



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**RETROSÍNTESIS BIOMIMÉTICA EN
GASTROLITOS DE LANGOSTA TENAZA
ROJA (*Cherax quadricarinatus*) MEDIANTE
TÉCNICA DE MINERALIZACIÓN USANDO
POLÍMEROS SINTÉTICOS**

Gonzalo Andrés Poblete Hevia

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

PROFESOR GUÍA: Andrónico Neira-Carrillo

SANTIAGO, CHILE
2009



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

RETROSÍNTESIS BIOMIMÉTICA EN GASTROLITOS DE LANGOSTA TENAZA ROJA (*Cherax quadricarinatus*) MEDIANTE TÉCNICA DE MINERALIZACIÓN USANDO POLÍMEROS SINTÉTICOS

Gonzalo Andrés Poblete Hevia

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA : ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO
PROFESOR CONSEJERO : MA. SOLEDAD FERNANDEZ
PROFESOR CONSEJERO : JOSE PIZARRO LUCERO

SANTIAGO, CHILE
2009

DEDICATORIA

A mis padres...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis profesores Andrónico Neira-Carrillo y Soledad Fernández por su tiempo y darme la posibilidad de avanzar un paso más en mi desarrollo personal.

Agradezco a mis incondicionales amigos Cota, Marlies y Nori, que estuvieron siempre que fue necesario en este duro camino que es titularse.

También agradezco a Cynthia y Evelyn por tenderme una mano cada vez que necesite ayuda durante mi tesis y siempre con una sonrisa.

Finalmente agradezco a mis padres que siempre me han impulsado a más y me han dado todas las herramientas y el cariño necesarios para lograrlo.

A todas esas personas que de una u otra forma aportaron en esta tesis y que a la vez me hicieron la persona que soy...

Muchas gracias!

ÍNDICE

I	AGRADECIMIENTOS	1
II	ÍNDICE	2
III	RESUMEN	6
IV	SUMMARY	9
V	INTRODUCCIÓN	12
VI	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	15
	1. Ácido fítico (AF)	18
	2. Ácido poliáspartico (APS)	19
	3. Ácido poliacrílico (APA)	20
	4. Técnicas de caracterización Morfológica y Físico-química	21
	4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	21
	4.2 Difracción de rayos X (XRD)	21
VII	OBJETIVOS	22
	1. General	22
	2. Específicos	22
VIII	MATERIALES Y MÉTODOS	23
	1. Desmineralización	24
	2. Diálisis	24

3. Liofilización	25
4. Aislamiento de Proteoglicanos	25
4.1. Guanidina 4 Molar	25
4.2. Columnas G-50 y DEAE	26
5. Técnica de retrosíntesis biomimética	28
5.1. Fracciones y aditivos para ensayos de Cristalización	28
5.1.1. Gastrogel	28
5.1.2. Esponja	28
5.1.3. Fracción soluble enriquecida en PGs (PG-FS)	28
5.1.4. Fracción insoluble enriquecida en PGs (PG-FI)	29
5.1.5. Ácido poliacrílico (APA)	29
5.1.6. Ácido poliaspártico (APS)	29
5.1.7. Ácido fítico (AF)	29
5.2. Sistema de Difusión de Gases	30
6. Caracterización Morfológica y Físico-química	32
6.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	32
6.2. Caracterización Inorgánica mediante Difracción de rayos X (XRD)	33
IX RESULTADOS	36
1. Controles	37
1.1 Esponja y gastrogel	37
1.2 Muestra control Ensayo N° 1	38
2. Muestras con fracciones únicas	40
2.1 Muestra Ensayo N° 2	40
2.2 Muestra Ensayo N° 3	42
2.3 Muestra Ensayo N° 4	44

2.4	Muestra Ensayo N° 5	46
2.5	Muestra Ensayo N° 6	48
2.6	Muestra Ensayo N° 7	50
3.	Muestras con sustrato esponja y un aditivo	52
3.1	Muestra Ensayo N° 8	52
3.2	Muestra Ensayo N° 9	54
3.3	Muestra Ensayo N° 10	56
3.4	Muestra Ensayo N° 11	58
3.5	Muestra Ensayo N° 12	61
4.	Muestra con sustrato esponja, fracción PG-FS y un polímero	63
4.1	Muestra Ensayo N° 13	63
4.2	Muestra Ensayo N° 14	66
4.3	Muestra Ensayo N° 15	69
5.	Muestra con sustrato esponja, fracción PG-FI y un polímero	71
5.1	Muestra Ensayo N° 16	71
5.2	Muestra Ensayo N° 17	74
5.3	Muestra Ensayo N° 18	76
6.	Muestra con sustrato gastrogel y un polímero	79
6.1	Muestra Ensayo N° 19	79
6.2	Muestra Ensayo N° 20	82
6.3	Muestra Ensayo N° 21	84
X	DISCUSIÓN	86
XI	CONCLUSIONES	97
XII	BIBLIOGRAFÍA	99
XIII	APÉNDICES	107

1. Índice de Abreviaciones	107
2. Índice de Tablas	108
3. Índice de Figuras	108

RESUMEN

La biomimética o mimetismo de lo biológico es una disciplina muy antigua que trata de imitar algo preexistente en la naturaleza, por lo tanto tiene como fuente de inspiración alguna característica o habilidad biológica de los organismos para generar materiales útiles para el ser humano. Debido a la necesidad del ser humano por alcanzar nuevos logros y seguir superando sus limitaciones son que la biomimética ha alcanzado la importancia tecnológica que tiene actualmente. Por tal razón numerosas investigaciones se han realizado con el objeto de dilucidar los diferentes mecanismos moleculares que permitan conocer como se forman estos biomateriales de origen biológico y obtener materiales más complejos con características superiores a las ya existentes. Dado al menor conocimiento que se tiene sobre los materiales amorfos, en la presente memoria de título se estudió un tipo de reserva inorgánico de tipo amorfo del carbonato de calcio (CaCO_3) del crustáceo *Cherax quadricarinatus* llamado gastrolito. *Cherax quadricarinatus* es un crustáceo que vive en zonas de agua dulce y que presenta un exoesqueleto que muda constantemente. Los gastrolitos son concreciones altamente calcificadas, encontradas en la zona cardiaca del estómago de algunos Decápodos, que actúan como reservorios temporales formados por CaCO_3 de tipo amorfo (CCA), material inorgánico crucial para el proceso de muda de su exoesqueleto y un excelente modelo de mineralización de CCA.

En estudios de biomineralización se han usado variados tipos de aditivos para evaluar la participación de éstos en ensayos de cristalización *in vitro* de CaCO_3 . En esta memoria de título se utilizaron diferentes polímeros ácidos comerciales tales como: ácido fítico (AF), ácido poliaspártico (APS) y ácido poliacrílico (APA) en conjunto con sustratos (esponja y gastrogel) y proteoglicanos (PG_S) de fracciones solubles (PG-FS) e insoluble (PG-FI) obtenidos a partir del gastrolitos como aditivos en la cristalización del CaCO_3 . Los ácidos AF, APS y APA son polímeros comerciales usados por el ser humano en diferentes procesos industriales y que han mostrado tener efectos modificadores sobre la cristalización del CaCO_3 .

El proceso *in vitro* de cristalización del CaCO_3 fue el método de difusión de gases y las técnicas de caracterización de los cristales obtenidos fueron la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la difracción de rayos X (XRD), con los cuales se pudo observar la morfología y determinar la estructura cristalina del CaCO_3 obtenidos en las diferentes combinaciones ensayadas de polímeros, sustratos (esponja y gastrogel) y proteoglicanos de ambas fracciones (PG-FS; PG-FI) durante la cristalización de CaCO_3 .

Encontramos que los sustratos esponja y gastrogel al ser usados como aditivos únicos en los ensayos de mineralización de CaCO_3 mostraron una clara tendencia a la formación de estructuras amorfas y un efecto modulador mecánico del depósito cristalino. Con PG-FS se obtuvieron cristales de CaCO_3 con morfología semejantes a los polimorfos de aragonita y calcita y estructuras cristalinas del tipo aragonita, calcita y vaterita, los cuales se determinaron mediante XRD. Sin embargo, con PG-FI se obtuvieron cristales con morfología similar a los polimorfos de aragonita y vaterita y se determinaron estructuras cristalinas del tipo aragonita, calcita y vaterita mediante XRD.

Por otro lado, el uso de APA como único aditivo indujo la formación de estructuras cristalinas con morfologías esféricas observadas con SEM y estructuras cristalinas del tipo aragonita y calcita determinadas por XRD. Cuando el APS fue usado se observaron cristales con morfologías espiculadas y estructuras cristalinas del tipo aragonita, calcita y vaterita mediante XRD. Sin embargo, con AF como aditivo se observaron cristales con morfologías irregulares y se determinaron los polimorfos aragonita, calcita y vaterita mediante XRD. Por último, cuando AF se utilizó en presencia de otros aditivos o sustratos se obtuvieron cristales con morfología espiculadas, esféricas, romboédricas, etc.

La determinación morfológica de los cristales de CaCO_3 *in vitro* obtenidos mediante el proceso de difusión de gases fueron observados claramente mediante SEM y la determinación cristalina de sus polimorfos mediante XRD confirmando la importancia del efecto nucleador de los diferentes polímeros en combinación con sustratos de origen biológico, cremos, sin embargo, que el uso de nuevas técnicas de caracterización como AFM, XPS y microscopía electrónica de transmisión (TEM) potenciarían enormemente

la presente memoria de título contribuyendo a un mejor entendimiento de los procesos moleculares involucrados en los ensayos de cristalización biológica de minerales inorgánicos como el CaCO_3 .

Finalmente concluimos que es importante seguir ahondando en el conocimiento de la formación cristalina de materiales inorgánicos con el objeto de desarrollar nuevos materiales útiles para el ser humano y la creación de nuevas tecnologías de materiales, los cuales podrían llevar al hombre a nuevas fronteras aún no conocidas.

SUMMARY

The biomimetic or biologic mimicry is a very old discipline that tries to imitate something preexisting in nature, so it has as a source of inspiration some characteristic or biological ability of the organisms to generate useful materials for the human being. Due to the necessity of the human being to reach new achievements and exceed his limitations is that biomimetic has reached the technological importance it has nowadays. Therefore many investigations have been fulfilled with the objective of elucidate the different molecular mechanisms which allow to know how the formation of these biological biomaterials is and how to obtain more complex materials with superior characteristics than the ones already existing. Due to the little knowledge that we have about amorphous materials, the subject of study in this memory was a kind of inorganic amorphous calcium carbonate supply (CaCO_3) of the crustacean *Cherax quadricarinatus* called gastrolyth. *Cherax quadricarinatus* is a crustacean that lives in fresh water areas and that present a constantly molting exoskeleton. The gastrolyth is a highly calcified concretion, found in the cardiac area of the stomach of some Decapods, which works like temporary reservoir formed by amorphous calcium carbonate (CCA), which is an inorganic material crucial for the exoskeleton molting process and an excellent model of CCA mineralization.

In biomineralization researches there had been used many kinds of additives to assess the participation of them in CaCO_3 *in vitro* crystallization assays. In this memory there were used as additives in the CaCO_3 crystallization essays different commercial acids polymers (phytic acid (AF), polyaspartic acid (APS) and polyacrylic acid (APA)) together with substrates (sponge and gastrogel) and proteoglycans (PGS) of soluble fractions (PG-FS) and insoluble (PG-FI) obtained of gastrolyth. The AF, APS and APA are commercial polymers which human being use in many industrial processes and they have showed modifying effects over CaCO_3 crystallization.

The *in vitro* CaCO_3 crystallization process was the gas diffusion method of and the characterization techniques of obtained crystals were the scanning electronic

microscopy (SEM) and the X-ray diffraction (XRD), with these techniques we observed the morphology and determined the CaCO₃ crystalline structure of the different essay combinations of polymers, substrates (sponge and gastrogel) and proteoglycans of both fractions (PG-FS; PG-FI) during the CaCO₃ crystallization.

It was found that when the substrates (sponge and gastrogel) were used as unique additives in the CaCO₃ mineralization essays, they showed a tendency to the formation of amorphous structures and a mechanic modulatory effect of the crystal deposit. With PG-FS it was obtained CaCO₃ crystals morphology like the morphology of polymorphs of aragonite and calcite, and crystal structures of the kind aragonite, calcite and vaterite which were determined through XRD.

However, with PG-FI it was obtained a crystal morphology like the polymorphs aragonite and vaterite and crystal structures of the kind aragonite, calcite and vaterite which were determined through XRD.

By the way, the use of APA like a unique additive led to the formation of crystal structures morphology like spheres observed with SEM and crystal structures of the aragonite kind determined with XRD. When the APS was used as the unique additive we observed crystals with thorned morphology and crystal structures of the kind aragonite, calcite and vaterite determined with XRD. However, with AF as the only additive, an irregular crystal morphology was observed and the polymorphs of aragonite, calcite and vaterite were determined with XRD. Finally, when we used AF in the presence of other additives or substrates we obtained thorned, spherical and rhomboedrical crystal morphologies.

The morphological determination of the CaCO₃ *in vitro* crystals obtained with the gas diffusion method was observed well defined through SEM and the crystalline determination of the polymorphs was through XRD confirming the importance of the core generator effect of the different polymers in combination with biological substrates, it is believed, however, that the use of new characterization techniques like AFM, XPS and transmission electron microscopy (TEM) could boost enormously this

memory contributing to a better understanding of the molecular process involved in the biological crystallization essays of inorganic minerals like CaCO_3 .

To sum up, it is important to keep deepening in the knowledge of cristal formation of the inorganic materials with the objective of developing new materials useful for the human being and the creation of a new generation of materials, which could bring the humanity to new frontiers not known yet.

INTRODUCCIÓN

Durante la historia, la ciencia ha estado al servicio del hombre transformándose en una herramienta útil y sustentable capaz de estudiar los distintos materiales presentes en la naturaleza producidos por los organismos vivos. La biomineralización o cristalización biológica, representa la capacidad que tienen los organismos vivos de sintetizar materiales inorgánicos (Lowenstam y Weiner, 1989). Sistemas naturales biomineralizados producidos por los organismos son: las conchas de moluscos, los huesos, los dientes, la cáscara del huevo, los corales, etc. La capacidad de imitar y reproducir *in vitro* estos materiales conservando su funcionalidad y ponerlo al servicio del hombre ha sido constantemente abordada por la biomimética (Xu *et al.*, 2006).

En estudios previos, nuestro laboratorio ha utilizado la especie *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) (Langosta Tenaza Roja) como modelo de biomineralización y ha investigado la presencia y caracterización de algunas macromoléculas biológicas sulfatadas extraídas de esta especie, las cuales se encuentran involucradas en la mineralización inorgánica de concreciones temporales llamadas gastrolitos (Navarrete, 2004). *Cherax quadricarinatus* es un crustáceo que vive en zonas de agua dulce y que presenta una cutícula protectora (exoesqueleto), que muda constantemente lo que le permite crecer (Hecker *et al.*, 2003). La muda (conocida como *ecdisis*), es un proceso continuo y fisiológicamente muy activo, debido a las diferentes etapas de crecimiento del exoesqueleto, y a la vez variable dependiendo de las diferentes especies (Testenièrre *et al.*, 2002; Greenaway, 1985). Los conceptos y etapas fisiológicos claves que participan en la mineralización en crustáceos y en particular en la especie *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868) son: exoesqueleto, muda y formas de almacenamiento de calcio (Ca^{2+}). La formación del gastrolito en la especie *Cherax quadricarinatus* se inicia un poco antes de comenzar la muda, y constituyen estructuras de reserva altamente calcificada. Los gastrolitos son estructuras calcáreas que se forman en la pared del estómago por células epiteliales especializadas y que actúan como una fuente temporal de Ca^{2+} almacenado como carbonato de calcio (CaCO_3) principalmente

como carbonato de calcio amorfo (CCA). Por su parte, el CaCO_3 presenta tres polimorfos cristalinos: calcita, aragonita y vaterita, siendo la calcita el polimorfo termodinámicamente más estable, seguido de aragonita y finalmente vaterita, lo que no significa que no pueda ocurrir una co-precipitación de una mezcla de estos polimorfos o una precipitación selectiva en la cual predomina un polimorfo en particular (Tai y Chen, 1998). El CCA, en cambio, es altamente inestable y debido a su gran solubilidad tiende a transformarse y estabilizarse rápidamente como calcita (Koga, *et al.* 1998). Una vez terminada la descalcificación del antiguo exoesqueleto y el crecimiento del animal, el gastrolito se desprende de la pared del estómago y es disuelto por los ácidos de éste, transportándose el Ca^{2+} a través de la hemolinfa y utilizándose nuevamente en la remineralización del nuevo exoesqueleto del animal (Greenaway, 1985). Dado que el CaCO_3 presenta estructuras cristalinas (calcita, aragonita y vaterita) y estructuras amorfas (CCA) (Lee *et al.* 2005), el CaCO_3 se ha convertido en el mineral inorgánico más estudiado *in vitro* en diferentes laboratorios. El CCA representa la forma termodinámica más favorable para el inicio de la cristalización inorgánica en modelos de biomineralización y la estrategia más utilizada por los diferentes organismos vivos para crear materiales altamente complejos estructural y funcionalmente, dado a que el CCA presenta alta solubilidad, poca estabilidad y facilidad de ser moldeado, etc (Addadi *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2005). Por tal razón, el estudio de la remineralización de CCA en gastrolito de *Cherax quadricarinatus* se ha convertido en un nuevo y prometedor modelo de biomineralización.

Por otro lado, es importante destacar que el uso de biopolímeros (colágeno, celulosa, quitina, quitosano, proteínas, etc.) y polímeros sintéticos (derivados acrílicos, polietilenglicol, etc.) han sido intensamente utilizados como eficientes controladores de nucleación y crecimiento cristalino (templates) en diferentes experimentos de biomineralización con excelentes resultados. Al mismo tiempo es sabido que el mecanismo de biomineralización es altamente influenciado por diferentes funcionalidades químicas presente en biopolímeros tales como: ácido carboxílico, ácido sulfónico, amina, amida, etc. (Addadi *et al.*, 1987; Weissbuch *et al.*, 1991; Aizenberg,

2000; Grassmann y Löbmann, 2004; Neira-Carrillo *et al.*, 2005, 2009; Demadis y Neofotistou, 2007).

El uso de polímeros sintéticos funcionalizados en soluciones supersaturadas de sales de Ca^{2+} permite la concentración de iones divalentes controlando no sólo el proceso de nucleación, sino también el crecimiento cristalino y orientación cristalográfica (Ball *et al.*, 2006). Diferentes polímeros funcionalizados se han utilizado en diferentes formas como: esferas, películas, estructuras esponjosas, complejos ligando-receptor, copolímeros, polipéptidos sintéticos, etc. (Kato *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 1995, 1999; Cölfen H *et al.*, 2001, 2004; Neira-Carrillo *et al.*, 2005).

Estudios con diferentes polímeros han permitido controlar selectivamente la nucleación, crecimiento cristalino y morfología de los diferentes polimorfos del CaCO_3 . Dado el creciente interés en el conocimiento del comportamiento *in vitro* de los diferentes componentes extraídos de gastrolitos de la especie *Cherax quadricarinatus* y el rol creciente de los distintos polímeros funcionalizados, capaces de actuar como aditivos y/o sustratos (moldes) orgánicos en ensayos biomiméticos, es que en la presente memoria de título se estudió el efecto en conjunto de las diferentes fracciones (soluble e insoluble) extraídas de gastrolitos y polímeros sintéticos funcionalizados utilizando una técnica de retrosíntesis biomimética de CaCO_3 desde sus estadios precursores amorfos. Se evaluó el rol de tres polímeros sintéticos en los procesos de nucleación, crecimiento cristalino, control morfológico y el hábito cristalográfico del CaCO_3 como material inorgánico en los ensayos de retrosíntesis. La retrosíntesis del CaCO_3 se realizó mediante difusión de gases como técnica de mineralización *in vitro* usando fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) extraídos de gastrolitos, en presencia de polímeros sintéticos. Los polímeros sintéticos comerciales utilizados en esta memoria de título fueron los ácidos fítico (AF), acrílico (APA) y poliaspártico (APS).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La biomineralización o cristalización biológica es la capacidad de los organismos vivos de sintetizar minerales, concepto que puede ser entendido como un conjunto ordenado de eventos moleculares en los cuales macromoléculas y minerales secretados en solución, por células especializadas, precipitan y forman estructuras cristalinas en conjunto, según un ordenamiento definido. Los materiales inorgánicos resultantes así formados representan materiales híbridos compuestos por dos fases, una fase inorgánica que usualmente corresponde a sales de Ca^{2+} , y una fase orgánica compuesta por macromoléculas orgánicas como proteínas, polisacáridos, lípidos y mezclas de ellos. (Heuer *et al.*, 1992; Carreño, 2004).

La especie *Cherax quadricarinatus* (von Martens, en 1868) ha sido considerada como un prometedor modelo biológico de estudio en el campo de la biomineralización, fundamentalmente por cumplir ciertas características dadas por la presencia del exoesqueleto temporal, muda y almacenaje transitorio de fuentes de Ca^{2+} .

El exoesqueleto en crustáceos otorga al animal capacidades indispensables para su sobrevivencia como son:

- Capacidad de locomoción: otorgándole estructuras rígidas en su cuerpo permitiendo el movimiento de sus apéndices articulados.
- Consumo de alimento: mediante la presencia de pinzas y de estructuras bucales rígidas que permiten la prehensión y procesado del alimento.
- Protección: gracias a un exoesqueleto rígido que evita en cierto grado el ataque de los depredadores.

Los crustáceos durante su ciclo de vida experimentan un proceso denominado muda, el cual se caracteriza por el recambio del exoesqueleto antiguo por uno nuevo con un aumento de tamaño del cuerpo. Tradicionalmente la muda ha sido clasificada en tres etapas:

- Intermuda: Durante la intermuda el animal posee su exoesqueleto completamente formado, presentando una vida normal y un metabolismo de Ca^{2+} con poca actividad (Greenaway, 1985; Numonoi, 1939).
- Premuda: En esta etapa existe descalcificación del exoesqueleto con una gran pérdida de Ca^{2+} hacia el ambiente, con formación de reservas de CaCO_3 y con un aumento de Ca^{2+} en la hemolinfa. Al final del período de premuda el animal aumenta de tamaño mientras su exoesqueleto está descalcificado (Greenaway, 1985; Numonoi, 1939).
- Postmuda: En esta etapa se ocupan las reservas de Ca^{2+} las cuales aportan un pequeño porcentaje de lo que el animal necesita para la remineralización del exoesqueleto, aproximadamente entre el 10 y 15 %. La mayor cantidad de Ca^{2+} se obtiene desde el ambiente, ya sea desde el agua o desde el alimento remineralizando la cutícula del exoesqueleto y así recuperando todas las ventajas otorgadas por él (Greenaway, 1985; Numonoi, 1939).

Existen diferentes formas de almacenamiento de sales de Ca^{2+} en los crustáceos, dentro las cuales destacan los gastrolitos, la glándula del intestino medio, ciego, hemolinfa y las concreciones formadas en algunos isópodos.

En la especie *Cherax quadricarinatus* la forma de almacenamiento de Ca^{2+} está dada por la presencia de gastrolitos en su estómago. Los gastrolitos son concreciones altamente calcificadas, las cuales se encuentran en la zona cardiaca del estómago de algunos Decápodos (Greenaway, 1985). Los gastrolitos son reservorios temporales formados por CaCO_3 principalmente amorfo (CCA). EL CCA se elimina al momento de descalcificarse la cutícula del exoesqueleto en el período de premuda. El Ca^{2+} contenido en el gastrolito es responsable de la recalcificación de aproximadamente la décima parte del exoesqueleto por lo que siempre es necesario extraer Ca^{2+} ya sea del agua o del alimento (Simkiss y Wilbur, 1989, Greenaway, 1985). La importancia de la biomimética de materiales mineralizados en crustáceos y en la especie *Cherax quadricarinatus* en particular, se debe a su gran acumulación de Ca^{2+} en su exoesqueleto y su activo

metabolismo del Ca^{2+} . En este contexto, la biomimética pretende imitar *in vitro* los diferentes mecanismos moleculares utilizados por los organismos vivos en la producción de los materiales mineralizados de la naturaleza. De esta manera, la biomimética representa una herramienta de gran aproximación mecanística, de incalculable utilidad para comprender los mecanismos moleculares de producción de ciertos materiales de alta complejidad que están presentes en la naturaleza y nos ayudan a entender como plantas y/o animales producen biomateriales con función específica (Xu *et al.*, 2006).

