobre la superficie del cristal. Durante el período de inducción, la mayor parte de los sitios de crecimiento activos están bloqueados por las macromoléculas adsorbidas de los aditivos. Sin embargo, algunos de los sitios de crecimiento de baja energía pueden estar todavía libres para crecer y, por lo tanto, la reacción de crecimiento cristalino se desarrolla a una velocidad más lenta.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos mediante los análisis de SEM, XRD, FTIR y potencial zeta, evidencian la distribución y morfologías de las fases COM y COD de los cristales. La afinidad I-SO₃H-PMS como un aditivo aniónico por los cristales COM resultó más intensa en las caras que expresan iones Ca²⁺, siendo esta en mayor magnitud en la cara (100) y en menor grado en la cara (121). Así, las caras (010) y (121) crecen con menor restricción en mayor y menor magnitud, respectivamente. Adicionalmente, sumado a las condiciones de alta saturación de los reactantes, permite el amplio desarrollo de cristales COM modificados de tipo “esferulitas”.

Por otro lado, la poca afinidad del I-SO₃H-PMS por la cara (011) de los cristales COD con baja carga debido a la gran proporción de agua en su superficie no restringe su desarrollo, lo que permite su crecimiento y nula alteración de su morfología bi-piramidal típica.

La espectroscopía UV nos permite conocer el efecto del aditivo I-SO₃H-PMS y su concentración sobre la nucleación de los cristales de CaOx, comprobándose que el tiempo de nucleación de los cristales se aplazó sobre los 20 minutos, en contraste con el control y con bajas concentraciones de aditivo, cuyos valores registrados fueron de 2 a 10 minutos. Los análisis de EDS y de fluorescencia nos permitieron visualizar la afinidad específica de I-SO₃H-PMS por los cristales COM en contraste con COD.

De los dos aditivos poliméricos ensayados, el I-SO₃H-PMS resultó un efectivo modulador tanto de la morfogénesis y de los aspectos cristalográficos. En el caso del aditivo II-SO₃H-PMS, su efecto controlador en los ensayos de cristales de CaOx fue incierto. A su vez, la unión cristal-polímero a nivel atómico es inviable debido a que probablemente los polianiones del aditivo no armonizan con la distribución elemental de las caras de los cristales.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta Memoria de Título demuestran que la presencia de grupos sulfónicos en la

cadena principal de los aditivos poliméricos SO₃H-PMS y su concentración alteró la morfología, polimorfismo, nucleación y distribución del tamaño de los cristales de CaOx.

AGRACEDIMIENTOS

Quiero agradecer al laboratorio de Materiales Bioinspirado CIMAT y a sus integrantes por la predisposición, cooperación, profesionalismo y el espíritu de servicio de todos ellos. En especial, a mi profesor guía, el Dr. Andrónico Neira-Carrillo, por su capacidad de orientación, entusiasmo, profesionalismo y paciencia al asistirme durante esta importante etapa. Agradezco también al proyecto Fondecyt 1110194, por el apoyo financiero.

Quiero expresar mi gratitud hacia mi familia, padre y madre, hermana y sobrina; que con su dedicación, sacrificio, esfuerzo y por sobretodo amor incondicional, me acompañaron no solo en este periodo decisivo, sino que en todo mi desarrollo personal y más recientemente, profesional.

La realización de cada etapa en la elaboración de esta tesis no habría sido posible sin el apoyo y la colaboración de todos ellos.

REFERENCIAS

1. **ESTROFF, L. 2008.** Introduction: Biomineralization. *Chemical Reviews* 108 (11): 4329-4331.
2. **RYALL, R.L. 1997.** Urinary inhibitors of calcium oxalate crystallization and their potential role in stone formation. *World Journal of Urology* 15 (3): 155-164.
3. **COE, F., EVAN, A., WORCESTER, E. 2005.** Kidney stone disease. *The Journal of Clinical Investigation* 115 (10): 2598-2608.
4. **ORSON, W.M. 2006.** Kidney stones: pathophysiology and medical management. *The Lancet* 367 (9507): 333-344.
5. **MUÑOZ, J.A. 2004.** Litiasis renal oxalocálcica. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 29 p.
6. **WESSON, J., WARD, M. 2007.** Pathological biomineralization of kidney stones. *Elements* 3 (6): 415-421.
7. **HOUSTON, D.M., MOORE, A.E.P. 2009.** Canine and feline urolithiasis: Examination of over 50 000 urolith submissions to the Canadian Veterinary Urolith Centre from 1998 to 2008. *The Canadian Veterinary Journal* 50 (12): 1263-1268.