Como función específica de biomateriales podemos citar la fabricación de “esferas de CaCO_3 con factores de crecimiento” utilizadas para estimular el crecimiento de células del estroma medular de huesos en humanos, de gran utilidad en personas con fracturas múltiples o pérdida masiva de estructuras óseas o en personas de edad avanzada con dificultad para la regeneración ósea (Green *et al.*, 2004). Otro ejemplo han sido la producción de “nanopartículas magnéticas diseñadas para diagnóstico médico y terapia” utilizadas como marcadores inteligentes en el diagnóstico de tumores malignos mejorando así el diagnóstico con resonancia magnética y/o funcionar en la terapia como transportadores de drogas y en la hipertermia magnética para estos tumores (Mornet *et al.*, 2004).

En la presente memoria de título estudiamos el efecto que ejercen algunos polímeros sobre la cristalización del CaCO_3 *in vitro* en conjunto con moléculas organizadoras de la cristalización presentes en fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) obtenidas desde gastrolitos de la especie *Cherax quadricarinatus* (Wegner, 2000).

Los polímeros son macromoléculas de gran tamaño y peso molecular variable, formados por unidades básicas llamadas monómeros, los cuales son iguales entre sí dentro de un polímero. Los polímeros se obtienen por diversos procesos de polimerización controlada, a partir de monómeros de bajo peso molecular. Un gran número de materiales están contruidos por polímeros y muchos de ellos son irremplazables en el actual mundo tecnológico. Sabemos que los polímeros sintéticos son utilizados en un amplio campo de aplicaciones ya sea industriales, farmacológicas, tecnológicas, biomédicas, etc. Los polímeros presentan un amplio rango de propiedades

debido a su habilidad de conjugarse con otras moléculas gracias a sus superficies reactivas y funcionalizables (Cölfen y Antonietti. 1998), permitiendo generar moléculas de alta complejidad, como por ejemplo materiales de altísima resistencia a la tensión, resistencia a la compresión y alta elasticidad al mismo tiempo (Guan *et al.*, 2004). Al mismo tiempo, los polímeros pueden generar acoplamientos moleculares de diferentes grupos químicos ampliando enormemente la posibilidad de generar nuevos materiales híbridos con diferentes formas y propiedades controladas (Wegner, 2000; Neira-Carrillo, 2008).

En la presente memoria de título usamos tres tipos de polímeros, los cuales son descritos a continuación:

1. Acido Fítico (AF)

El ácido fítico (AF) o ácido hexa-inositol fosfórico [$C_6H_6(OPO(OH)_2)_6$] es un ácido orgánico que contiene fósforo y está presente en los vegetales. El AF se caracteriza por poseer seis grupos ácidos del tipo ácido fosfórico. La siguiente figura muestra la estructura química del AF.

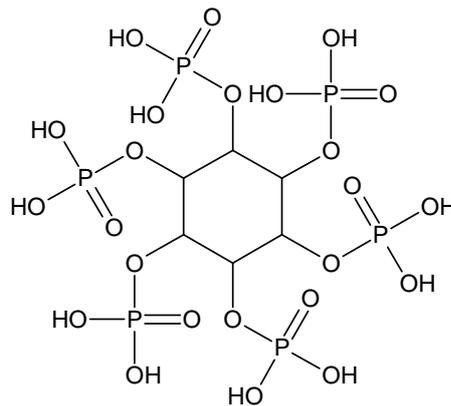


Figura 1. Estructura química del ácido fítico (AF).

El AF es la principal forma de almacenamiento de fósforo en diferentes tejidos vegetales, especialmente en la cáscara de las semillas como el trigo, algunos granos y

porotos. El fósforo está en forma biodisponible sólo para los animales rumiantes, los cuales presentan enzimas digestivas fitasas debido a la presencia de microorganismos en el rumen. Los estudios tradicionales con AF se han enfocado en su estructura que tiene la capacidad de unir minerales, proteínas y almidones, y la resultante disminución de la absorción de estos elementos en el tracto gastrointestinal. En el área de la biomineralización el AF ha sido utilizado como un agente precursor de mineralización desde estados amorfos de CaCO_3 (Xu *et al.*, 2006). Además, estudios recientes han demostrado propiedades favorables para la salud por el uso de AF, que se comporta como un agente: antioxidante, anticancerígeno, hipocolesterolémico e hipolipidémico.

2. Acido Poliaspártico (APS)

El ácido poliaspártico (APS) es un biopolímero que pertenece al grupo de los poliaminoácidos, el cual corresponde al polímero del aminoácido ácido aspártico. La siguiente figura muestra la estructura química resumida del polímero APS.

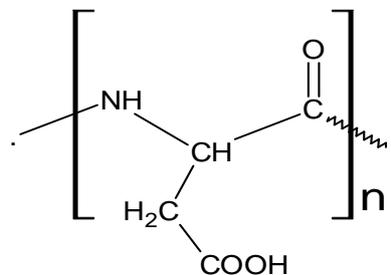


Figura 2. Estructura química del ácido poliaspártico (APS).

El APS pertenece a una nueva generación de polímeros biodegradables, que no genera toxicidad ni contaminación por ser soluble en agua y de fácil degradación. Estas características permiten que presente variadas aplicaciones como son: tratamiento de aguas servidas, agricultura, formulación de químicos usados en el hogar, fabricación de cosméticos, etc. En el área de la biomineralización el APS ha sido utilizado como un aditivo capaz de estabilizar selectivamente el polimorfo metaestable de aragonita, como

un agente capaz de mejorar las interacciones entre interfaces orgánicas e inorgánicas lo cual es ideal para la construcción de nanopartículas ensambladas con una arquitectura más compleja (Zhang *et al.*, 2006; Cölfen, 2008) y como agente activo en la velocidad de nucleación de cristales de CaCO₃ y fosfato de calcio (Ball *et al.*, 2006).

3. Acido Poliacrílico (APA)

El ácido poliacrílico (APA) es el polímero formado a partir del monómero ácido acrílico o ácido 2-propenoico. El ácido acrílico representa al monómero más simple con ácido carboxílico capaz de polimerizar. La siguiente figura muestra la estructura química resumida del polímero APA.

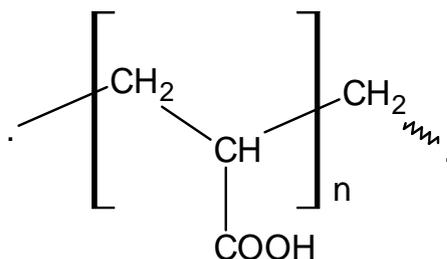


Figura 3. Estructura química del ácido poliacrílico (APA).

El monómero de ácido acrílico y sus ésteres fácilmente se combinan entre ellos o con otros tipos de monómeros como amidas, acrilonitrilos, vinilos, estirenos y butadienos, reaccionando por sus dobles enlaces formando homopolímeros o copolímeros los cuales son usados como: adhesivos, elastómeros, polímeros súper-absorbentes y fibras. El APA y sus derivados muestran un rango muy amplio de propiedades dependiendo del tipo de monómeros con el que se polimericen y las condiciones de la reacciones. En el área de la biomineralización derivados del APA han sido usado como un agente moderador de la cristalización de CaCO₃ (Payne *et al.*, 2007; Cölfen, 2008).

Por último, en esta memoria de título usaremos dos técnicas para la caracterización de los resultados obtenidos.

4. Técnicas de caracterización Morfológica y Físico-química

4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una técnica para la obtención de imágenes de superficies con alta resolución. El SEM utiliza un haz de electrones que barre la superficie de la muestra para la obtención de imágenes de igual forma que el microscopio óptico utiliza luz visible. Las ventajas del SEM frente a la microscopía óptica son, entre otras, una mayor capacidad de magnificación (hasta 100.000x) y mayor profundidad de campo. El microscopio electrónico de barrido puede estar equipado con diversos detectores, entre los que se pueden mencionar: un detector de electrones secundarios para obtener imágenes de alta resolución SEI (Secondary Electron Image), un detector de electrones retrodispersados que permite la obtención de imágenes de composición y topografía de la superficie BEI (Backscattered Electron Image), y un detector de energía dispersiva EDS (Energy Dispersive Spectrometer) permite coleccionar los Rayos X generados por la muestra y realizar diversos análisis e imágenes de distribución de elementos en superficies pulidas (Iowa State University, 2009).

4.2 Difracción de rayos X (XRD)

Es una técnica no destructiva que permite la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. De esta manera, es posible reconocer estructuralmente los distintos polimorfos obtenidos del CaCO_3 durante los ensayos de retrosíntesis biomimética. La técnica de XRD está basada en la interferencia óptica que se produce cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación X (University of Cambridge, 2007).

OBJETIVOS

1. General:

- Conocer el efecto de fracciones solubles e insolubles extraídas de gastrolito de langosta tenaza roja (*Cherax quadricarinatus*) sobre la cristalización del CaCO_3 en presencia de polímeros sintéticos en ensayos de retromineralización *in vitro*.

2. Específicos:

- Realizar ensayos de retromineralización usando distintas fracciones, soluble (FS) e insoluble (FI), extraídas de gastrolito en presencia y/o ausencia de polímeros mediante la técnica de difusión de gases como técnicas de cristalización *in vitro*.
- Conocer la morfología de los cristales de CaCO_3 obtenidos en los diferentes ensayos de cristalización mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).
- Determinar los distintos polimorfos de los cristales de CaCO_3 obtenidos en los diferentes ensayos de cristalización mediante difracción de rayos X (XRD).

MATERIALES Y METODOS

En la presente memoria de título se trabajó con gastrolitos extraídos de langosta tenaza roja (*Cherax quadricarinatus*) perteneciente al Proyecto FIA (C00-1-DA.113) de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. La figura 4 muestra el proceso de extracción y purificación de las distintas fracciones, soluble (FS) e insoluble (FI), obtenidas desde gastrolitos y de moléculas orgánicas de proteoglicanos (PGs) del gastrolito y describe los distintos procedimientos de las distintas etapas experimentales.

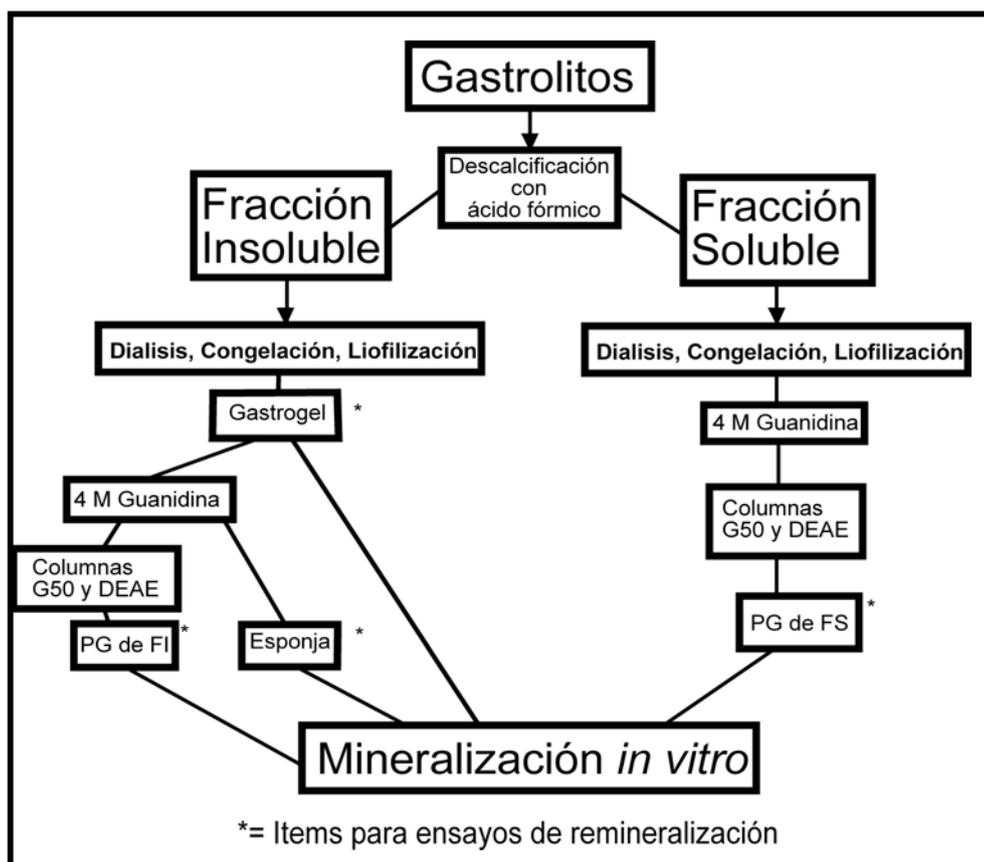


Figura 4: Procedimiento de extracción y purificación de FS y FI y de las moléculas orgánicas PGs extraídas desde gastrolitos.

1. Desmineralización.

Las dos fracciones (FS y FI) fueron obtenidas a partir de 10 gastrólitos de aproximadamente 1,5 cms de diámetro cada uno, y con un peso total de 29,99 gr, extraídos de langosta tenaza roja (*Cherax quadricarinatus*) mediante desmineralización usando una solución de ácido fórmico al 10% mantenidas a 4 °C por 7 días con reemplazo del sobrenadante día por medio, hasta descalcificar completamente los gastrolitos, es decir, hasta que los gastrolitos estuvieran totalmente transparentes y que la solución de ácido fórmico no produjera ninguna reacción visible al ser recién agregada.

Se utilizaron en total 400 ml de solución de ácido fórmico, retirando aproximadamente la misma cantidad de sobrenadante. De la desmineralización se obtuvieron las dos fracciones (FS y FI) que fueron usadas en los ensayos de cristalización de CaCO₃ en esta memoria de título. El sobrenadante recuperado corresponde a la FS y los gastrolitos descalcificados corresponden a la FI, a estos últimos los llamaremos gastrogel.

Los términos soluble e insoluble están referidos a la presencia de moléculas orgánicas de proteoglicanos presentes en el gastrolito y que pueden ser solubles o insolubles en ácido fórmico.

2. Diálisis.

La diálisis se realizó para retirar los residuos de ácido fórmico de las FS e FI en un volumen de 3 L contra agua deionizada con agitación constante a 4 °C. Se prepararon cinco bolsas de diálisis (Molecular Porous Membrane Tubing Spectro/Por (Spectrum)) de 25 cms de largo cada una, las cuales fueron cargadas por separado con el sobrenadante y los gastrolitos descalcificados recuperados de la desmineralización. El agua deionizada fue cambiada todos los días y registrado el pH al finalizar cada ciclo. El criterio de término de la diálisis fue que el pH del agua deionizada fuera igual al del

agua deionizada de lavado después de un ciclo de diálisis, lo cual corresponde a un día. El proceso de dializado duró aproximadamente 60 días.

3. Liofilización.

La liofilización se realizó para remover el agua deionizada presente en el sobrenadante y secar los gastrogel ya dializados, y proceder al aislamiento de los PGs. La liofilización de las FS y FI (dializadas y previamente congeladas) se realizó en un equipo marca CHRIST modelo ALPHA 1-4 a -56°C . Finalmente, se obtuvieron las dos fracciones secas, la FS semejante a un pellet de color café claro y la FI semejante a hojuelas semitransparentes y rugosas.

4. Aislamiento de proteoglicanos.

La obtención de la solución enriquecida en PGs desde las FS y FI del gastrolito se realizó usando un método descrito por Carrino, *et al* (2005). Este método consiste en colocar las diferentes fracciones extraídas desde gastrolitos en presencia de una solución Guanidina 4M y el uso de la técnica de cromatografía de intercambio iónico usando columnas de DEAE y Sephadex G-50 para la concentración de los PGs. El método se detalla a continuación:

4.1. Guanidina 4 Molar.

Inicialmente se preparan 2 soluciones de 10 ml de Guanidina 4M con agua deionizada, estas soluciones se prepararon para cada muestra por separado de la siguiente manera:

- **Solución de Guanidina 4M para fracción soluble:** 3,8208 gr de guanidina, 0,0408 gr de acetato de sodio, 783,9 mg de benzamidina, 131,5 mg de ácido 6-amino caproico y 38,3 mg ácido etileno diamino tetra acético (EDTA).

- **Solución Guanidina 4M para fracción insoluble:** 3,8209 gr de guanidina, 0,0413 gr de acetato de sodio, 783,2 mg de benzamidina, 131,1 mg de ácido 6-amino caproico y 38,6 mg de EDTA

A cada una de estas soluciones se agregó 0,0372 gr de la FS y 0,3026 gr de FI a las respectivas soluciones de Guanidina 4M. Luego se agregaron 100 µl de una solución de N-Etilmaleimida (NEM) y 100 µl de una solución de Fluoruro de metil fenil sulfónico (PMSF) a cada una de las soluciones de Guanidina 4M y se llevó a pH 5,8.

Estas soluciones fueron preparadas de la siguiente forma:

NEM 12,5 mg + 100 ml metanol

PMSF 1,7 mg + 100 ml metanol

Ambas soluciones fueron filtradas con Millipore, desgasificadas y guardadas durante un día a 4 °C con agitación constante.

4.2. Columnas G-50 y DEAE.

Para la preparación de ambas columnas se prepararon 3 soluciones Buffer por duplicado dado que el procedimiento es repetido dos veces ya que las FS y FI son tratadas por separado. Las composiciones de los Buffer se resumen a continuación:

Buffer 1:

48,00 gr de urea, 0,88 gr de NaCl, 8,41 gr de acetato de sodio, 0,5 gr de CHAPS (pH 7,0, Volumen 100 ml en agua deionizada, NaCl 0,15 M).

Buffer 2:

9,6 gr de urea, 0,29 gr de NaCl, 0,08 gr de acetato de sodio, 0,1 gr de CHAPS (pH 7,0, Volumen 20 ml en agua deionizada, NaCl 0,25 M).

Buffer 3:

9,6 gr de urea, 1,17 gr de NaCl, 0,08 gr de acetato de sodio, 0,1 gr de CHAPS (pH 7,0, Volumen 20 ml en agua deionizada, NaCl 1 M).

Procedimiento G-50.

Se tomaron 1,7 gr de Resina Sephadex G-50 y se agregó 30 ml de Buffer 1, esto se dispuso en una pipeta de 30 ml graduada. En la parte inferior de la pipeta se dispuso un trozo de algodón para retirar el Buffer pero no la resina y en el extremo de la pipeta se colocó una llave de 3 pasos. Se agregó 6 ml de solución de Guanidina 4M de la respectiva muestra de FS o FI (sobrenadante en fracción insoluble) por la parte superior de la pipeta, al mismo tiempo se fue retirando 6 ml de solución por el extremo distal de la pipeta en un tubo de ensayo plástico. Luego se agregó 1,5 ml de Buffer 1 por la parte superior de la pipeta y se recolectó 1,5 ml por el extremo distal de la pipeta. Por último, se agregaron 9 ml de Buffer 1 por la parte superior y se recolectaron 9 ml por el extremo distal de la pipeta. Estos últimos 9 ml son utilizados en la columna de DEAE

Procedimiento DEAE.

Se agregaron 4 ml de DEAE-Sephacel, se marcó el nivel de la resina y se lavó con 10 ml de Buffer 1 procurando no secar la resina. Luego fueron agregados los 9 ml de la muestra obtenida de las respectivas columnas de G-50 y descartaron los primeros 6 ml que salen por la parte inferior de la columna. Luego fueron agregados en el siguiente orden 10 ml de Buffer 2 y 10 ml de Buffer 3 procurando que la resina no se seque y retirando por el extremo distal de la columna fracciones constantes de 1,5 ml en 20 tubos. Este método describe que en una serie sucesiva de estos tubos se forma una nube blanquecina en las soluciones que indica la presencia de PGs. Estos tubos correspondieron a los números 13, 14, 15, 16 y 17 de la serie de 20.

Luego del aislamiento de los PGs se procedió a su concentración usando la liofilización, obteniéndose FS y FI enriquecido en PGs de los gastrolitos sin agua, las cuales fueron almacenadas a 4°C hasta su uso. Del procedimiento de extracción de los PGs desde la FI se obtuvo otra subfracción la cual llamaremos esponja, esta consiste en los gastrogel de gastrolitos (descalcificados, dializados y liofilizados) obtenidos desde

Guanidina 4M, por lo tanto no tienen PGs a diferencia de los gastrogel. Se obtuvieron 4 mg y 5 mg de FS y FI respectivamente.

5. Técnica de retrosíntesis biomimética

5.1. Fracciones y aditivos para ensayos de Cristalización

Los diferentes ensayos de cristalización de CaCO_3 se realizaron usando el método de difusión de gases (ver Figura 5; Domínguez *et al.*, 1999) y empleando las siguientes fracciones y aditivos:

5.1.1. Gastrogel:

Fracción obtenida de la descalcificación de gastrolitos usando ácido fórmico al 10% y posterior diálisis.

5.1.2. Esponja:

Fracción obtenida del lavado de los gastrogel con una solución de Guanidina 4M para retirar los PGs y posterior lavado con agua deionizada para retirar la Guanidina remanente.

5.1.3. Fracción soluble enriquecida en PGs (PG-FS):

Obtenidos a partir del sobrenadante de la desmineralización, con posterior diálisis, liofilización y concentración de PGs según el método de Carrino *et al.*, (2005) a partir de gastrolitos. Se utilizó una solución de PG-FS de concentración 64 $\mu\text{g/ml}$ a partir de una solución madre acuosa de concentración 1,6 mg/ml.

5.1.4. Fracción insoluble enriquecida con PGs (PG-FI):

Obtenidos a partir de la FI de la desmineralización, con posterior diálisis, liofilización y concentración de PGs según el método de Carrino *et al*, (2005) a partir de gastrolitos. Se utilizó una solución de PG-FI de concentración 64 µg/ml a partir de una solución madre acuosa de concentración 1,6 mg/ml.

5.1.5. Acido poliacrílico (APA):

Se utilizó una solución de APA obtenida desde Sigma Aldrich de concentración 64 µg/ml a partir de una solución madre acuosa de concentración 1,6 mg/ml

5.1.6. Acido poliaspártico (APS):

Se utilizó una solución de APS obtenida desde Sigma Aldrich de concentración 64 µg/ml a partir de una solución madre acuosa de concentración 1,6 mg/ml

5.1.7. Acido fítico (AF):

Se utilizó una solución de AF obtenida desde Sigma Aldrich de concentración 64 µg/ml a partir de una solución madre acuosa de concentración 1,6 mg/ml

La siguiente tabla muestra las distintas combinatorias de las fracciones FS y FI obtenidas de los gastrolitos y polímeros comerciales usados en los procesos de cristalización de CaCO₃ *in vitro*:

Ensayo Nº Aditivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Gastrogel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Esponja	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
PG-FS	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
PG-FI	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
APA	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
APS	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
AF	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+

Tabla 1: Combinatorias de fracciones y polímeros comerciales usados en los procesos de cristalización de CaCO_3 *in vitro*. Los signos + y - indican la presencia del aditivo y ausencia de éste en el ensayo de cristalización respectivo.

5.2. Sistema de Difusión de Gases

La figura 5 muestra la cámara experimental de la cristalización *in vitro* de CaCO_3 usado en el método de difusión de gases. Este método consta de una cámara fabricada a partir de una placa Petri con un orificio central en la base en donde se depositan 3 ml de una solución de bicarbonato de amonio ($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$) 25 mM. Dentro de esta cámara de cristalización se ubicaron los micropocillos de poliestireno (Hampton Rs., Laguna Niguel, CA) con las diferentes combinaciones de polímeros y las distintas fracciones obtenidas de los gastrolitos.

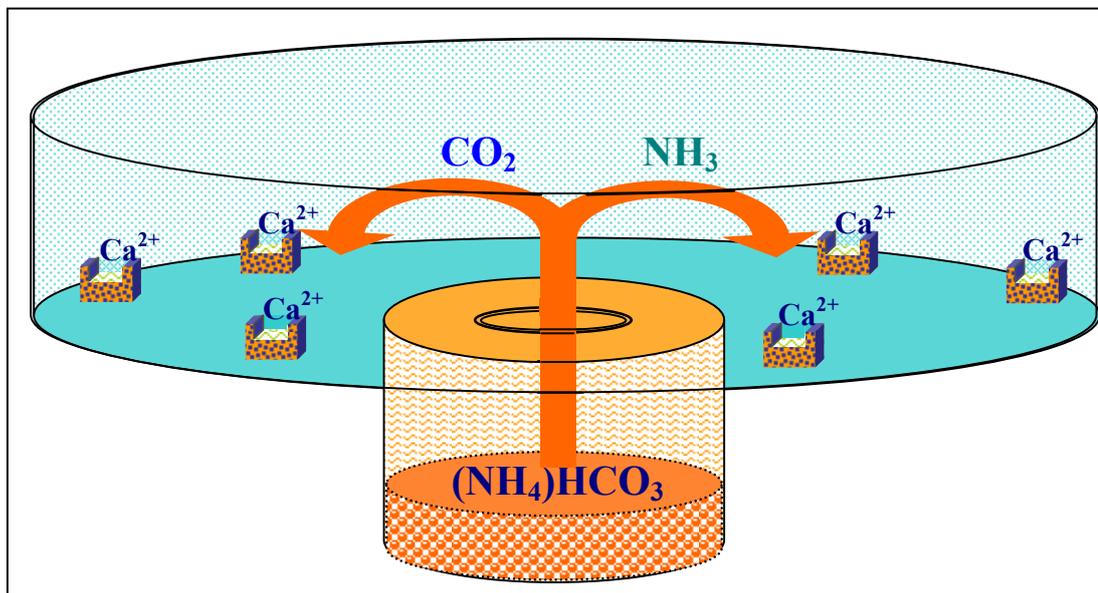
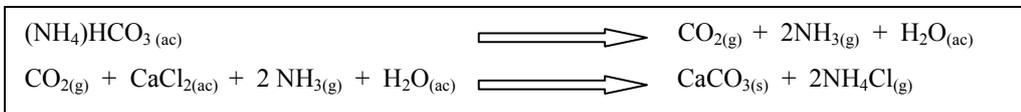


Figura 5: Cámara experimental para la cristalización *in vitro* de CaCO_3 mediante difusión de gases. La solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ genera espontáneamente una atmósfera saturada de gases de NH_3 y CO_2 , este último reacciona con Ca^{2+} presente en los micropocillos cristalizando CaCO_3 .

La fuente de Ca^{2+} es proporcionada por una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 200 mM tamponada con una solución de Tris-(hidroximetil)-aminometano la cual fue colocada en todos los micropocillos. Cada micropocillo fue llenado con un volumen de 35 μl de la solución de CaCl_2 200 mM en buffer Tris 200 mM.

Se prepararon distintas soluciones stock de los sólidos obtenidos por liofilización de las soluciones enriquecidas con PGs y de cada uno de los polímeros sintéticos con una concentración de 1,6 mg/ml respectivamente, y se agregaron 4 μl de estas soluciones a cada micropocillo dependiendo de la combinación de aditivos de cada ensayo. Además en algunos micropocillos se agregaron trozos de aproximadamente 3 mm cuadrados de los sustratos esponja o gastrogel del gastrolito.

La reacción de precipitación de los cristales de CaCO_3 ocurre por la difusión de gas de dióxido de carbono (CO_2) desde el recipiente inferior hacia la cámara superior, la cual reacciona con la solución de CaCl_2 , como se muestra en el siguiente esquema de reacciones:



La reacción de precipitación de CaCO_3 fue realizado a 20°C durante 24 horas.

6. Caracterización Morfológica y Físico-química.

6.1. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de los cristales de CaCO_3 obtenidos mediante las retrosíntesis biomimética con el método de difusión de gases fue estudiada en un microscopio electrónico de barrido TESLA BS 343A. Los cristales de CaCO_3 fueron secados a temperatura ambiente, montadas sobre soportes metálicos y recubiertos con una capa de oro de 12 nm usando un equipo marca Electron Microscopy Science (Sputter-EMS-550). La figura 6 ilustra la morfología de los distintos polimorfos del CaCO_3 obtenidos en ausencia de aditivos.

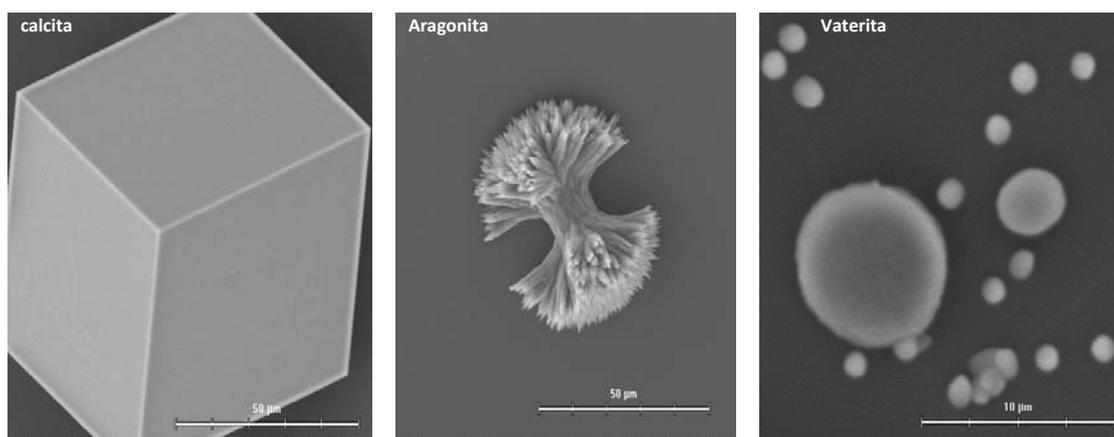


Figura 6. Imágenes SEM de los polimorfos de CaCO_3 (Neira-Carrillo, 2007).

La observación mediante SEM fue dirigido a dos sectores en las muestras:

- El primer sector fue el fondo de los micropocillos en los cuales se observaron cristales de CaCO_3 . Esto fue realizado en todas las muestras analizadas.
- El segundo sector, fueron los cristales depositados en los sustratos esponja o gastrogel y correspondían a las muestras N° 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21.

6.2. Caracterización inorgánica mediante Difracción de Rayos X (XRD).

Para la caracterización inorgánica de los cristales de CaCO_3 se utilizó la técnica de Difracción de Rayos X (XRD). Esta técnica permite la identificación cualitativa de la composición mineralógica de una muestra cristalina. De esta manera, es posible reconocer estructuralmente los distintos polimorfos obtenidos del CaCO_3 durante los ensayos de retrosíntesis biomimética. La técnica de XRD está basada en la interferencia óptica que se produce cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación. Los resultados son mostrados en difractogramas de coordenadas U.I vs. 2θ , los cuales fueron comparados con difractogramas estándares de cada polimorfo de los cristales de CaCO_3 usando la base de datos teóricos PCDWIN. Los difractogramas de XRD fueron obtenidos con un instrumento Siemens D-5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$ perteneciente a la Facultad de Física de la Universidad de Chile. Para los análisis de XRD se utilizaron como sustrato la esponja y el gastrogel en las muestras N° 2, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 y 21. Y para las muestras 1, 3, 4, 5, 6 y 7 que no tenían esponja ni gastrogel se utilizó un film transparente (alusaplast) en el fondo de los micropocillos sobre los cuales se depositaron los cristales de CaCO_3 . Luego de terminado el ensayo de cristalización el alusaplast fue analizado en el difractómetro de XRD. El film de alusaplast no influye sobre los datos entregados por la técnica XRD debido a que difracta a ángulos muy por debajo de los ángulos de los picos cristalinos de todos los polimorfos de CaCO_3 , permitiendo analizar pequeñas cantidades de material inorgánico.

La figura 7 muestra los distintos estándares de los polimorfos del cristal de CaCO_3

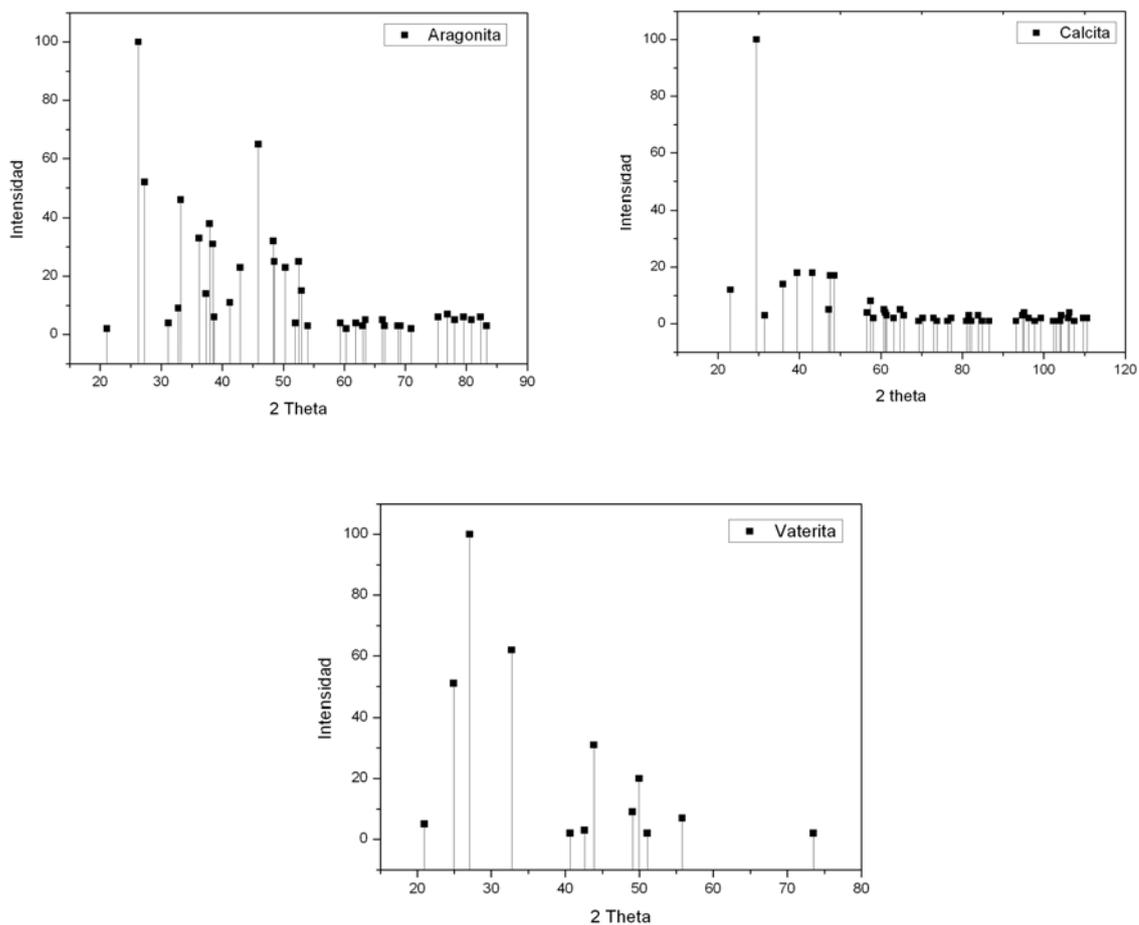


Figura 7. Difractograma de XRD de los tres polimorfos del cristal de CaCO₃.

De estos estándares sólo se utilizaron los datos de intensidades de los ángulos cuyas intensidades relativas son las 3 más altas en los respectivos difractogramas, dado que la presencia de uno sólo de estos ángulos en las respectivas muestras, confirma que al menos esa fase de ese polimorfo del CaCO₃ está presente. Esto fue realizado ya que los cristales obtenidos están orientados debido a que la técnica de retromineralización, el tipo de sustrato utilizado (esponja, gastrogel y papel film) y la escasa cantidad de producto final impiden colocar las muestras en el difractómetro de XRD de la forma

clásica. La forma clásica de posicionar muestras en el difractómetro de XRD es depositar homogéneamente una gran cantidad de material en polvo sobre el porta muestra dada las características de nuestras muestras y poca cantidad de cristales obtenidos, la cual estaba cristalizada sobre un sustrato que influye en la disposición de los cristales y que esta no era homogénea se analizaron los XRD como se describió.

Si las muestras hubieran sido más abundantes, lo óptimo habría sido buscar la presencia de los 3 datos de ángulos con intensidades relativamente más altas de los estándares dentro de las muestras analizadas y con esto se podría asegurar que ese polimorfo está presente en todos sus estadios de formación. Con estas restricciones se buscó sólo la presencia de los 3 ángulos con intensidades relativamente más altas pero con la salvedad de que sólo uno o más de uno de estos 3 picos cristalinos más altos estuviera presente en la muestra y asegurar la existencia de una fase de un cristal de un polimorfo específico.

Es importante destacar, que en una muestra se pueden encontrar simultáneamente más de un polimorfo del CaCO_3 y que el análisis de XRD debe ser hecho a la luz de lo observado en las fotos tomadas por SEM.

RESULTADOS

Los resultados del análisis morfológico y cristalográfico usando SEM y XRD respectivamente serán mostrados según las distintas combinatorias de fracciones solubles (FS) e insolubles (FI) y polímeros sintéticos usados en los procesos de cristalización de CaCO_3 *in vitro* (ver Tabla 1, pág 26).

Los gráficos de simulación de los cristales obtenidos mediante SEM fueron construidos con los índices de Miller respectivos para cada uno de los ángulos con las intensidades relativas más elevadas de los estándares obtenidos de los difractogramas de XRD usando el programa OriginPro 8 SR0 v 8,0724.

Los índices de Miller de un plano cristalino están definidos como los recíprocos de las intersecciones, que el plano determina con los ejes x, y, z de los tres lados no paralelos del cubo unitario. La notación (hkl) se usa para indicar índices de Miller en sentido general, donde h, k, y l son los índices de Miller para un plano de un cristal cúbico de ejes x,y,z respectivamente (Rodríguez, 2008). Estos índices de Miller son exclusivos para los distintos planos de los cristales de los estándares de los polimorfos del cristal de CaCO_3 y mediante el uso de softwares especiales (JCrystal 2005, Crystal Morphology Editor & Viewer 1.05) permiten construir o simular replicas morfológicas de los cristales de CaCO_3 obtenidas mediante el análisis de SEM.

1. Controles

1.1 Esponja y gastrogel

La figura 8 muestra la imagen SEM obtenida de los sustratos esponja y gastrogel utilizada en los ensayos de cristalización de CaCO_3 , en la cual se observa la morfología de estos sustratos mostrando ambos una superficie bastante heterogénea y rugosa.

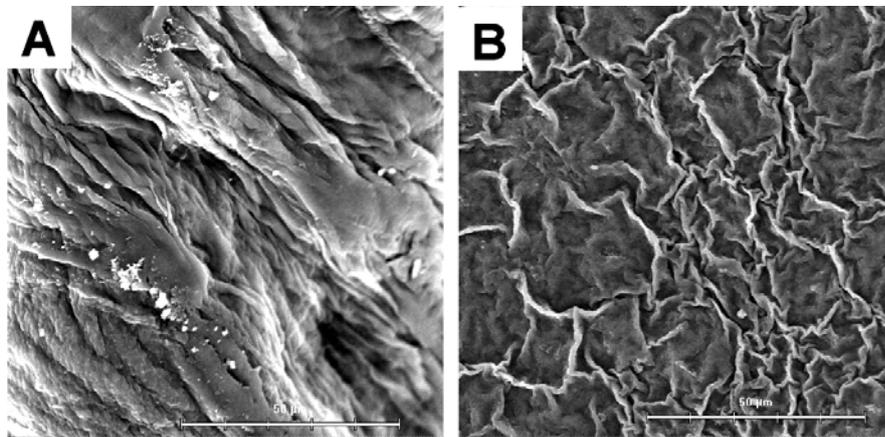


Figura 8. Imagen SEM de los sustratos esponja y gastrogel. Superficie de la esponja (A). Superficie del gastrogel (B).

1.2 Muestra control Ensayo N° 1

La figura 9 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo control N° 1, el cual realizado en ausencia de las fracciones PG-FS, PG-FI y de los polímeros comerciales, mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita y calcita.

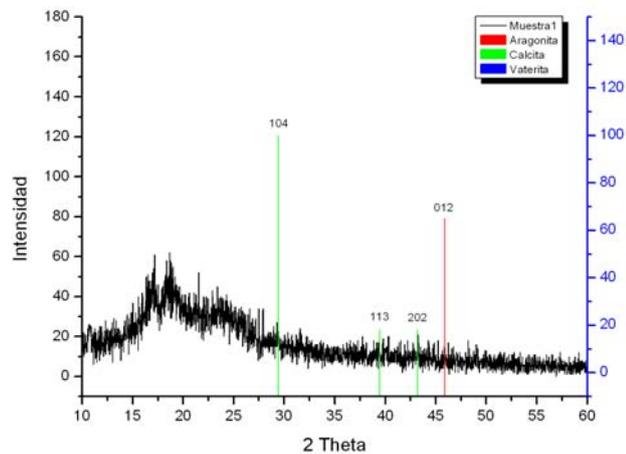


Figura 9. Difractograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 1.

La figura 10 muestra la imagen SEM obtenida de los cristales del fondo del micropocillo en el ensayo N° 1, el cual mostró la presencia de cristales romboédricos característicos para el polimorfo de calcita de tamaños entre 10-15 μm y pequeños cristales hexagonales de aproximadamente 5 μm de tamaño. Estas se correlacionan con las imágenes de SEM de los polimorfos del CaCO_3 (Fig. 6).

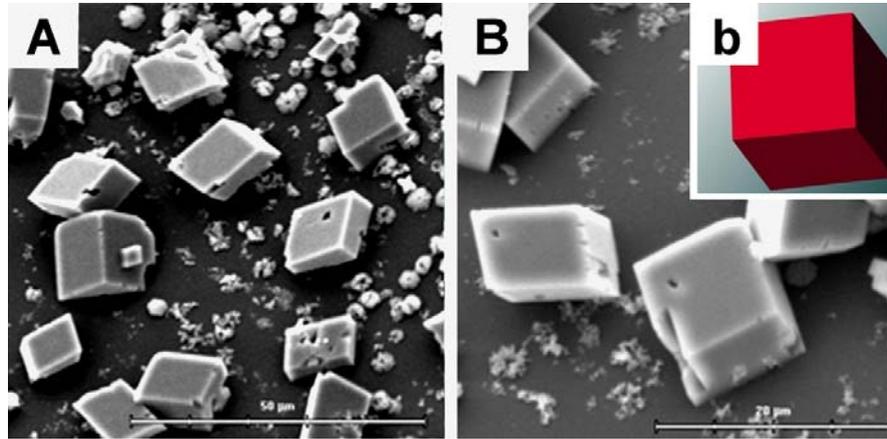


Figura 10. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 1. Cristales romboédricos y hexagonales (A). Cristales romboédricos obtenidos usando el ensayo N° 1 (B). Simulación del cristal de calcita observado en (B) obtenido usando el Software JCrystal, (2008) (b).

2. Muestras con fracciones únicas.

A continuación se presentan los resultados de los XRD y SEM de los ensayos de cristalización de CaCO_3 utilizando un componente constante, es decir esponja, PG-FS, PG-FI, APA, APS, AF), estos ensayos corresponden a los números N° 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

2.1 Muestra Ensayo N° 2

La figura 11 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 2, el cual sólo contiene el sustrato esponja como aditivo sólido mostrando la presencia de los polimorfos de calcita y vaterita.

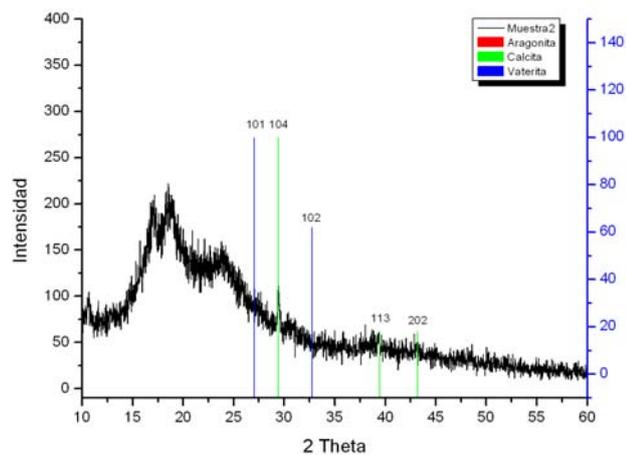


Figura 11. Difractograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 2.

La figura 12 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 2, el cual mostró la presencia de cristales con modificaciones en su estructura romboédrica que corresponden con calcita modificadas de tamaño mayores al control entre 20-40 μm (Fig. 12A) y esferas de tamaños diferentes entre 5-10 μm y de superficies irregulares similares a vaterita (Fig.12B). La figura 12 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de

CaCO₃ depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 2, el cual mostró la presencia de cristales de calcita con modificaciones en su estructura romboédrica (Fig. 12D) similares a los cristales observados en el fondo del micropocillo (Fig. 12A) que concuerdan con la morfología de calcita con tamaño mayores al control entre 20-40 μm y cristales esféricos de tamaños entre 5-10 μm (Fig. 12C) distribuidos sobre toda la esponja. La nucleación de cristales de CaCO₃ sobre este sustrato no modificó morfológicamente la superficie de la esponja.

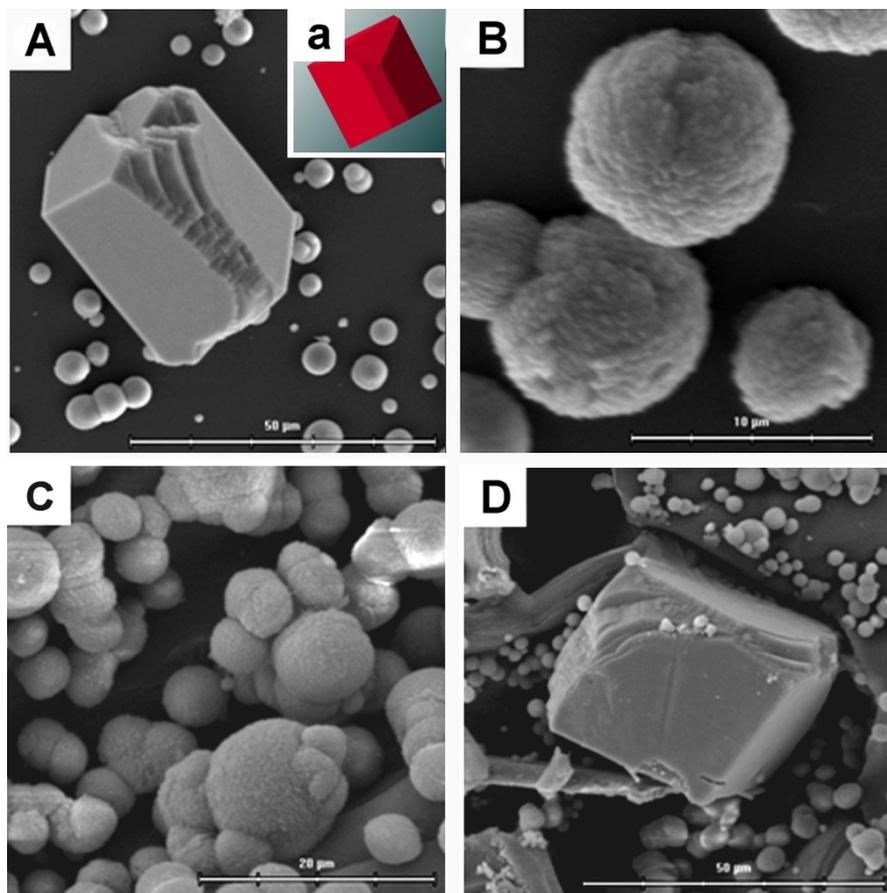


Figura 12. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A, a y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) usando el ensayo N° 2. Cristales romboédricos modificados y cristales esféricos de fondo de micropocillo (A). Simulación del cristal de calcita observado en (A) usando el Software JCrystal, (2008) (a). Cristales esféricos de fondo de micropocillo (B). Cristales esféricos sobre esponja (C) Cristales romboédricos sobre esponja (D).