8. **PICAVET, P., DETILLEUX, J., VERSCHUREN, S., SPARKES, A., LULICH, J., OSBORNE, C., ISTASSE, L., DIEZ, M. 2007.** Analysis of 4495 canine and feline uroliths in the Benelux. A retrospective study: 1994–2004. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 91 (5-6): 247-251.
9. **GROHE, B., TALLER, A., VINCENT, P.L., TIEU, L.D., ROGERS, K.A., HEISS, A., SOERENSEN E.S., MITTLER, S., GOLDBERG, H.A., HUNTER G.K. 2009.** Crystallization of calcium oxalates is controlled by molecular hydrophilicity and specific polyanion-crystal interactions. *Langmuir* 25 (19): 11635-11646.
10. **NEIRA-CARRILLO, A., VÁSQUEZ-QUITRAL, P., YAZDANI-PEDRAM, M., ARIAS, JL. 2010.** Crystal growth of CaCO_3 induced by monomethylitaconate grafted polymethylsiloxane. *European Polymer Journal* 46 (6): 1184-1193.
11. **COLAS, A., CURTIS, J. 2004.** Silicone biomaterials: History and chemistry & Medical applications of silicones. In: Ratner, B., Hoffman, Allan, Schoen, F., Lemons, J. (Eds.), *Biomaterial Science: An introduction to materials in medicine*, pp. 80-86.
12. **APFEL, M., FINKELMANN, H., JANINI, G., LAUB, R., LUEHMANN, B., PRICE, A., ROBERTS, W., SHAW, T., SMITH, C. 1985.** Synthesis and properties of high-temperature mesomorphic polysiloxane (MEPSIL) solvents: biphenyl- and terphenyl-based nematic systems. *Analytical Chemistry* 57 (3): 651-658.
13. **RUBINSON, K., RUBINSON, J. 2000.** Espectrometría y análisis elemental. In: *Análisis Instrumental*, Pearson Prentice Hall, pp 880.
14. **KULAKSIZOGLU, S., SOFIKERIM, M., CEVIK, C. 2007.** Impact of various modifiers on calcium oxalate crystallization. *International Journal of Urology* 14 (3): 214-218.
15. **MARTINS, C.R., RUGGERI, G., PAOLI, M.A. 2003.** Synthesis in pilot plant scale and physical properties of sulfonated polystyrene. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14 (5): 797-802.
16. **MAURICE-ESTEPA, L., LEVILLAIN, P., LACOUR, B., DAUDON, M. 2000.** Advantage of zero-crossing-point first-derivative spectrophotometry for the quantification of calcium oxalate crystalline phases by infrared spectrophotometry. *Clinica Chimica Acta* 298 (1-2): 1-11.

- 17. SAYAN, P., TITIZ SARGUT, S., KIRAM, B. 2009.** Calcium oxalate crystallization in the presence of amino acids, proteins and carboxylic acids. *Crystal Research and Technology* 44 (8): 807-817.
- 18. DENG, S.P., ZHENG, H., OUYANG, J.M. 2006.** Crystallization rules of calcium oxalate crystals in lithogenic urine and in healthy urine in vitro. *Materials Science and Engineering C* 26 (4): 683-687.
- 19. THOMAS, A. 2009.** Biomimetic growth and morphology control of calcium oxalates. Tesis Doctoral. Facultad de Matemáticas y Ciencias Naturales de la Universidad Técnica de Dresden, Alemania. 17 p.
- 20. YUA, H., SHEIKHOLESLAMIA, R., DOHERTY, W. 2004.** The effects of silica and sugar on the crystallographic and morphological properties of calcium oxalate. *Journal of Crystal Growth* 265 (3-4): 592-603.
- 21. SCURR, D.S., ROBERTSON, W.G. 1986.** Modifiers of calcium oxalate crystallization found in urine. Studies on their mode of action in an artificial urine. *The Journal of Urology* 136 (1): 128-131.
- 22. BOEVÉ, E.R., CAO, L.C., VERKOELEN, C.F., ROMIJN, J.C., DE BRUIJIN, W.C., SCHROEDER, F.H. 1994.** Glycosaminoglycans and other sulphated polysaccharides in calculogenesis on urinary stones. *World Journal of Urology* 12 (1): 43-48.
- 23. AKIN, B., ÖNER, M., BAYRAM, Y., DEMADIS, K.D. 2008.** Effects of carboxylate-modified, "Green" inulin biopolymers on the crystal growth of calcium oxalate. *Crystal Growth and Design* 8 (6): 1997-2005.