2.2 Muestra Ensayo N° 3

La figura 13 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales del fondo del micropocillo del ensayo N° 3, el cual sólo contiene PG-FS como aditivo mostrando la presencia de picos cristalinos de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

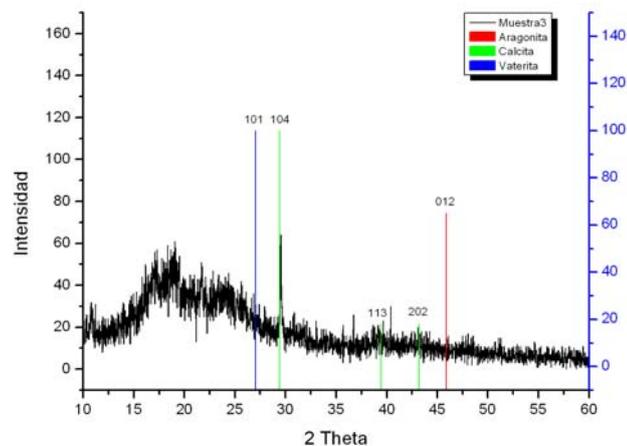


Figura 13. Difragtograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 3.

La figura 14 muestra la imagen SEM de los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo en el ensayo N° 3, en esta se observan estructuras cristalinas que corresponden a calcitas romboédricas características con tamaños entre 10-20 μm , cristales aplanados circulares de tamaños menores entre 5-7 μm , y formaciones policristalinas esféricas con morfologías más complejas de tamaños un poco mayores entre 15-20 μm formadas presumiblemente por múltiples cristales aplanados más pequeños. Las estructuras cristalinas observadas presentaron una distribución homogénea en todos los sectores del micropocillo.

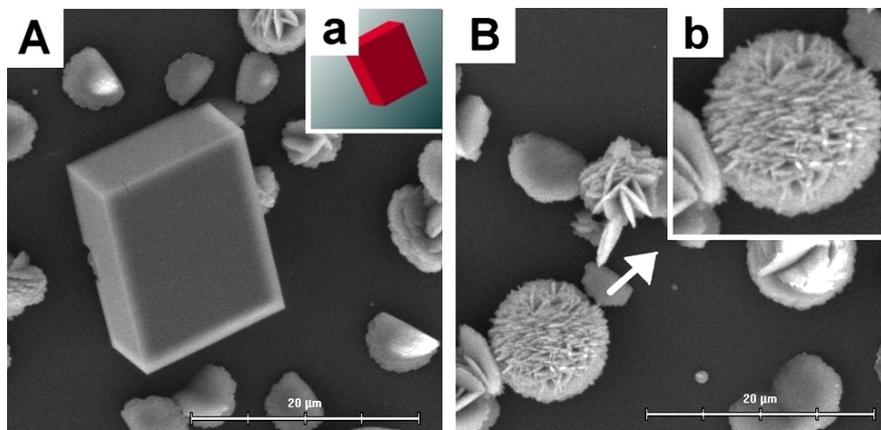


Figura 14. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 3. Cristales de calcita romboédricos y cristales aplanados (A). Simulación del cristal de calcita observado en (A) usando el Software JCrystal, (2008) (a). Estructura policristalina esférica y cristales aplanados (B). Estructura policristalina esférica con mayor magnificación (b).

2.3 Muestra Ensayo N° 4

La figura 15 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales del ensayo N° 4, el cual sólo contiene PG-FI como aditivo mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

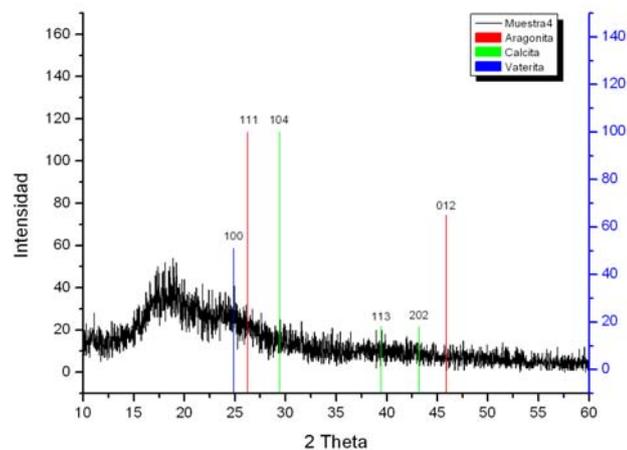


Figura 15. Difragtograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 4.

La figura 16 muestra la imagen SEM de CaCO_3 obtenida de los cristales depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 4, en ella se observan dos tipos de cristales distribuidos de manera homogénea por todo el fondo del micropocillo. El primer tipo son estructuras policristalinas (Fig. 16A) de tamaños entre 30-40 μm de forma esférica, superficie rugosa, astillada y al parecer formado por múltiples cristales aplanados. El segundo tipo corresponden a cristales de morfología esférica con una superficie lisa con pequeñas irregularidades (Fig. 16B) de tamaños un poco menor entre 15-20 μm , estas formas concuerdan con la forma clásica de vaterita.

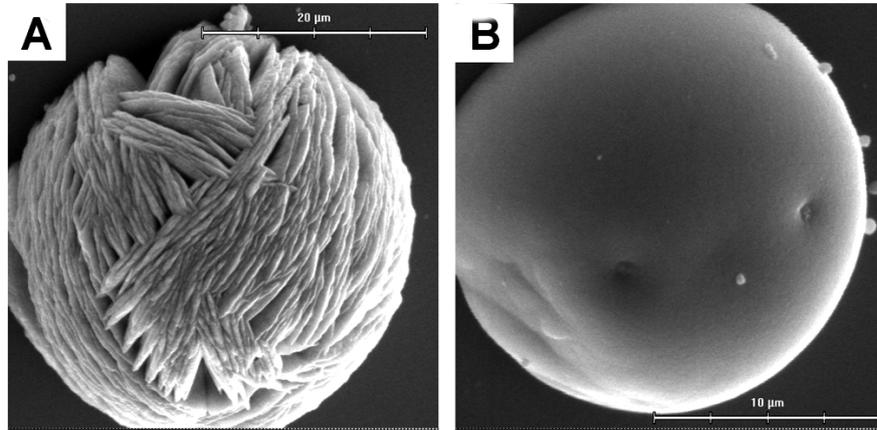


Figura 16. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO₃ obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 4. Cristal con forma esférica de superficie rugosa (A). Cristal con forma esférica de superficie lisa (B).

2.4 Muestra Ensayo N° 5

La figura 17 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales del ensayo N° 5, el cual sólo contiene APA como aditivo mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita y calcita.

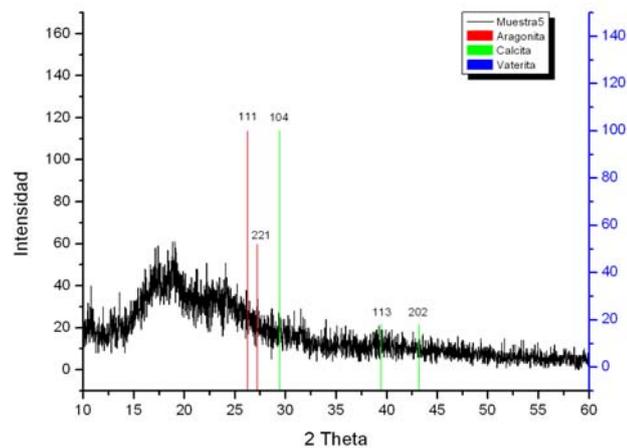


Figura 17. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 5.

La figura 18 muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 5, en ella se observan sólo cristales con formas esféricas de tamaños variables entre 2 - 20 μm . Están distribuidas homogéneamente por todo el fondo del micropocillo, solas o formando pequeños grupos.

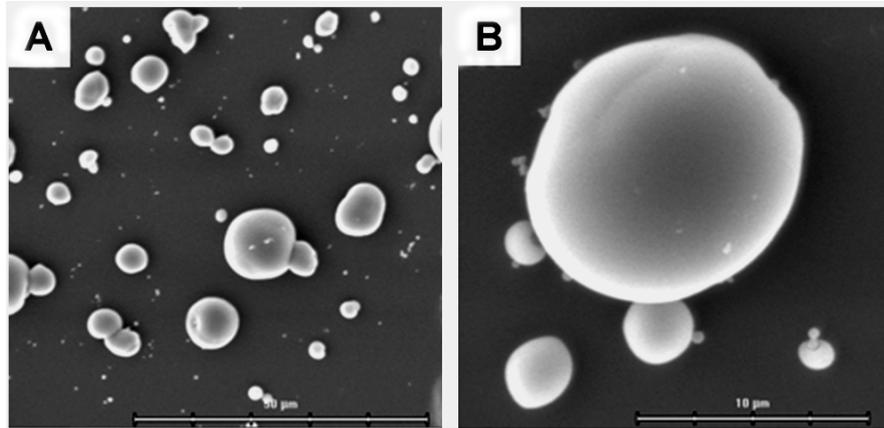


Figura 18. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 5. Formas esféricas de tamaños variables (A). Formas esféricas con mayor magnificación (B).

2.5 Muestra Ensayo N° 6

La figura 19 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 6, el cual sólo contiene APS como aditivo mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

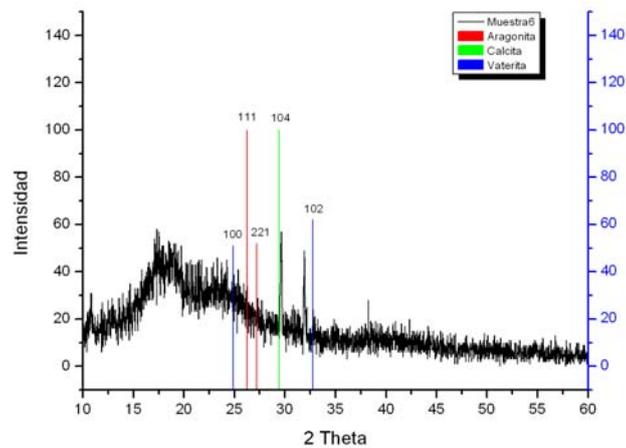


Figura 19. Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 6.

La figura 20 muestra la imagen SEM de los cristales depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 6, en ella se aprecian estructuras cristalinas complejas con superficie rugosa de formas irregulares y esferoidales y de tamaños que van entre los 5-50 μm . Similares formaciones cristalinas fueron encontradas sólo cuando los aditivos PG-FS y PG-FI fueron usados como aditivo, cristales aplanados podrían estar formando parte en estas formaciones.

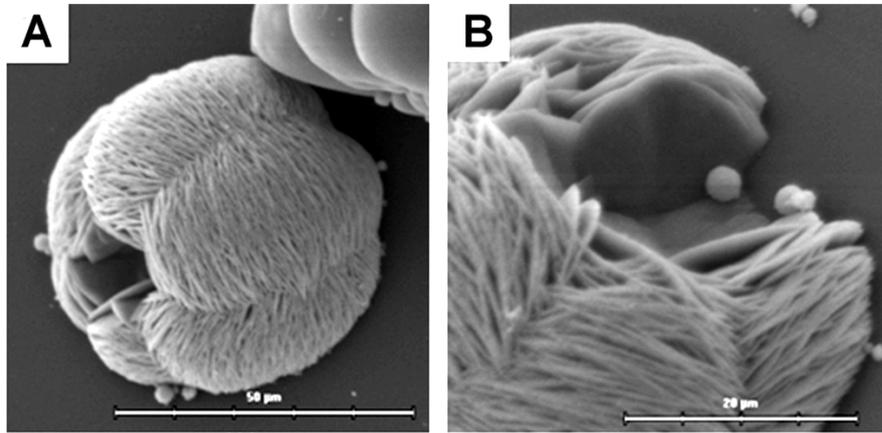


Figura 20. . Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 6. Cristal esférico rugoso (A). Cristal esférico rugoso con mayor magnificación (B).

2.6 Muestra Ensayo N° 7

La figura 21 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales del ensayo N° 7, el cual sólo contiene AF como aditivo mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

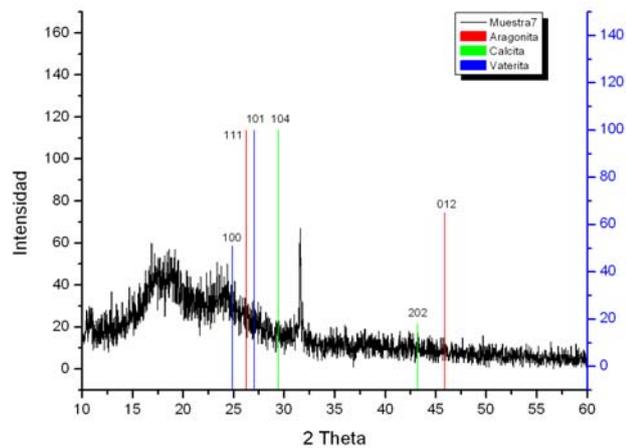


Figura 21. Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 7.

La figura 22 muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 7, en este ensayo se aprecia un sólo tipo de cristal con una morfología bastante irregular de superficies rugosas, los cuales están distribuidos por todo el fondo del micropocillo de manera homogénea. A pesar de no poseer una forma definida reconocible si es posible distinguir faces cristalinas 104 de calcita (Fig. 22B). Sus tamaños van desde los 40 μm hasta los 100 μm aproximadamente.

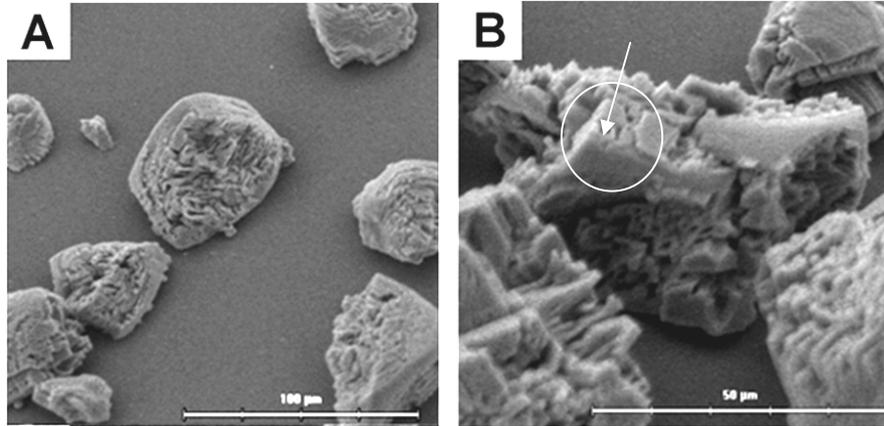


Figura 22. . Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 7. Cristales de superficies rugosas (A). Cristales de superficies rugosas con mayor magnificación (B).

3. Muestras con sustrato esponja y un aditivo.

A continuación se presentan los resultados de los XRD y SEM de los ensayos de cristalización de CaCO_3 utilizando un componente constante, es decir, el sustrato esponja al cual se les agregó un segundo componente (PG-FS, PG-FI, APA, APS, AF). Estos ensayos corresponden a los números N° 8, 9, 10, 11 y 12.

3.1 Muestra Ensayo N° 8

La figura 23 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 8, el cual contiene el sustrato esponja y PG-FS mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

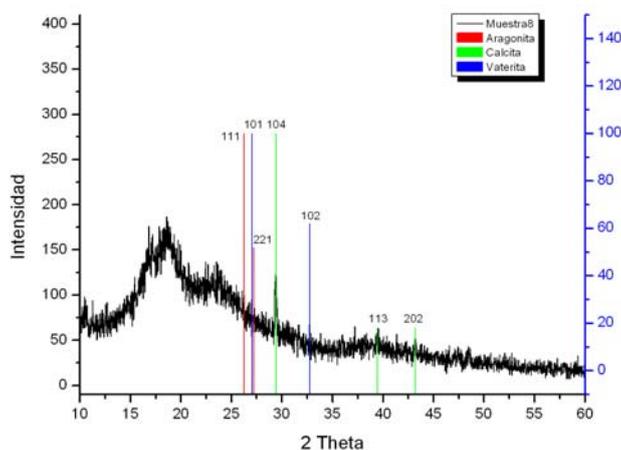


Figura 23: Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 8.

La figura 24 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 8, en esta muestra se observa la presencia de cristales de calcita dramáticamente modificados de tamaño mayores a los encontrados en ausencia de aditivos y a los encontrados con un sólo componente. Los

crisales presentaron una morfología alargada con un extremo romboédrico de calcita con una face 104 y un tamaño de aproximadamente 50 μm (Fig. 24A). La figura 24 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 8, en esta muestra se observan cristales sobre toda la superficie de este sustrato, los cuales presentaron una morfología irregular y tamaños variables que van desde unos pocos μm hasta los 50 μm . Los más regulares poseen caras lisas en sus extremos romboédricos con una face 104, siendo rugosos en la parte central del cristal. En algunos se pueden apreciar pequeños cristales esféricos de aproximadamente 2.5 μm .

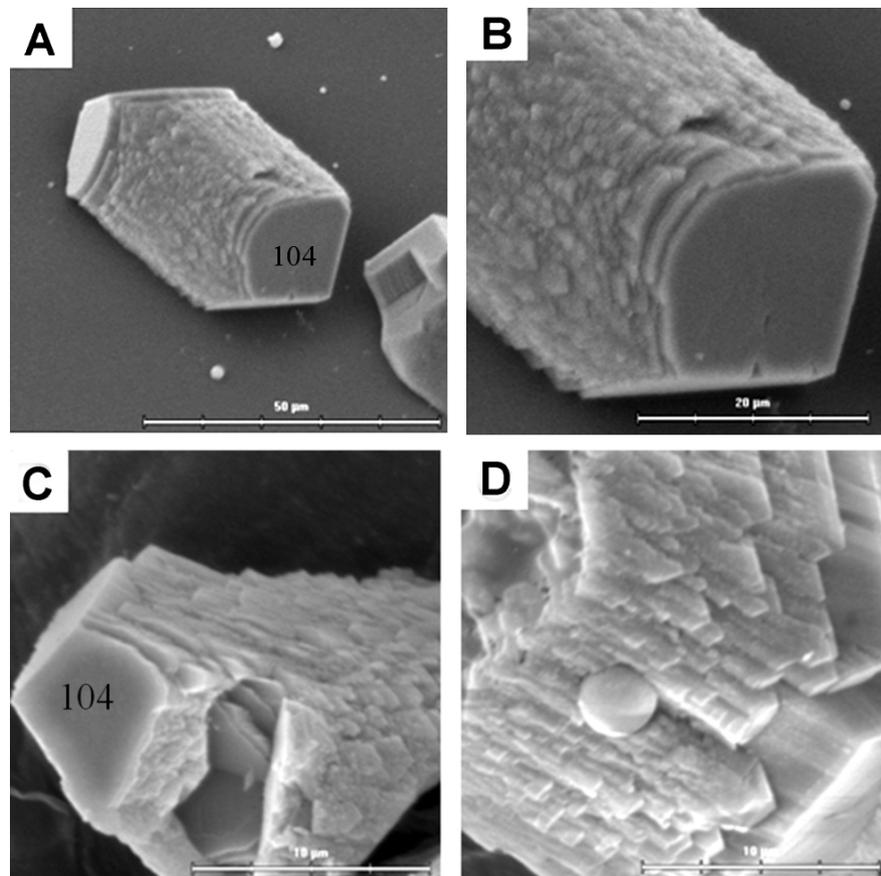


Figura 24. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 8. Cristales romboédricos alargados de fondo de micropocillo (A). Cristales romboédricos alargados con mayor magnificación (B). Cristales romboédricos alargados sobre esponja (C). Zona del cristal romboédrico alargado con mayor magnificación y cristal esférico (D).

3.2 Muestra Ensayo N° 9

La figura 25 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 9, el cual contiene el sustrato esponja y PG-FI mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

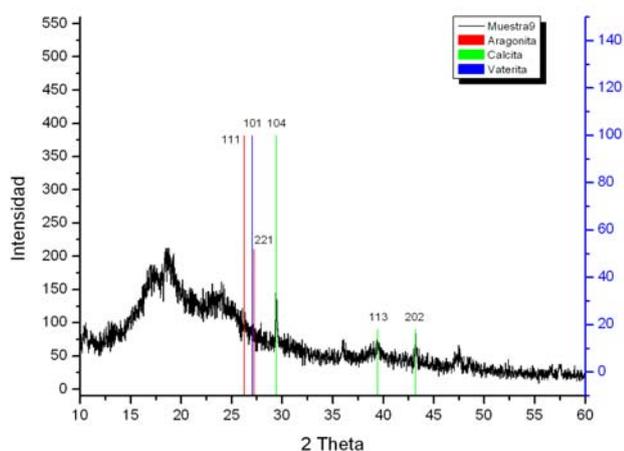


Figura 25. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 9.

La figura 26 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 9, en esta muestra se pueden apreciar dos tipos de estructuras cristalinas distribuidas de manera homogénea en todo el micropocillo. Las primeras formas cristalinas corresponden a cristales romboédricos irregulares con caras de superficies lisas de tamaño de $50 \mu\text{m}$ aproximadamente. El segundo tipo de formas observadas corresponden a un gran número de agregados cristalinos esféricos y de superficies relativamente lisas, muy similares a la forma de la vaterita de aproximadamente $20 \mu\text{m}$. La figura 26 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 9, se encuentran agregados cristalinos esféricos en un número mayor que en el micropocillo y de tamaños variables que van entre los $2\text{-}5 \mu\text{m}$.

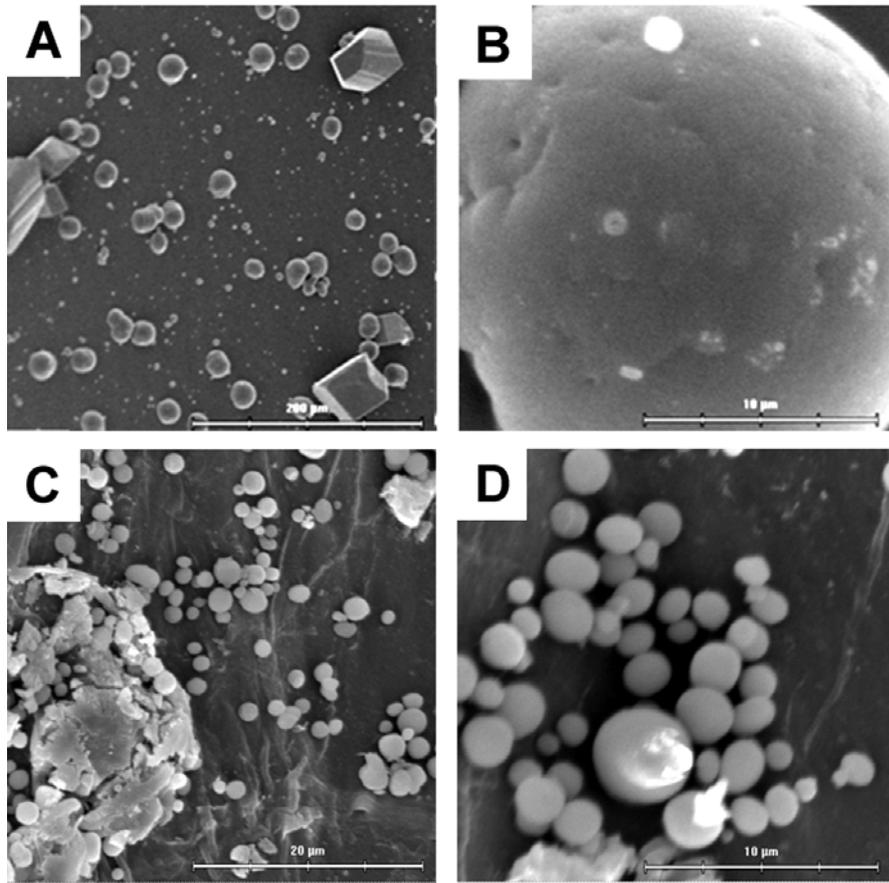


Figura 26. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja en el ensayo N° 9. Cristales romboédricos irregulares y esféricos sobre fondo de micropocillo (A). Cristales esféricos con mayor magnificación (B). Formas esféricas sobre superficie esponja (C). Formas esféricas con mayor magnificación (D).

3.3 Muestra Ensayo N° 10

La figura 27 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 10, el cual contiene el sustrato esponja y el polímero APA mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

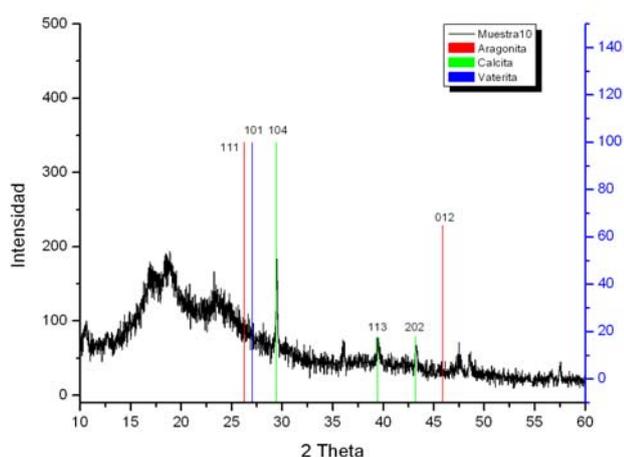


Figura 27. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 10.

La figura 28 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 10, en la cual se observa la presencia de cristales esféricos pequeños con tamaños entre los 2 -5 μm con una superficie lisa. La figura 28 muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 10, se observan depósitos cristalinos irregulares de CaCO_3 (ver flecha Fig. 28C) sobre la esponja y agregados cristalinos circulares que irrumpen hacia la superficie del sustrato como una placa cristalina circular (ver círculo Fig. 28C) de tamaños que van desde los 10 μm hasta los 20 μm de diámetro dispuestos sobre toda la superficie de la esponja. La particularidad de estos agregados cristalinos circulares es que afectan la morfología de la superficie de la esponja, es decir, la esponja circundante presenta pliegues concéntricos alrededor de los agregados circulares.

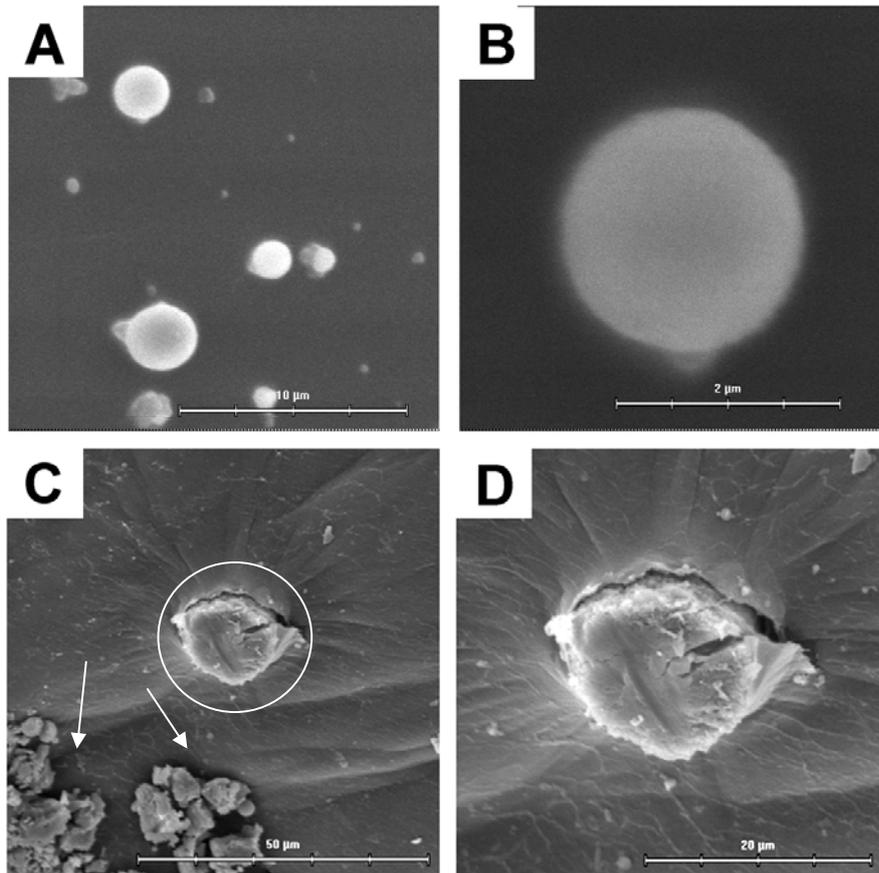


Figura 28. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 10. Cristales esféricos de fondo de micropocillo (A). Cristales esféricos con mayor magnificación (B). Cristales irregulares y agregados cristalinos esféricos sobre esponja (A). Agregados cristalinos esféricos con aumento mayor (C).

3.4 Muestra Ensayo N° 11

La figura 29 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 11, el cual contiene el sustrato esponja y APS mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

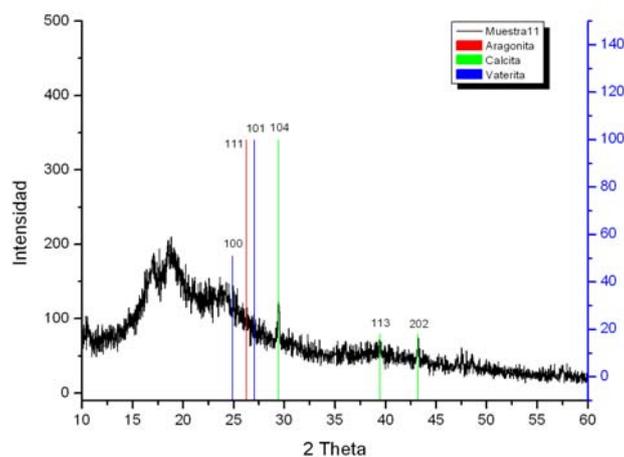


Figura 29. Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 11.

La figura 30 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 11, en la cual se observan dos tipos de estructuras cristalinas, las más numerosas corresponden a cristales esféricos de un tamaño promedio de $10 \mu\text{m}$ dispuestas de manera homogénea por todo el micropocillo. Además, se observan agregados cristalinos de morfología más compleja semejantes a “donuts” (Fig. 30 A y B) con un tamaño de $40 \mu\text{m}$ aproximadamente, las cuales se encuentran rodeadas por esferas cristalinas más pequeñas de $20 \mu\text{m}$ de diámetro. Estas “donuts” son de superficie irregular y se encuentran dispuestas de manera homogénea sobre el micropocillos. La figura 30 C, D y E muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 11, se observan agregados cristalinos circulares como “botones” cristalinos de tamaños que van desde los $10 \mu\text{m}$ hasta los $20 \mu\text{m}$ de diámetro dispuestos sobre toda la

superficie de la esponja. La superficie de estos “botones” cristalinos en algunos casos es rugosa y en otro liso. Además podemos mencionar que existe un halo con morfología microporosa alrededor de estos botones (Fig.30 B). Es importante señalar que estos “botones” cristalinos afectan la superficie de la esponja que esta alrededor de ellos, es decir, la esponja circundante se ve a veces recogida y con pliegues concéntricos hacia el “botón” y otras veces se ve erosionada y porosa. Estos agregados cristalinos circulares se proyectan desde debajo de la esponja y se alcanza a percibir que la superficie de la esponja está rota por el efecto de los botones (Fig. 30 E).

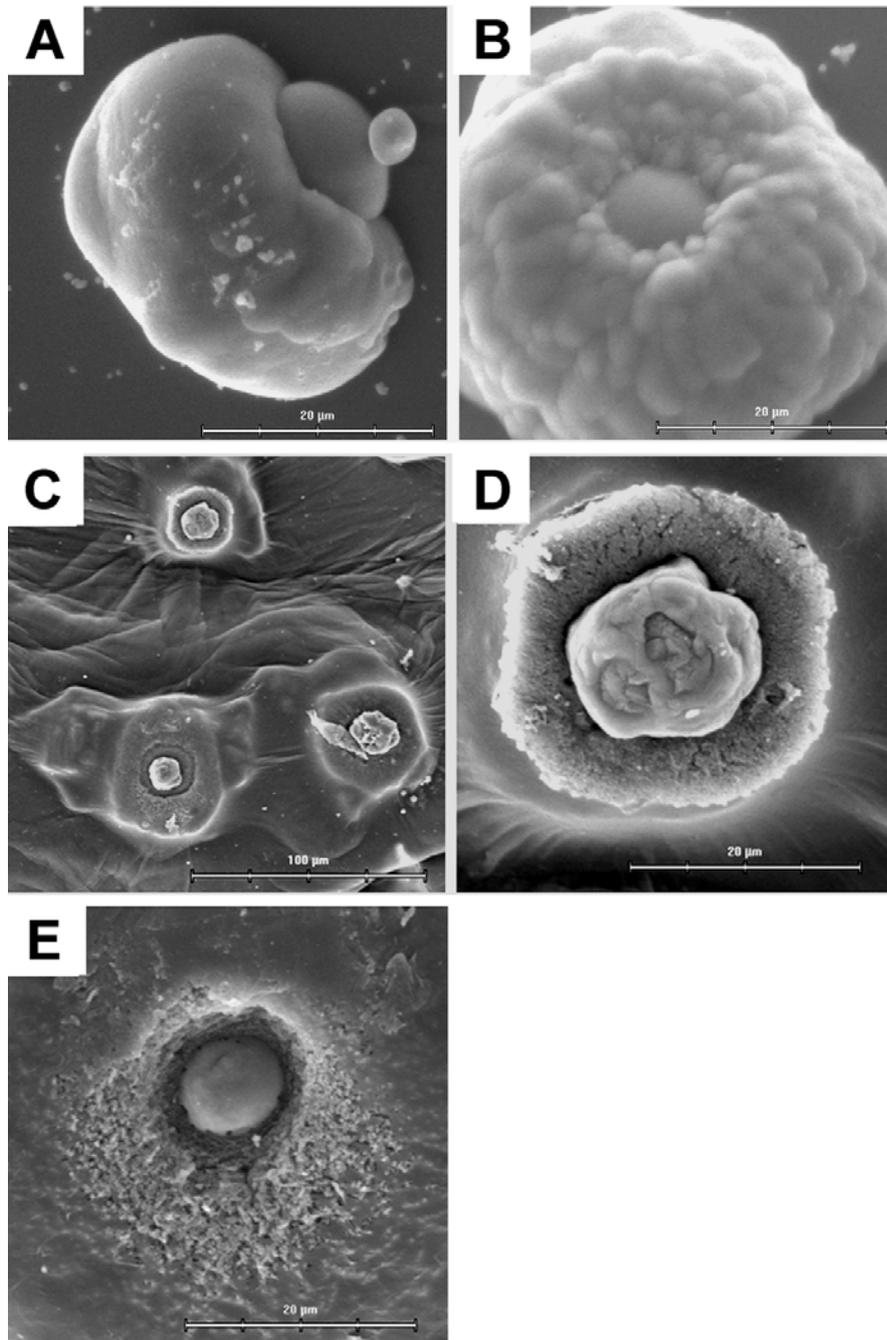


Figura 30. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C, D y E) en el ensayo N° 11. Agregados cristalinos semejante a “Donut” sobre micropocillo (A). “Donut” con mayor magnificación (B). Superficie esponja y agregados cristalinos circulares o botón cristalino (C). Botones cristalinos con mayor magnificación (D y E).

3.5 Muestra Ensayo N° 12

La figura 31 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 12, el cual contiene el sustrato esponja y el polímero AF mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

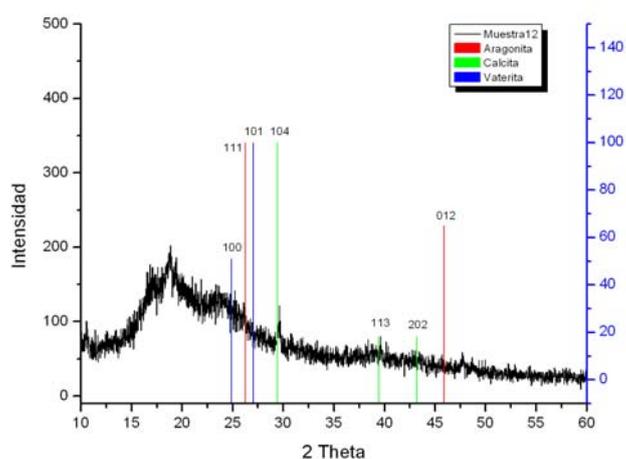


Figura 31. Difragotograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 12.

La figura 32 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 12, en la cual se observa la presencia de poliagregados cristalinos irregulares (Fig. 32A), de tamaños variables de hasta $100\ \mu\text{m}$. Se pueden apreciar los componentes de estas estructuras irregulares que corresponden a cristales prismáticos orientados, definidos, con tamaños de entre $10\text{-}20\ \mu\text{m}$ de largos y delgados y orientados en la misma dirección desde donde nacen (Fig. 32B). Es importante destacar que dentro de los componentes de estos agregados cristalinos podemos describir 3 zonas. La primera corresponde a zonas rugosas irregulares, con agrietamientos transversales. La segunda corresponde a una zona con cristales prismáticos orientados y la tercera a una zona donde se alojan cristales esféricas de aproximadamente $5\ \mu\text{m}$ de diámetro (Fig. 32A). La figura 32 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del

ensayo N° 12, en la cual se observan estructuras cristalinas irregulares que son muy parecidas a los cristales observadas con menor aumento en el fondo del micropocillo . Sin embargo, con mayor aumento estos cristales obtenidos con el polímero AF presentaron una superficie totalmente desorganizada, irregular y rugosa. Estos agregados cristalinos tienen un tamaño similar a las obtenidas en el fondo del micropocillo, y se encuentran formando aglomeraciones sin ningún ordenamiento preferente.

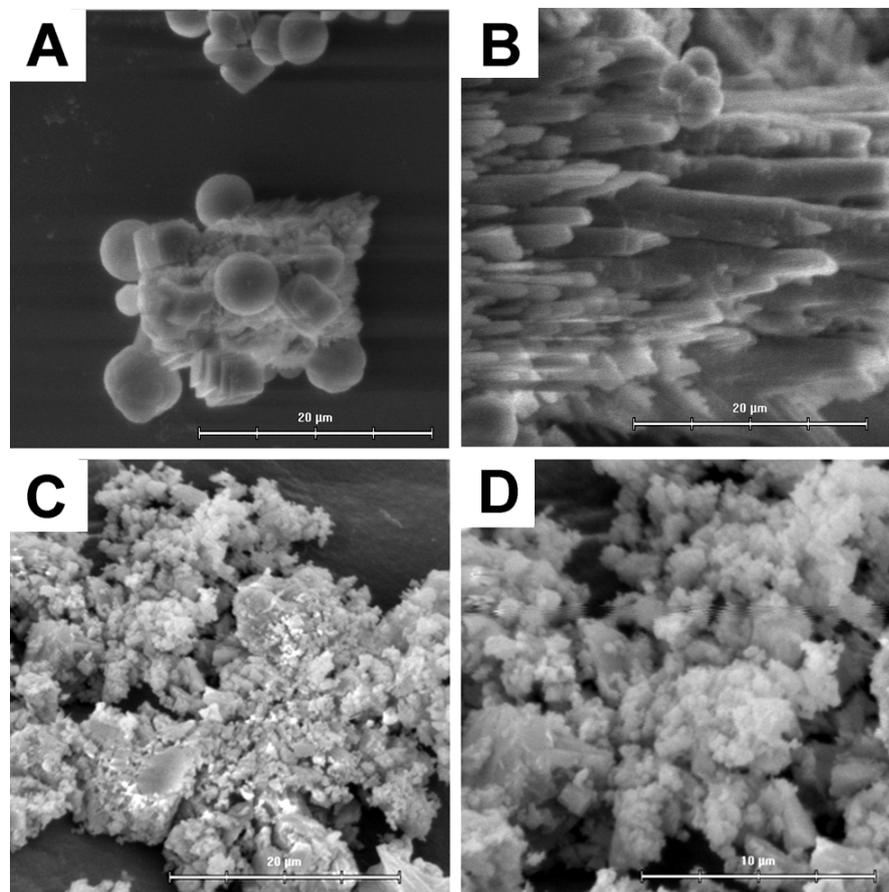


Figura 32. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 12. Cristales irregulares con formas esféricas y romboédricas que presenta las 3 zonas mencionadas en el fondo del micropocillo (A). Cristales prismáticos orientados en el fondo del micropocillo (B). Placas irregulares y rugosas sobre la esponja (C). Placas irregulares y rugosas con mayor magnificación (D).

4. Muestras con sustrato esponja, fracción PG-FS y un polímero (ensayos N° 13, 14 y 15)

A continuación se presentan los resultados de los XRD y SEM de los ensayos de cristalización de CaCO_3 utilizando dos componentes constantes, es decir, el sustrato esponja y PG-FS y que además se les agregó un polímero como un tercer componente (APA, APS, AF), estos ensayos corresponden a los números N° 13, 14 y 15.

4.1 Muestra Ensayo N° 13

La figura 33 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 13, el cual contiene el sustrato esponja, PG-FS y APA mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

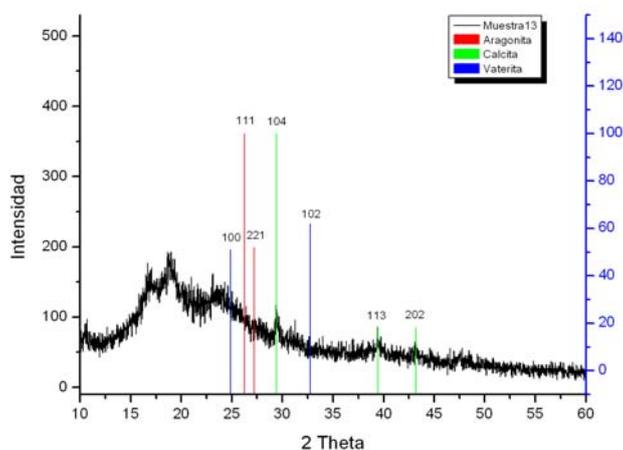


Figura 33. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 13.

La figura 34 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 13, en la cual se observan presencia de estructuras cristalinas esféricas muy definidas con una superficie homogénea y lisa, de tamaños que van desde 1 μm a los 10 μm . La figura 34 B y C

muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 13, en el cual se observan agregados cristalinos de morfología compleja con forma de un “bloque cristalino” de tamaños que van desde los 20 μm hasta los 30 μm de diámetro dispuestos sobre toda la superficie de la esponja. Es importante destacar que similares estructuras cristalinas fueron observadas cuando sólo el sustrato esponja y el polímero APA fueron usados (ver Fig. 28), sin embargo la incorporación de PG-FS como un tercer componente en el sistema de cristalización de CaCO_3 *in vitro* produjo un mayor crecimiento del bloque cristalino (Fig. 34C). El mayor crecimiento del bloque cristalino afectó en mayor medida la morfología de la superficie de la esponja alrededor del sitio de crecimiento mostrando depresiones y pliegues concéntricos hacia el “bloque cristalino” (Fig. 42c). Estos “bloques cristalinos” se proyectan perpendicularmente desde la superficie de la esponja hasta 20 μm , observándose incluso ruptura de la superficie de la esponja (Ver flecha en Fig.34 C).

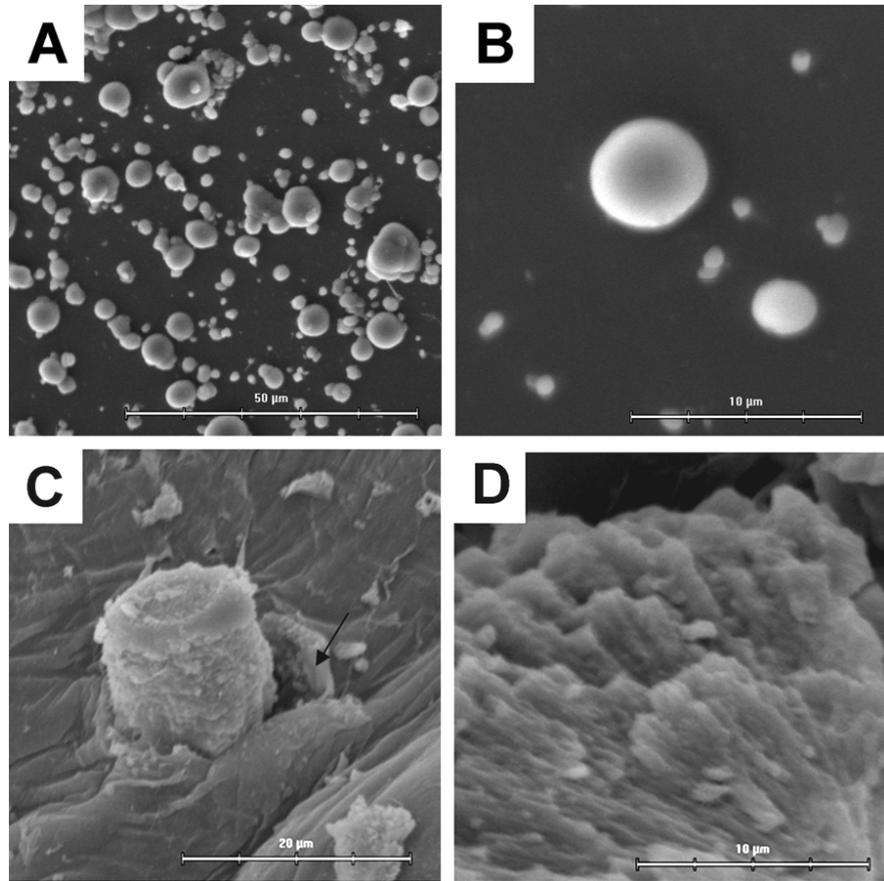


Figura 34. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 13. Cristales esféricos sobre fondo de micropocillo (A). Cristales esféricos con mayor magnificación (B). Crecimiento del Bloque cristalino perpendicularmente desde la esponja (C). Mayor magnificación de superficie de “Bloque cristalino” (D).

4.2 Muestra Ensayo N° 14

La figura 35 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 14, el cual contiene el sustrato esponja, PG-FS y APS mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

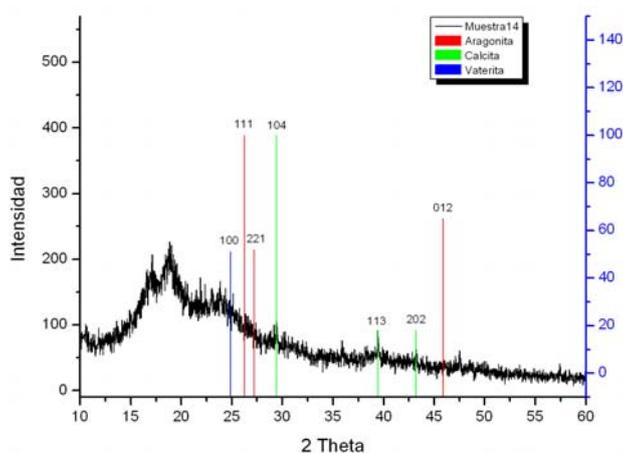


Figura 35. Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 14.

La figura 36 A, B y b muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 14, en la cual se observan estructuras cristalinas de formas irregulares, esféricas y elípticas de superficie relativamente lisa. Los tamaños son variable con tamaños desde $1\ \mu\text{m}$ hasta $25\ \mu\text{m}$. La figura 36 C, D y E muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 14, en la cual se observan agregados cristalinos circulares de morfología compleja con forma de “botones cristalinos” de tamaños que varían entre los $2\text{-}30\ \mu\text{m}$ de diámetro y distribuidos sobre toda la superficie de la esponja. La superficie de los “botones cristalinos” más pequeños es rugosa (Fig. 36D) y en el caso de los grandes es más lisa (Fig. 36C), estos últimos están rodeados por un halo rugoso de aproximadamente $3\ \mu\text{m}$ de ancho. Es importante destacar que similares estructuras cristalinas fueron observadas cuando sólo el sustrato esponja y el

mismo polímero APS fueron usados (ver Fig. 30), sin embargo la incorporación de PG-FS como un tercer componente en el sistema de cristalización de CaCO_3 *in vitro* produjo el mismo tipo de botón cristalino y de mayor aumento (Fig. 34C). El mayor crecimiento del bloque cristalino afectó en mayor medida la morfología de la superficie de la esponja alrededor del sitio de crecimiento mostrando un mayor solevantamiento de la superficie parecidos a mesetas, debajo de la superficie de la esponja que se hacen más pronunciados al acercarse a un botón de mayor tamaño y mostrando pliegues mas pronunciados alrededor del “botón cristalino” (Fig. 34C). Por otro lado, la figura 36E muestra la presencia en forma aislada de un material cristalino aislado desorganizado, pero que con aumentos mayores se ve la presencia de pequeñas cristales espiculados orientadas en la misma dirección de crecimiento de este material.

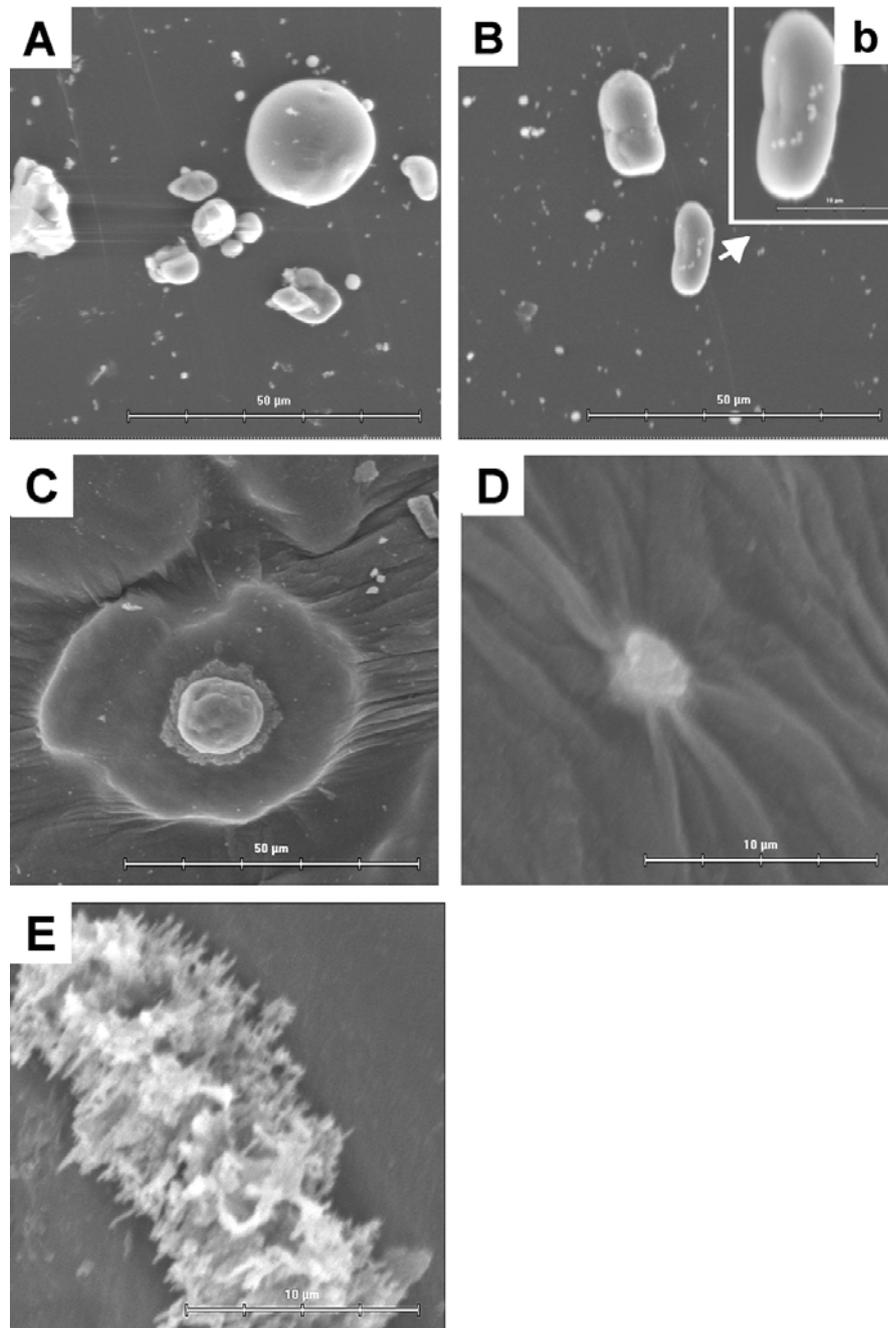


Figura 36. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C, D y E) en el ensayo N° 14. Cristales con formas irregulares y esféricas sobre micropocillo (A). Cristales elípticos sobre micropocillo (B). Cristales elípticos con mayor magnificación (b). Botón cristalino y superficie de esponja (C). Botón cristalino pequeño sobre esponja (D). Estructura cristalina espiculada sobre esponja (E).

4.3 Muestra Ensayo N° 15

La figura 37 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 15, el cual contiene el sustrato esponja, PG-FS y AF mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

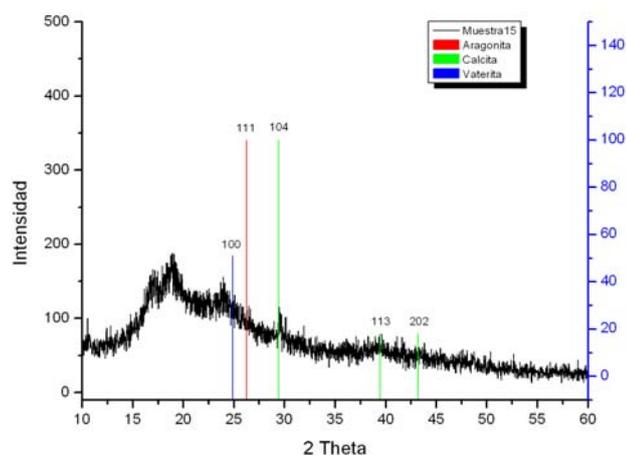


Figura 37. Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 15.

La figura 38 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 15. En algunas de estas formas cristalinas se puede observar una forma arquitectónica más compleja con crecimiento en terrazas de láminas puestas unas sobre otras (Fig. 38A). Con aumentos mayores se logran observar con mayor detalle los componentes de estas estructuras cristalinas irregulares (Fig. 38B). Es importante destacar que estructuras cristalinas similares también se observaron cuando se utilizaron sólo el sustrato esponja y el mismo polímero AF (ver Fig. 32), observándose los cristales irregulares con formas esféricas y romboédricas presentes en las 3 zonas mencionadas (Fig. 38B) como en la figura 32B. Es importante destacar que dentro de los componentes de estos agregados cristalinos podemos describir 3 zonas. La figura 38B muestra con mayor detalle los cristales prismáticos más cortos, irregulares y esféricos. La figura 38 C y D muestra la

imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 15, en la cual se muestra con bajo aumento la presencia de estructuras cristalinas irregulares de superficies rugosas y de tamaños variables de hasta $40\ \mu\text{m}$. Con aumentos mayores se logran observar con mayor detalle estas estructuras irregulares (Fig. 48 B) y la presencia de cristales esféricos lisas que van de $2\ \mu\text{m}$ hasta $5\ \mu\text{m}$ de diámetro, y también la presencia de cristales triangulares orientados con forma de dientes de tiburón y de un tamaño regular de $1\ \mu\text{m}$ de largo (Fig. 38 D).

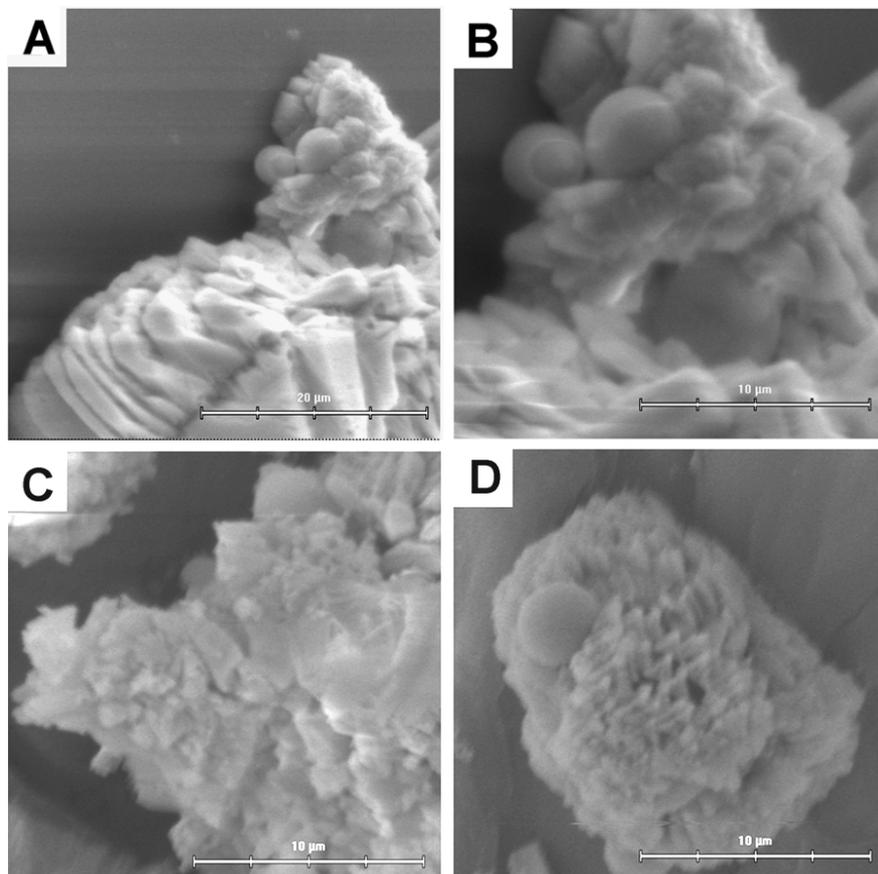


Figura 38. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 15. Cristales irregulares de apariencia laminar sobre fondo micropocillo (A). Cristales irregulares con formas esféricas y romboédricas sobre fondo de micropocillo (B). Cristales irregulares sobre superficie de esponja (C). Cristales esféricos y cristales triangulares con forma de “dientes de tiburón” (D).

5. Muestra con sustrato esponja, fracción PG-FI y un polímero.

A continuación se presentan los resultados de los XRD y SEM de los ensayos de cristalización de CaCO_3 , en los cuales contenían dos componentes constantes, es decir, el sustrato esponja y PG-FI y que además se les agregó un polímero como un tercer componente (APA, APS, AF), estos ensayos corresponden a los números N° 16, 17 y 18.

5.1 Muestra Ensayo N° 16

La figura 39 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 16, el cual contiene el sustrato esponja, PG-FI y APA mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

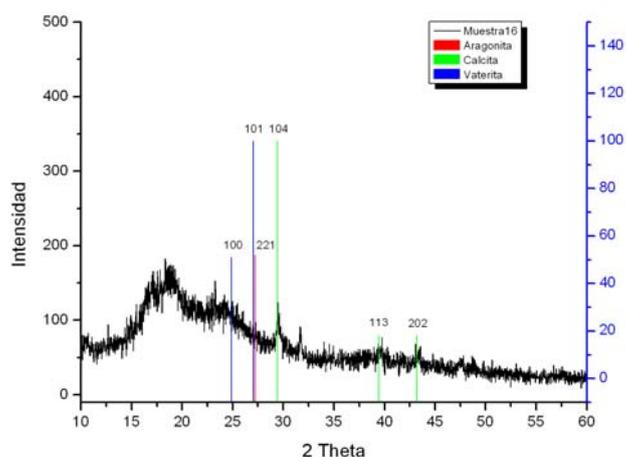


Figura 39. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 16.

La figura 40 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 16, en la cual se observan estructuras cristalinas irregulares esféricas de superficies lisas de tamaños muy variable que van desde los 10 μm hasta 50 μm . Abundan pequeñas esferas de aproximadamente 5 μm de diámetro, los cuales también fueron observados pero sólo cuando el sustrato

esponja y APA fueron usados (ver Fig. 28). La figura 40 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 16, se observan pequeños depósitos cristalinos irregulares de CaCO_3 sobre la esponja y agregados cristalinos circulares formando placas cristalinas estratificadas que irrumpen hacia la superficie del sustrato con superficies rugosas y lisas (ver flecha Fig. 40C). Las placas presentan un diámetro de 50 μm aproximado. Además, se aprecian pequeños botones cristalinos como agregados cristalinos esféricos (Fig. 40 D y d) con tamaños de 10 μm dispuestos homogéneamente sobre la esponja. La superficie de estos “botones” cristalinos es más bien rugosa. Se puede observar que estos agregados cristalinos también afectan la disposición de la superficie de la esponja que esta alrededor de ellos mostrando pliegues.

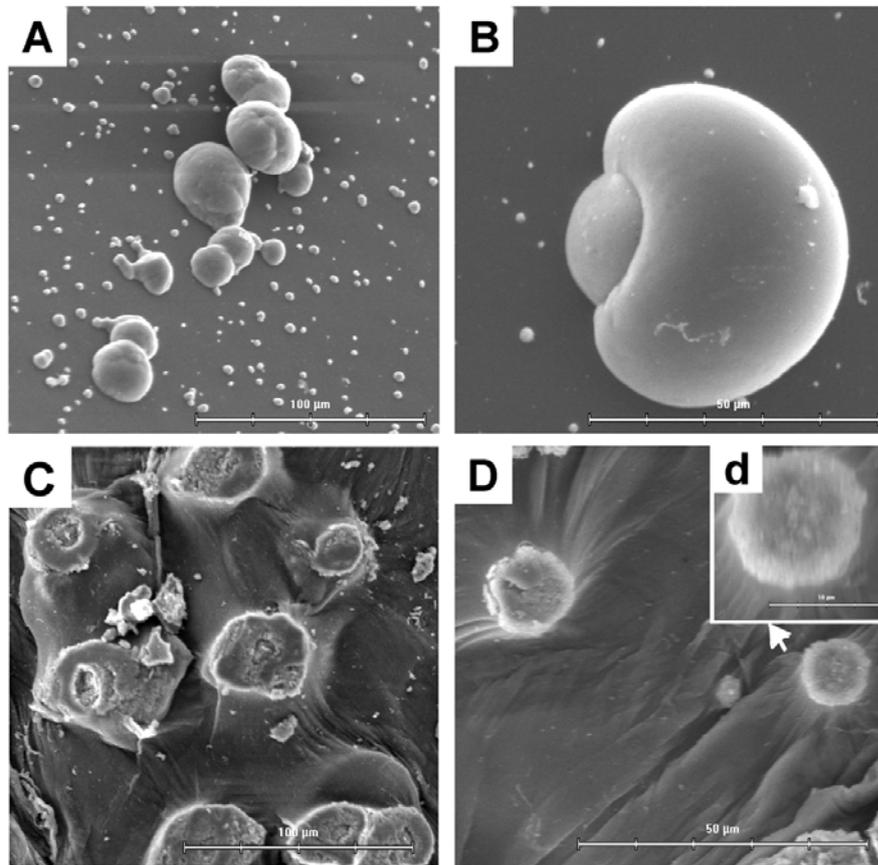


Figura 40. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 16. Cristales esféricos irregulares de diferentes tamaños sobre fondo de micropocillo (A). Cristal esférico irregular con mayor magnificación (B). Cristales irregulares y agregados cristalinos esféricos y superficie de la esponja (C). Botón cristalino sobre superficie de esponja (D). Botón cristalino con mayor magnificación (d).

5.2 Muestra Ensayo N° 17

La figura 41 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 17, el cual contiene el sustrato esponja, PG-FI y APS mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita y calcita.

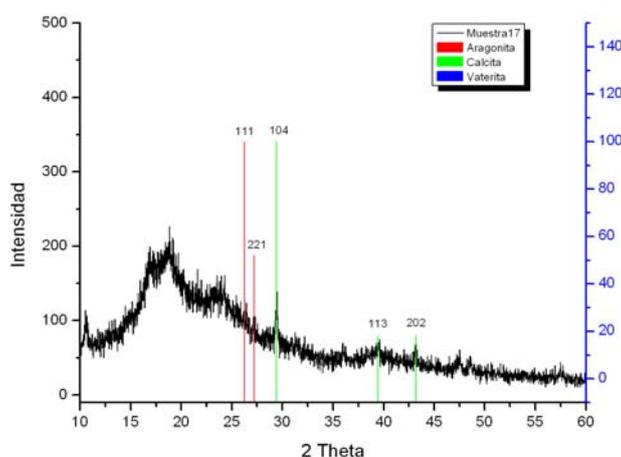


Figura 41. Difragtoograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 17.

La figura 42 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 17, en la cual podrían describirse 3 tipos de estructuras cristalinas. El primer tipo menos abundante, corresponde a cristales romboédricos modificados pero bien definidos de caras lisas y de tamaño promedio de $40 \mu\text{m}$ (Fig. 42A). El segundo tipo corresponde a agregados cristalino relativamente esféricos, de superficie irregular y de un tamaño promedio aproximado de $30 \mu\text{m}$ (Fig. 42A). Finalmente, cristales esféricos muy numerosos con una superficie relativamente lisa, de un tamaño promedio aproximados de $5 \mu\text{m}$ y que cubren el micropocillo en toda su extensión y que además podemos encontrar cubriendo a los otros dos tipos de estructuras cristalinas (Fig. 42B). La figura 42 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato esponja del ensayo N° 17, en la cual se observan agregados cristalinos circulares como “botones”

cristalinos de tamaños que van desde los 5 μm hasta los 15 μm de diámetro dispuestos homogéneamente sobre la esponja. La superficie de estos “botones” cristalinos en algunos casos es rugosa y en otro liso. Es importante señalar que estos “botones” cristalinos también afectan la superficie y textura de la esponja que esta alrededor de ella como en los casos anteriores donde sólo la esponja y el mismo polímero APS (ver Fig. 30) fueron usado en los ensayos de cristalización de CaCO_3 .

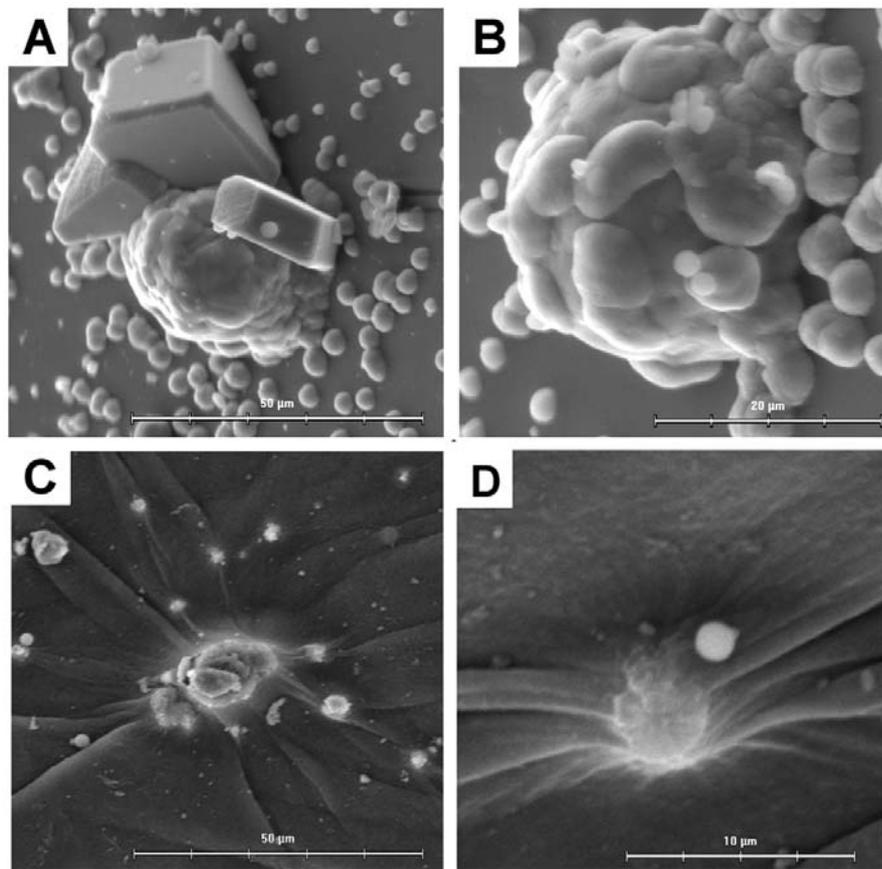


Figura 42. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 17. Vista general de los 3 tipos de estructuras cristalinas sobre el fondo del micropocillo (A). Aumento mayor de 2 de los 3 tipos de estructuras cristalinas (B). Superficie esponja y agregados cristalinos circulares o botón cristalino (C). Botón cristalino pequeño con mayor magnificación (D).

5.3 Muestra Ensayo N° 18

La figura 43 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 18, el cual contiene el sustrato esponja, PG-FI y AF mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

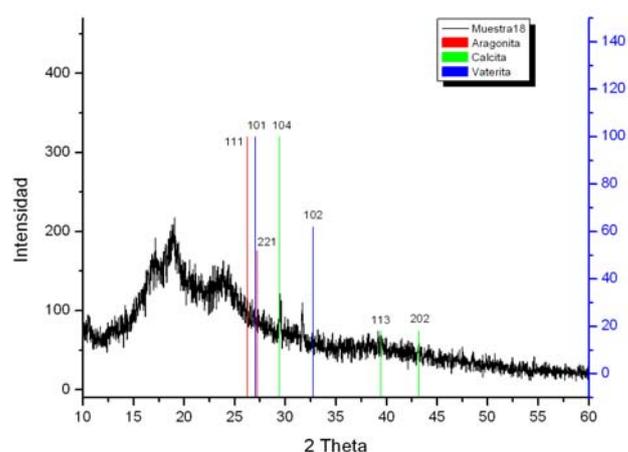


Figura 43. Difragograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 18.

La figura 44 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 18, en la cual se observa la presencia de estructuras cristalinas con formas irregulares, de tamaños variables que van desde los 20 μm hasta 50 μm (Fig. 44A). Con aumentos mayores (Fig. 44B) se logran observar con mayor detalle los componentes de estos agregados cristalinos. Estructuras cristalinas con similar morfología también fue observada cuando sólo el sustrato esponja y el polímero AF fueron utilizados en los ensayos de cristalización de CaCO_3 (ver Fig. 32 A y B). Es posible describir presencia de poliagregados cristalinos irregulares constituidos con pequeños cristales agrupados no muy bien definidos, cortos e irregulares y orientados en diferentes direcciones. Además, se distinguen la presencia de estructuras esféricas de aproximadamente 5 μm de diámetro. La figura 44 C, D y E muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato

esponja del ensayo N° 18, en la cual se observa la presencia de agregados policristalinos de morfología compleja característica, de tamaños variables de hasta 100 μm (Fig. 44C). Con aumentos mayores se logran observar con mayor detalle la ultraestructura cristalina de estos agregados, en la cual se presencian cristales triangulares orientados con forma de dientes de tiburón y de un tamaño regular de 1 μm de largo (Fig. 44D). Además, se observa la presencia de cristales esféricos de tamaños de 5 μm de diámetro (Fig. 44E) en el centro de la microestructura cristalina y cristales prismáticos orientados de tamaño aproximado de 5 μm . Es importante destacar que estos cristales triangulares orientados también fueron observados (ver Fig. 38D) sólo cuando el sustrato esponja y el polímero AF fueron puesto junto el PG-FS. La disposición espacial de todas las estructuras cristalinas parece estar relacionadas en un orden particular que permiten la formación de estos agregados policristalinos característicos de morfología compleja.

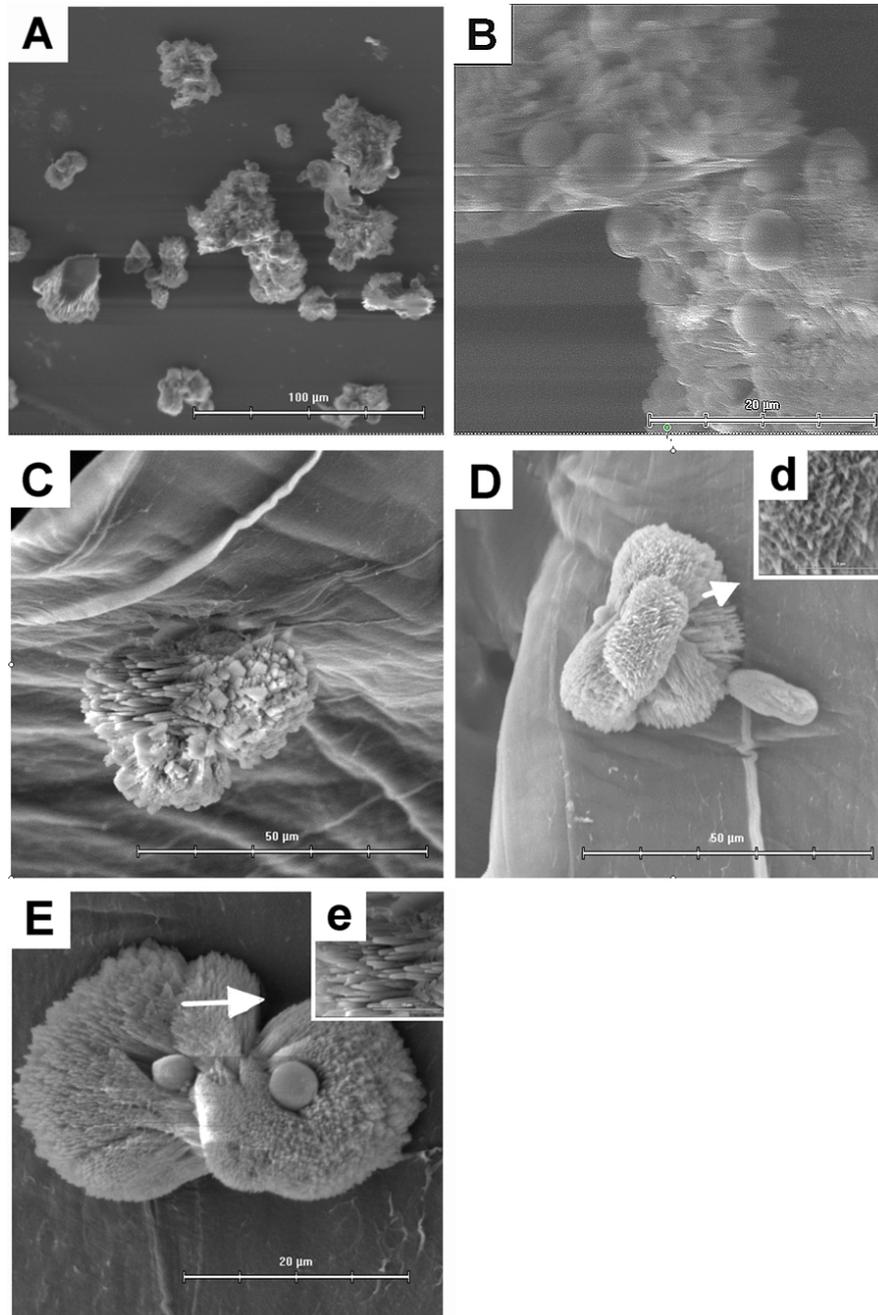


Figura 44. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C, D, d, E y e) en el ensayo N° 18. Estructura cristalinas de formas irregulares sobre fondo de micropocillo (A). Estructura cristalinas de formas irregulares con mayor aumento (B). Agregados policristalino y superficie de la esponja (C y D). Aumento mayor de mostrando la presencia de cristales triangulares con forma de “dientes de tiburón” (d). Estructura cristalina espiculada y cristales esféricos sobre esponja (E). Aumento mayor de mostrando la presencia de cristales prismáticos orientados (e).

6. Muestra con sustrato gastrogel y un polímero.

A continuación se presentan los resultados de los XRD y SEM de los ensayos de cristalización de CaCO_3 , los cuales contenían el sustrato gastrogel constante y que además se les agregó un polímero (APA, APS, AF) como un segundo componente como aditivo, estos ensayos corresponden a los números N° 19, 20 y 21.

6.1 Muestra Ensayo N° 19

La figura 45 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 19, el cual contiene el sustrato gastrogel y APA mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

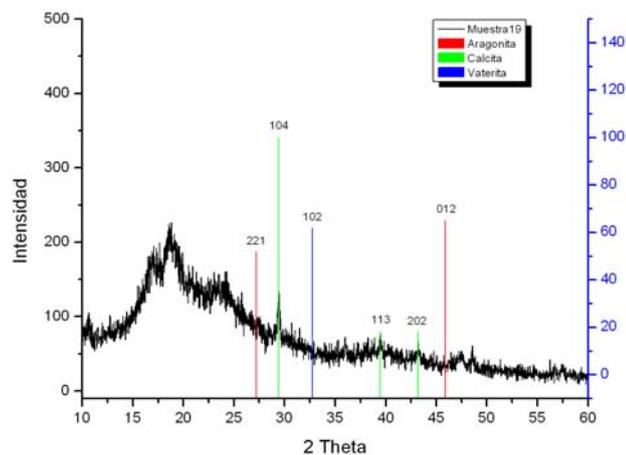


Figura 45. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 19.

La figura 46 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 19, en la cual se observa la presencia de cristales esféricos pequeños con tamaños entre los 2 -7 μm con una superficie lisa y en algunos casos con grietas en su superficie. Similares cristales esféricos fueron observados cuando el APA fue usado en presencia del sustrato esponja

(ver Fig. 28 A y B). La figura 46 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato gastrogel del ensayo N° 19, se observan dos zonas definibles sobre el gastrogel. La primera zona está conformada por placas cristalinas de superficie irregular y rugosa (ver flecha en la Fig. 46 C). Las placas llegan a cubrir zonas de más de 300 μm de largo por 100 μm de ancho. La segunda zona corresponde agregados cristalinos circulares que irrumpen hacia la superficie del gastrogel como una placa cristalina circular las cuales presentan cristales esféricos de aproximadamente 3 μm de diámetro en el centro (Fig. 46D). Estos agregados cristalinos circulares no afectan mayormente la morfología de la superficie del gastrogel alrededor de los agregados circulares.

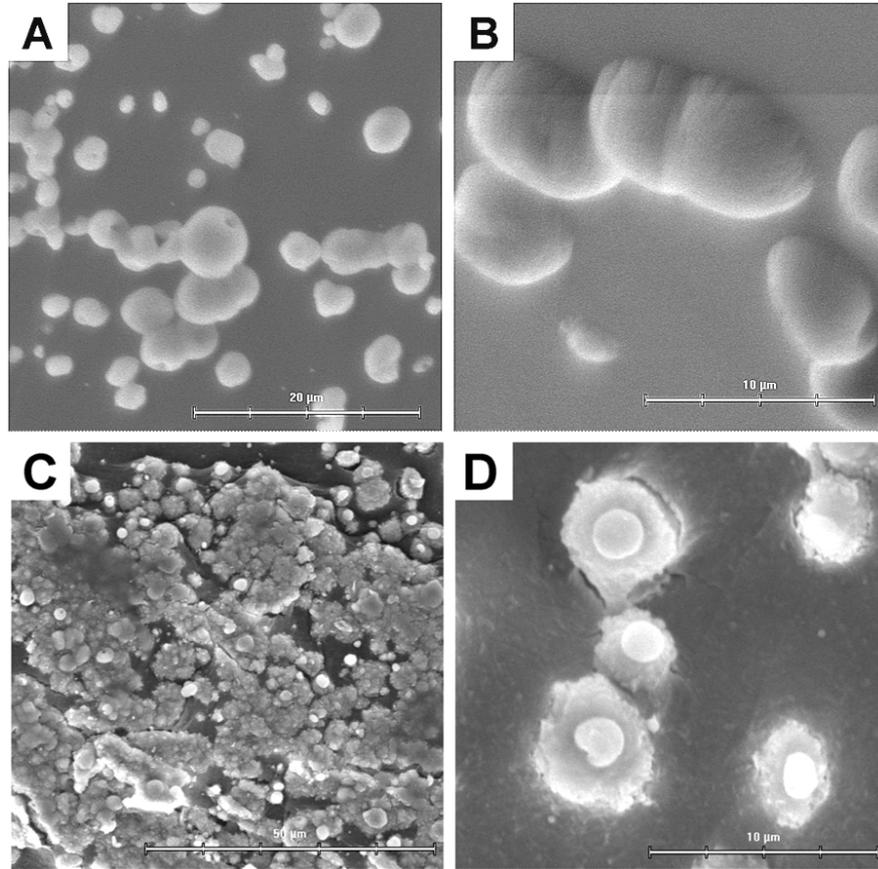


Figura 46. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato gastrogel (C y D) en el ensayo N° 19. Cristales esféricos del fondo de micropocillo (A). Cristales esféricos con mayor magnificación (B). Placas de superficie irregular y rugosa sobre gastrogel (C). Agregados cristalinos esféricos con aumento mayor (D).

6.2 Muestra Ensayo N° 20

La figura 47 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 20, el cual contiene el sustrato gastrogel y APS mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

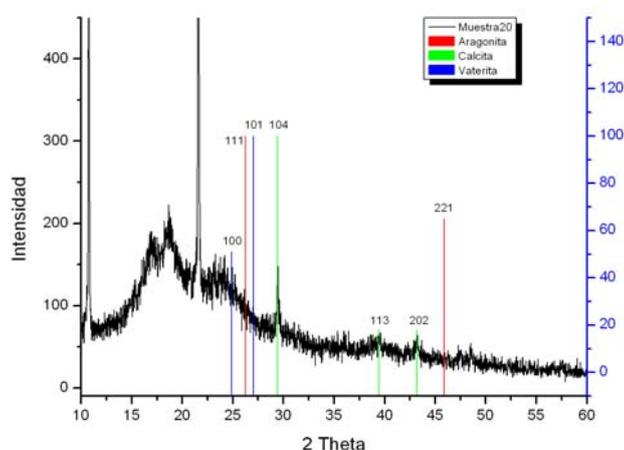


Figura 47. Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 20.

La figura 48 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 20, en la cual se observa se observa la presencia de cristales esféricos pequeños con tamaños entre los 2 -5 μm con una superficie lisa. La figura 48 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato gastrogel del ensayo N° 20, en la cual se observa la superficie del gastrogel y la presencia de pequeños cristales esféricos de aproximadamente 3 μm de diámetro, las cuales se fusionan formando agregados cristalinos mayores. Es importante destacar que no se aprecia que éstas estructuras deformen la superficie del gastrogel.

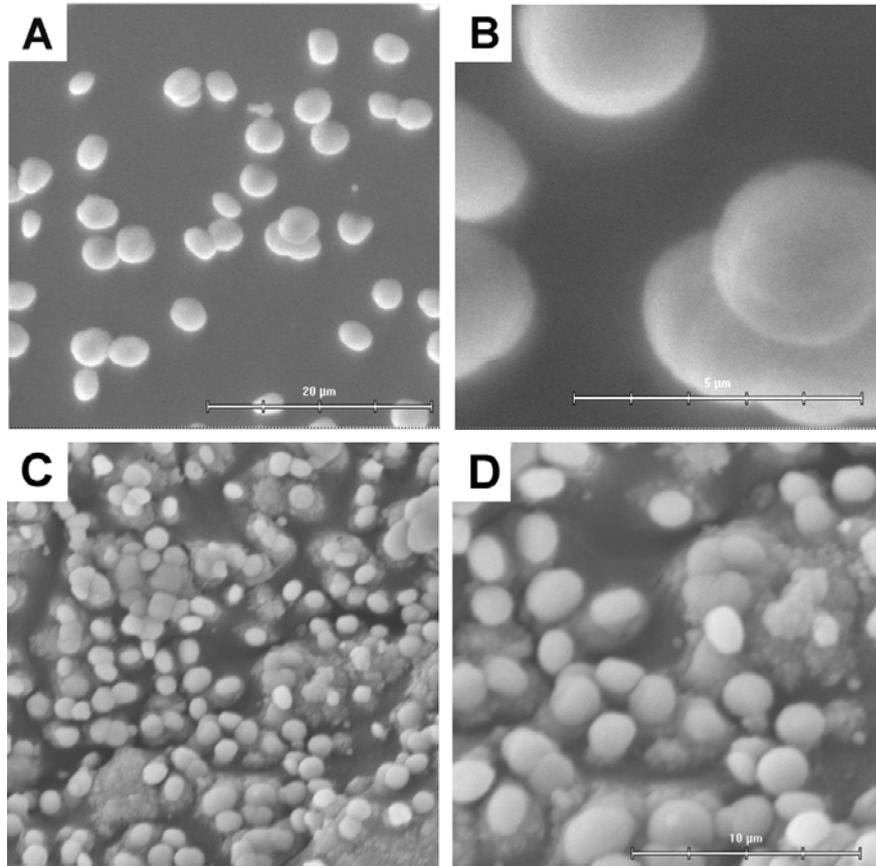


Figura 48. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato gastrogel (C y D) en el ensayo N° 20. Cristales esféricos sobre micropocillo (A). Cristales esféricos con mayor magnificación (B). Cristales esféricos sobre gastrogel (C). Cristales esféricos con mayor magnificación (D).

6.3 Muestra Ensayo N° 21

La figura 49 muestra el difractograma de XRD obtenido de los cristales de CaCO_3 del ensayo N° 21, el cual contiene el sustrato gastrogel y AF mostrando la presencia de los polimorfos de aragonita, calcita y vaterita.

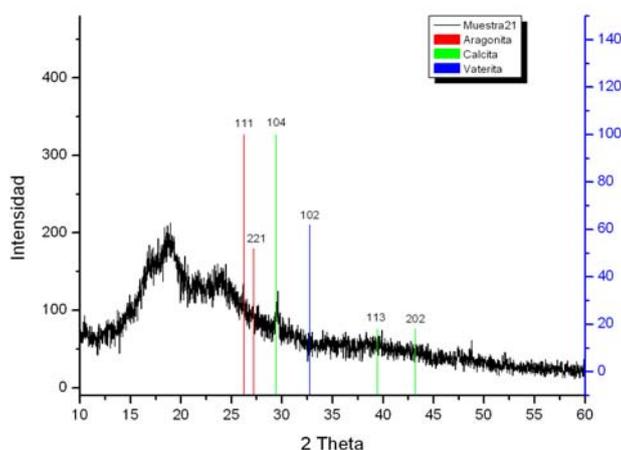


Figura 49. Difractograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 21.

La figura 50 A y B muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el fondo del micropocillo del ensayo N° 21, en la cual se observan 2 tipos de estructuras cristalinas. El primer tipo corresponde a agregados policristalino irregulares de tamaños que va desde los 10 μm a los 20 μm (Fig.50A) formadas por cristales más pequeños y dispuestos en la misma dirección desde su origen. El segundo tipo de estructuras corresponden a cristales esféricos de superficie lisa con tamaños regulares de 10 μm (Fig. 50B). La figura 50 C y D muestra la imagen SEM obtenida de los cristales de CaCO_3 depositados en el sustrato gastrogel del ensayo N° 21, en la cual se observan agregados cristalinos como placas irregulares de superficie rugosa con tamaños máximos de 100 μm formadas por cristales más pequeños y depositados en

múltiples dirección. Nuevamente se observa que el crecimiento de estos cristales no modifica la superficie del gastrogel.

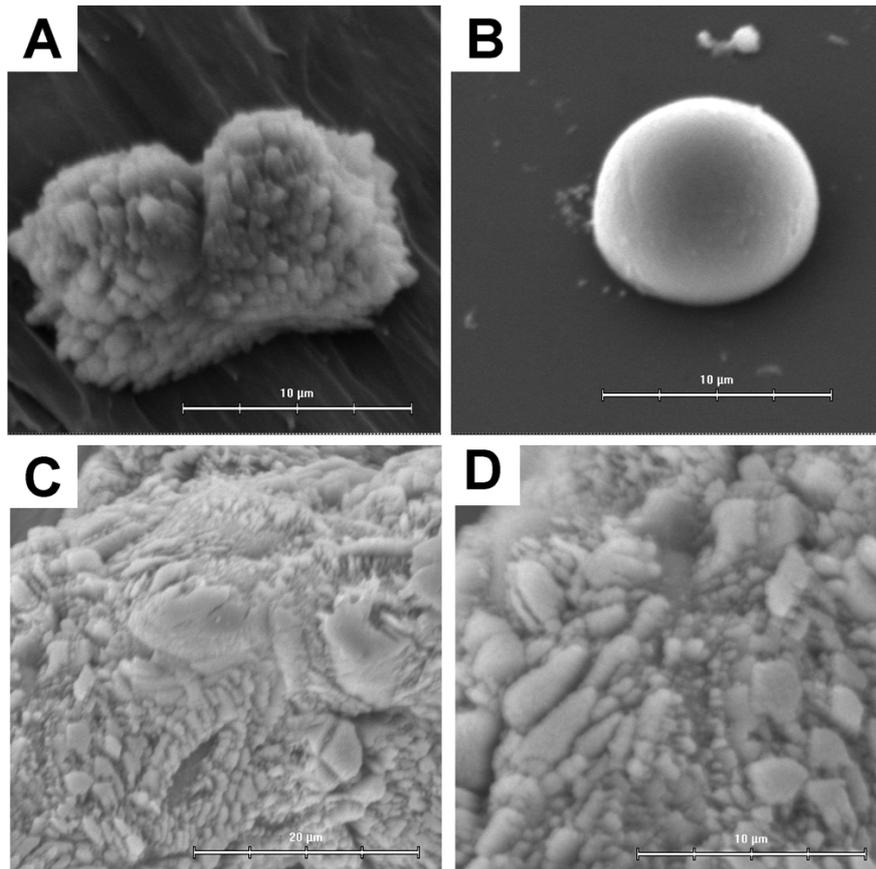


Figura 50. Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato gastrogel (C y D) en el ensayo N° 21. Cristal irregular sobre fondo de micropocillo (A). Cristal esférico sobre el fondo de micropocillo (B). Agregados cristalinos como placas irregulares sobre gastrogel (C). Aumento mayor de los agregados cristalinos como placas irregulares (D).

DISCUSION

El gastrolito al igual que otros modelos de biomineralización como conchas de moluscos, corales, huesos, dientes, cáscara de huevo corresponden a biocerámicas constituidas por dos fases, una inorgánica y otra orgánica. La fase inorgánica constituye el mayor porcentaje de la biocerámica (sobre el 95%), y la fase orgánica esta constituida por macromoléculas biológicas la cual alcanza una pequeña fracción del material híbrido, sin embargo juega un papel decisivo en el control de la nucleación, crecimiento y morfología de los cristales de CaCO_3 (Lowenstam y Weiner, 1989).

En estudios previos realizados en gastrolitos en este laboratorio se determinó que su estructura está organizada por multicapas del biopolímero de quitina dispuestas concéntricamente (Navarrete, 2004; Huxley, 1880). Esta disposición permite que el material inorgánico se deposite de manera ordenada, funcionando como una plataforma organizadora de la cristalización del CaCO_3 , situación que fue observada en algunos de los ensayos de cristalización de esta memoria de título y que será discutido mas adelante.

En estudios anteriores usando las técnicas de caracterización de difracción de rayos X (XRD), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) y espectroscopía de infrarroja (FTIR) se determinó que el gastrolito está compuesto principalmente por CCA, el cual podría eventualmente cristalizar como calcita al variar las condiciones de humedad durante su análisis por XRD (Navarrete, 2004), esto también fue observado en esta memoria de título y evaluado comparando XRD y SEM.

Por otro lado, se ha determinado que la presencia de los PGs al igual que otras moléculas orgánicas cumplen un rol importante en la biomineralización ya que serían los responsables de la nucleación y distribución de los cristales de CaCO_3 , controlando además su producción (Fernandez *et al.*, 2001), este efecto también fue observado en nuestros ensayos de cristalización que contenían PGs, Gastrogel o Esponja como aditivos, lo cual está en concordancia con estudios previos que confirman que en el gastrolito se encuentran diferentes tipos de PGs como dermatán sulfato, queratán sulfato

y condroitín sulfato, presentes en muy pequeña cantidad asociados íntimamente a capas de quitina (Navarrete. 2004).

En esta memoria de título se observaron diferentes morfologías mediante SEM y se determinaron diferentes polimorfos de CaCO_3 mediante la técnica de XRD. La nucleación y el crecimiento de los cristales de CaCO_3 fue modificada significativamente en los diferentes ensayos de cristalización dependiendo de la presencia de las distintas fracciones (PG-FS, PG-FI) y polímeros (APA, APS y AF) usados como aditivos. Esta observación experimental concuerda con lo descrito en literatura acerca del rol moderador sobre la cristalización del CaCO_3 de moléculas biológicas y sintéticas dependiendo de la estructura química de ésta. Además, en el fondo de los micropocillos se observaron similares morfologías de los cristales de CaCO_3 cuando se utilizaron los sustratos esponjas o gastrogel. Este efecto es igual al proceso de difusión de moléculas de aditivos que observó Carreño (2004) usando polímeros funcionalizados depositados sobre filtros los cuales difunden hacia la solución explicando la similitud en la morfología de los cristales de CaCO_3 depositados tanto en el micropocillo como sobre los sustratos.

En el análisis de las imágenes de SEM de los cristales de CaCO_3 obtenidos en los micropocillos en presencia del sustrato gastrogel con los diferentes polímeros comerciales, APA en el ensayo N° 19 (Fig. 46A), APS en el ensayo N° 20 (Fig. 48A) y con AF en el ensayo N° 21 (Fig. 50B) se observó que cuando el gastrogel fue usado como sustrato mostró una tendencia a formar cristales de CaCO_3 esféricos con pequeñas variaciones morfológicas las cuales fueron depositados en el fondo del micropocillo. Estos cristales circulares esféricos similares a vaterita de tamaños entre 2 a 5 μm son similares a los cristales de CaCO_3 esféricos de 5 μm reportados por Ouhenia (2008) en presencia de ácido poliacrílico.

También en el análisis de las imágenes SEM de los cristales de CaCO_3 obtenidos sobre el sustrato gastrogel con los diferentes polímeros comerciales, APA en el ensayo N° 19 (Fig. 46 C y D) y APS en el ensayo N° 20 (Fig. 48 C y D) se observan cristales esféricos con un halo polimérico claramente visible con un tamaño variable entre 3-10

μm y cristales esféricos de tamaños entre 2 a 5 μm respectivamente. Es importante destacar que la morfología de los cristales de CaCO_3 difieren con respecto a los obtenidos sobre gastrogel cuando el AF fue usado (Fig. 50 C y D), lo cual es atribuido al efecto precursor de estadios amorfos del polímero AF presente como aditivo (Xu *et al.* 2006). Similares cristales de CaCO_3 esféricos encontrados sobre el gastrogel (Figuras 46C, 48 C y D) han sido obtenidas en presencia de poliácido láctico por Gorma (2007) y por Neira-Carrillo (2005), este último trabajando en ensayos de mineralización de CaCO_3 con quitosano en presencia de APA identificando la presencia de una fase amorfa del CaCO_3 . Al mismo tiempo Gower y Odom (2000) describen al utilizar APS la formación de un film cristalino por acumulación de pequeñas gotas de CaCO_3 y de calcita. La formación del film inorgánico se genera al interaccionar interfacialmente dos gotas de CaCO_3 . Este mecanismo podría ser aplicado a las morfologías observadas cuando el sustrato gastrogel y los polímeros APA y APS fueron usados (Figuras 46D y 48D), es decir que al existir coalescencia entre las estructuras simples de CCA, estas se agregan formando films inorgánicos de carácter amorfo sobre el sustrato gastrogel.

Por otro lado, los cristales de CaCO_3 obtenidos sobre el sustrato gastrogel con el polímero comercial AF (Fig. 50 C y D) usado en el ensayo N° 21 presentan una notable similitud con los cristales de CCA reportado por Hyun Sook Lee (2005) obtenidos en presencia de Etanol. Cuando el polímero AF es usado, la morfología de los cristales de CaCO_3 difieren notablemente y una morfología irregular es observada atribuido al efecto inductor de estadios amorfos del AF. En este ensayo de cristalización se distinguen la formación de agregados cristalinos de CCA desorganizados morfológicamente sobre el gastrogel y en menor medida en el fondo del micropocillo.

De los ensayos de cristalización realizados, podemos decir que el sustrato gastrogel presentó un fuerte efecto sobre la nucleación y moderación de la cristalización del CaCO_3 superior al efecto moderador de los polímeros APA y APS, pero menor al efecto producido por AF bajo estas condiciones experimentales. En los ensayos de cristalización que contenían AF y gastrogel se observaron formaciones amorfas similares a las observadas en el ensayos que sólo contenía AF como aditivo, lo cual

concuera con lo descrito por Xu *et al.*(2006) en cuanto a su rol precursor de estadios amorfos de CaCO₃.

En las imágenes de SEM de los cristales de CaCO₃ obtenidos en los micropocillos en presencia del sustrato esponja en el ensayo N° 2 (Fig. 12) se pudo apreciar el efecto modulador de este sustrato sobre la morfología de los CaCO₃ depositados sobre ella durante el crecimiento cristalino *in vitro*. En este ensayo cristalino tuvo lugar el proceso de difusión de moléculas orgánicas que posiblemente estén presentes aún en la esponja permitiendo la formación de los mismos cristales de CaCO₃ en el micropocillo y sobre la esponja, similar efecto también fue descrito por Carreño (2004). En la figura 12 A y D podemos observar cristales similares morfológicamente a calcita y la presencia de agregados cristalinos esféricos (Fig. 12D), muy similares a las partículas de CCA estabilizadas por An-Wu (2005) en un medio con AF.

En el análisis de las imágenes de SEM de los cristales de CaCO₃ obtenidos sobre el sustrato esponja en presencia de los polímeros APA y APS con las fracciones de PGs en las diferentes combinatorias de los ensayos cristalinos (Figuras 28 C y D; 30 C, D y E; 34 C y D; 36 C y D; 40 C, D y d; 42 C y D) se observaron estructuras similares a las encontradas por Navarrete (2004) en ensayos de retromineralización con gastrolitos de *Cherax quadricarinatus*. A este tipo de estructuras cristalinas se las denominó cristales “rosetas” descritas por Navarrete (2004) observadas en ensayos en los que se usó gastrogel como sustrato. Estas “rosetas”, “botones cristalinos” o “bloques cristalinos” como son descritos en la presente memoria de título aparecieron en un número acotado de muestras en las cuales siempre había como factor común, la presencia de APA o APS y esponja, no así con gastrogel. No hubo modificaciones de la superficie de la esponja cuando se usó el polímero AF como aditivo y sólo se observaron agregados cristalinos irregulares y esféricos depositados sobre las esponjas (Figuras 38 C y D; 44 C, D, d, E y e). La presencia de la nucleación de los cristales “rosetas” o botones cristalinos modificó la forma y la continuidad de la superficie de la Esponja, las diferencias morfológicas de ésta, creemos que puede deberse a que se encuentran en diferentes estadios de crecimiento del botón y bloque cristalinos. El crecimiento de las “rosetas” podrían ser

explicado como un crecimiento de cristales de CaCO_3 que ocurre en el interior del sustrato esponja y crece hacia la superficie acumulándose sobre ésta y modificando la superficie de la esponja llegando incluso a romperla. El sollevamiento se puede observar en las figuras 30C y 36C mientras que el rompimiento de la superficie de la esponja puede ser claramente observado en la figura 34C. Es importante recordar que el sustrato esponja se obtiene desde el gastrolito después de retirar los PG-FI del gastrogel, por lo tanto se debería estar minimizando el factor modulador de los PGs sobre la formación de cristales de CaCO_3 , esto explica la presencia de los “botones” y crecimiento de los “bloques cristalinos”, la cual estaría íntimamente ligada a la presencia de fibras de quitina en la esponja (Huxley *et al.* 1880 y Navarrete 2004) más que al efecto modulador de las moléculas de PGs o de los polímeros.

Un caso particular representa la presencia del polímero AF durante el ensayo con el sustrato esponja (Figuras 32 C y D; 38C; 44B). Hay que recordar que el AF ha sido usado como un agente precursor de mineralización desde estados amorfos de CaCO_3 (Xu *et al.*, 2006). Cuando el AF se usó durante nuestros ensayos, el crecimiento de los cristales tipo Botones fue inhibido y no fueron observados sobre la superficie del sustrato esponja. El crecimiento de cristales de CaCO_3 resultó muy similar a los cristales estabilizados en medio alcohólico reportado por Hyun Sook Lee (2005) los que correspondían a CAA. En el caso del AF (Fig. 44B) del ensayo N° 18 se muestran cristales de CaCO_3 en el fondo del micropocillo, los cuales corresponden a formaciones semejantes con CCA descrito por Hyun Sook Lee (2005), no descartándose la presencia de algún otro polimorfo cristalino del CaCO_3 . Esta muestra fue la única en la que no se pudieron apreciar formaciones amorfas sobre la superficie de la esponja, las razones serán discutidas cuando se aborde la influencia del PG-FI como aditivo.

A continuación se discutirán los efectos de los polímeros comerciales (APA, APS y AF) en los ensayos de cristalización de CaCO_3

En el área de la biomineralización derivados del APA han sido usado como un agente moderador de la cristalización de CaCO_3 (Payne *et al.*, 2007; Cölfen, 2008). Diferentes estudios usando APA como aditivo en ensayos de cristalización de CaCO_3 han sido reportados en la literatura, dentro de ellas podemos mencionar los trabajos de Jianguo Yu (2004), quien controlando variables como la concentración del APA y la temperatura pudo obtener diferentes morfologías de calcita encontrando formas cúbicas, elipsoidales, romboédricas, etc. Por otro lado, Ouhenia *et al.* (2008), logró estabilizar el polimorfo de vaterita ocupando las mismas variables y Xu-Ron Xu (2008) logró obtener CCA estable. Es importante destacar que estos tres investigadores ocupando las mismas variables (concentración y temperatura) lograron estabilizar diferentes polimorfos cristalinos. Esto sugiere que para conocer el rol de un polímero como aditivo es importante conocer las condiciones y variables experimentales del ensayo de cristalización *in vitro*.

El uso del polímero APA en nuestros ensayos de cristalización de CaCO_3 (Figuras 18 A y B; 28 A y B; 34 A y B; 40 A y B; 46 A y B) mostró una similar tendencia a la formación de vaterita esféricas como se ha reportado en literatura por Ouhenia (2008). Es importante destacar que Ouhenia ocupó moléculas orgánicas de PGs además de APA observándose la presencia de una aglomeración de pequeños cristales esféricos de tamaño aproximado de 2-4 μm con formación de estructuras más complejas de mayor tamaño entre 10 a 40 μm . Este mismo hallazgo fue encontrado usando la fracción de PG-FI con APS como polímero (Fig. 42 A y B).

Usando APA las imágenes SEM de los cristales de CaCO_3 en el fondo de los micropocillos mostraron la formación de vaterita mientras que al análisis de XRD de los cristales obtenidos sólo con APA no fueron encontrados picos cristalinos de vaterita (Ensayo N° 5). Hay que recordar que debido a la poca cantidad de cristales obtenido en estos ensayos de cristalización y que la técnica de XRD fue adaptada para estos análisis es posible que existan otras fases de la vaterita menos intensas que pudieron estar

presentes pero que no fueron detectadas. Del análisis morfológico de los cristales obtenidos en presencia APA en conjunto con los sustratos esponja o gastrogel creemos que el depósito cristalino de vateritas esféricas fue gobernado enormemente por la presencia de estos sustratos más que por el efecto del APA como aditivo. Nuestros resultados presentados aquí concuerdan con lo descrito en literatura, ya que el APA ha mostrado efectos diferentes dependiendo de la concentración y temperatura usados en los experimento de cristalización. Es importante destacar que APA presentó un efecto modificador real, resulta interesante conocer bajo que variables se expresa el efecto modulador deseado.

Con respecto al APS, éste ha sido utilizado como un aditivo capaz de estabilizar selectivamente el polimorfo metaestable de aragonita, como un agente capaz de mejorar las interacciones entre interfaces orgánicas e inorgánicas lo cual es ideal para la construcción de nanopartículas ensambladas con arquitectura compleja (Zhang *et al.*, 2006; Cölfen, 2008) y como agente activo en la velocidad de nucleación de cristales de CaCO₃ y fosfato de calcio (Ball *et al.*, 2006).

El uso del polímero APS en nuestros ensayos de cristalización de CaCO₃ mostró una tendencia similar a la formación de aragonita como se ha reportado en literatura. La figura 20 A y B muestra las imágenes SEM de los cristales de CaCO₃ obtenidos en presencia del polímero APS en el micropocillo en el ensayo N° 6, lo que concuerda con los cristales de aragonita reportado por Arias y Fernández (2003), y con los estudios de Zhang *et al.* (2006) y Cölfen (2008) en relación a la capacidad del APS en estabilizar el polimorfo de aragonita. Por otro lado, cristales espiculados características del polimorfo de aragonita (Fig. 36E) similares a lo obtenido por de Zeshan Hu *et al.* (2008) en presencia de magnesio fueron encontrados cuando el polímero APS fue utilizado en presencia del sustrato esponja. Sin embargo, esto no fue una tendencia en el resto de las muestras en las cuales el APS fue usado como aditivo, este hallazgo experimental sugiere que el efecto formador de aragonita descrito para APS, puede estar influenciado por la presencia que producen los otros polímeros usados y/o el sustrato gastrogel.

Con respecto a los cristales de CaCO_3 obtenidos en el fondo de los micropocillos usando el polímero APS (Figuras. 30 A y B; 36 A y B; 42 A y B; 48 A y B) se puede apreciar una similitud en la morfología de los cristales de vaterita y en la coalescencia entre las pequeñas esferas, las que forman estructuras más grandes e irregulares, a lo reportado por Roqué *et al.* (2004) quien también ocupó APS.

Finalmente del análisis morfológico de los cristales de CaCO_3 obtenidos en presencia del APS la tendencia fue observar depósitos cristalinos de formas amorfas atribuibles más al efecto de los respectivos sustratos que al APS con la excepción ya mencionada del sustrato esponja en el ensayo N° 14 (Fig. 36E) en la cual se encontraron espículas concordantes con cristales de aragonita.

El tercer polímero utilizado fue el AF, el cual mostró mediante SEM resultados que concuerdan con estudios previos reportados por Xu (2006), quien lo utilizó como un agente inductor de nanopartículas de CaCO_3 estabilizadas por AF.

El uso del polímero AF en nuestros ensayos de cristalización de CaCO_3 mostró similares resultados en relación a la capacidad de actuar como un precursor de mineralización desde estados amorfos de CaCO_3 , aunque se presentan casos con morfologías que claramente no se asemejan a CCA pero que podrían ser explicados por la presencia de terceros componentes usados como aditivos en dichas muestras.

La figura 22 A y B muestra las imágenes SEM de los cristales de CaCO_3 obtenidos en presencia del polímero AF como único aditivo en el micropocillo en el ensayo N° 7, en la cual podemos observar una morfología irregular de los cristales de CaCO_3 . A pesar de no poseer una forma definida reconocible si es posible distinguir fases cristalinas 104 de calcita en combinación con otros polimorfos del CaCO_3 (Fig. 22B) Estas formas fueron encontradas en diferentes ensayos en los cuales estaba presente el ácido fítico (micropocillos de ensayos N° 7, 12 y 15). Además se pudo observar una tendencia en las muestras que tenían AF y esponja o gastrogel como sustrato (Figuras 32 C y C; 38 C; 44 A y B; 50 C y D), a la formación de material amorfo sobre el sustrato comparable al CCA estable fabricado en medio de etanol obtenido por Hyun Sook Lee (2005). También se pudo observar en las imágenes de

SEM en el micropocillo en el ensayo N° 12 (Fig. 32 A y B), la aglomeración de cristales de CaCO_3 pequeños romboédricos y otros esféricos, obtenidos en presencia del polímero AF con el sustrato esponja. Estos son similares a los cristales de calcita y vaterita encontrados en lo realizado por Ouhenia (2008) quien ocupó polímeros moduladores de la formación de distintos estadios de CaCO_3 . También se observó la presencia de cristales prismáticos (Fig. 32B), presumiblemente de aragonita, orientados alrededor de los cristales de vateritas, ellos también fueron reportados por Zeshan Hu (2008) en ensayos en presencia de magnesio. Finalmente, en los ensayos N° 15 y N° 18 cuando el sustrato esponja fue usado en conjunto con AF y PG-FS (Fig. 38D) o AF y PG-FI (Fig. 44 C, D, d, E y e) se observan cristales de CaCO_3 con una morfología muy particular correspondientes a formaciones triangulares espiculadas y dentadas. Esto es similar a los cristales de calcita y aragonita reportados por Krishna (2005) quien trabajó con polímeros y copolímeros derivados de acrilamida funcionalizada con grupos sulfónicos (Acrylamido methyl propane sulphonic acid (AMPS)) y específicamente con el poly (acrylamide-co-acrylamido-2-methyl-1-propane sodium sulfonate co-vinyl alcohol) [poly (AM-NaAMPS-VA) usando miniemulsión como sistema de mineralización. La formas cristalinas observadas en nuestros ensayos con respecto a este polímero se correlaciona con lo reportado por Xu *et al.* 2006, en cuanto a la formación de precursores amorfos y además concuerdan con las muestras que además contenían esponja y PG-FS o PG-FI.

Con respecto a los cristales de CaCO_3 obtenidos en los ensayos de mineralización en presencia sólo de las PG-FS y PG-FI (Figuras 14 A y B; 16 A y B respectivamente), encontramos en ambos casos cristales de aragonita similares a los reportados por Arias y Fernández (2003), quienes trabajaron en ensayos de mineralización usando proteínas solubles extraídas de nácar de conchas de moluscos. Es importante destacar que la diferencia que se observó entre la PG-FS y PG-FI en nuestros ensayos fue la aparición de cristales similares a calcita con la fracción PG-FS (Fig. 14A) y formas cristalinas similares a vaterita con la PG-FI (Fig. 16B), ambos cristales pueden compararse a los cristales observados por Ouhenia (2008).

En las imágenes de SEM de los cristales de CaCO_3 obtenidos en presencia de las fracciones orgánicas PG-FS (Fig. 24) y PG-FI (Fig. 26) en presencia del sustrato esponja en los ensayos N° 8 y N° 9 respectivamente, se observan estructuras cristalinas similares en los fondos de los micropocillos entre muestras (Figuras 24 A y B; 26 A y B), y diferencias sobre las superficies de los sustratos esponjas respectivas (Fig. 24 C y D; 26 C y D). Cristales de CaCO_3 con similares morfología a los obtenidos en estos ensayos han sido reportados por diferentes autores como por ejemplo, cristales de vaterita reportados por Ouhenia (2008) y cristales de calcita obtenidos por Arias (2003 y 2004) y Altay (2005). En el caso de Arias, los cristales de calcita fueron obtenidos usando proteínas solubles de la capa prismática de la concha de moluscos y en el de Altay los cristales fueron obtenidos en ensayos de cristalización en presencia de EDTA. La morfología de los cristales que fueron diferentes entre las PG-FS e PG-FI depositados sobre la superficie de las esponjas, se observó sólo la presencia de cristales romboédricos similares a los encontrados sobre el micropocillo en el ensayo con PG-FS (Fig. 24 C y D), mientras que con la PG-FI (26 C y D) se encontraron estructuras similares a las partículas de CCA estable obtenidas por An-Wu (2005).

Finalmente, de lo visto en las muestras obtenidas en presencia del sustrato esponja con las fracciones orgánicas PG-FS y PG-FI (ensayos N° 13, 14, 15, 16, 17 y 18) y en presencia de los polímeros comerciales (APA, APS o AF) como un tercer componente en los ensayos de mineralización (Figuras.34 A y B; 36 A y B; 38 A y B; 40 A y B; 42 A y B; 44 A y B), podemos mencionar una constante en el efecto de las moléculas orgánicas PGs en sus respectivas combinaciones ya sea con el APA y APS.

En el caso de PG-FS se pudo apreciar la formación de estructuras esféricas y elípticas definidas (Figuras 34 A y B; 36 A y B); mientras que en el caso de la PG-FI (Figuras 40 A y B; 42 A y B) se observó aglomeración de cristales esféricos con morfología similar a vaterita encontrada en presencia de APS reportado en los estudios de Roqué (2004).

Cuando el polímero AF fue usado con las distintas fracciones de PG-FS y PG-FI (Figuras. 38 A y B; 44 A y B) su efecto fue parcial debido a que se vieron estructuras

similares a las que se presentaron en muestras con AF como único aditivo y además se observaron estructuras dentadas con morfologías definidas similares a calcita y aragonita observados por Ouhenia (2008) atribuibles al efecto de los PGs como aditivos o a la combinación de los efectos de PGs, esponja y AF (ensayo N° 12. Fig. 32 A y B).

CONCLUSIONES

- Los sustratos esponja y gastrogel cuando fueron usados en ausencia de aditivos en los ensayos de mineralización de CaCO_3 mostraron una clara tendencia a la formación de estructuras amorfas.
- El sustrato esponja mostró ejercer un efecto modulador mecánico de la forma en cómo se depositan los cristales de CaCO_3 , al servir como contenedor y a la vez modificar su forma debido al depósito de CaCO_3 .
- Con el uso de APA como único aditivo se observó la formación de estructuras cristalinas con morfologías esféricas mediante SEM y se determinaron estructuras cristalinas del tipo aragonita y calcita mediante XRD. Se pudo apreciar una tendencia a la formación de estructuras similares al polimorfo de vaterita mediante SEM, los resultados de XRD no son definitivos ya que debido al tipo de muestras no se puede asegurar que no exista vaterita si es que no aparece el pico cristalino más intenso.
- Con el uso de APS como único aditivo se observó la formación de estructuras cristalinas con morfologías espiculadas y con aristas marcadas mediante SEM, y se determinaron estructuras cristalinas del tipo aragonita, calcita y vaterita mediante XRD. Se pudo apreciar una tendencia a la formación de estructuras morfológicas similares al polimorfo de aragonita.
- Con el uso de AF como único aditivo se observó la formación de cristales con morfologías amorfas mediante SEM y se determinaron los polimorfos aragonita, calcita y vaterita mediante XRD. Sin embargo, cuando el AF se utilizó en presencia de otros aditivos o sustratos en los diferentes ensayos de cristalización de CaCO_3 se obtuvieron cristales con morfología espiculadas, esféricas, romboédricas, etc.
- Con el uso PG-FS como único aditivo se obtuvieron cristales de CaCO_3 con morfología semejantes a los polimorfos de aragonita y calcita reportados en

ausencia de aditivos y se determinaron estructuras cristalinas del tipo aragonita, calcita y vaterita mediante XRD.

- Con el uso PG-FI como único aditivo se obtuvieron cristales de CaCO_3 con morfología similar a los polimorfos de aragonita y vaterita mediante SEM y se determinaron estructuras cristalinas del tipo aragonita, calcita y vaterita mediante XRD.
- En algunos ensayos de cristalización de CaCO_3 el proceso de difusión de moléculas orgánicas desde los sustratos (esponja o gastrogel) hacia el micropocillo tuvo lugar permitiendo la formación de cristales de morfología similares sobre el sustrato y sobre el fondo del micropocillo.
- Se confirman que los distintos aditivos y sustratos al estar presentes en un sistema de cristalización cumplen un rol morfológico determinante y determinan la estructura cristalina de los productos resultantes de la mineralización. Además estos aditivos y sustratos pueden interactuar y formar cristales con morfología y control polimórfico diferente a los esperados y reportado en la literatura.
- Finalmente, se concluye que es importante seguir investigando el efecto de estos aditivos en combinación con sustratos de origen biológicos en ensayos de cristalización biomimética del CaCO_3 con variables experimentales controladas, con el fin de aumentar el conocimiento sobre los mecanismo moleculares por los cuales moléculas biológicas controlan la nucleación y orientación cristalográficas de materiales inorgánico y así crear nuevos materiales híbridos y permitir generar nuevas tecnologías en beneficio del ser humano.

BIBLIOGRAFÍA

- **ADDADI, L.; MORADIAN, J.; SHAY, E.; MAROUDAS, N. G.; WEINER, S. 1987.** A chemical model for the cooperation of sulfates and carboxylates in calcite crystal nucleation: Relevance to biomineralization. *Biophysics*, 84: 2732-2736.
- **ADDADI, L.; RAZ, S.; WEINER, S. 2003.** Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralization. *Adv. Mater.*, Vol. 15, No. 12: 959 - 970.
- **AIZENBERG, J. 2000.** Patterned crystallization of calcite in vivo and in vitro. *J. Cryst. Growth*. 211: 143-148.
- **ALTAY, E.; SHAHWAN, T.; TANOĞLU, M. 2007.** Morphosynthesis of CaCO_3 at different reaction temperatures and the effects of PDDA, CTAB, EDTA on the particles morphology and polymorph stability. *Powder Technol.* 178: 194-202.
- **AN-WU, XU.; QIU, YU.; WEN-FEI, DONG.; ANTONIETTI, M.; CÖLFEN, H. 2005.** Stable Amorphous CaCO_3 Microparticles with Hollow Spherical Superstructures Stabilized by Phytic Acid. *Adv. Mater.* 2005, 17: 2217-2221.
- **ARIAS, J. L.; FERNANDEZ, M. S. 2003.** Biomimetic processes through the study of mineralized shells. *Mater. Charact.* 50: 189-195.
- **ARIAS, J. L.; NEIRA-CARILLO, A.; ARIAS, J. I.; ESCOBAR, C.; DAVID, M.; FERNANDEZ, M. S. 2004.** Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering. *J. Mater. Chem.* 14. 2154-2160.

- **BALL, V.; MICHEL, M.; BOULMEDAIS, F.; HEMMERLE, J. ; HAIKEL, Y. ; SCHAFF, P. ; VOEGEL, J. C. 2006.** Nucleation kinetics of calcium phosphates on polyelectrolyte multilayers displaying internal secondary structure. *Cryst. Growth Des.* Vol. 6, No. 1, 327-334.

- **CARREÑO, E. 2004.** Efecto de un derivado de silicona sobre la cristalización de CaCO_3 in vitro. Memoria de título. Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile.

- **CARRINO, D. 2005.** Apunte Docente Curso de Postgrado. Aislamiento, caracterización y función de macromoléculas sulfatadas de biocerámicas naturales. CIMAT. Santiago, Chile.

- **CÖLFEN, H. 2008.** Single crystals with complex form via amorphous precursors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008. 47: 2351-2353.

- **CÖLFEN, H.; ANTONIETTI, M. 1998.** Crystal design of calcium carbonate microparticles using double-hydrophilic block copolymers. *Langmuir*, 14: 582-589.

- **CÖLFEN, H.; QI, L. M. 2001.** A systematic examination of the morphogenesis of calcium carbonate in the presence of a double-hydrophilic block copolymer. *Chem.Eur. J.* 7: 106-116

- **DEMADIS, K.; NEOFOTISTOU, E. 2007.** Synergistic effects of combinations of cationic polyaminoamide dendrimers/anionic polyelectrolytes on amorphous silica formation: A bioinspired approach. *Chem. Mater.* 19: 581-587.

- **DOMINGUEZ-VERA, J. M.; GAUTRON, J.; GARCÍA-RUÍZ, J. M.; NYS, Y. 1999.** The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals. *Poult. Sci.* Vol. 79: 901 - 907.

- **FERNÁNDEZ, M. S.; MOYA, A.; LÓPEZ, L.; ARIAS, J. L. 2001.** Secretion pattern, ultrastructural localization, and function of extracellular matrix molecules involved in egg shell formation. *Matrix Biol.* 19: 793-803.

- **GORMA, K.; HUND, M.; VUČAK, M.; GRÖHN, F.; WEGNER, G. 2007.** Amorphous calcium carbonate in form of spherical nanosized particles and its application as fillers for polymers. *Mater. Sci. Eng.* 477: 217-225.

- **GOWER, L. B.; ODOM, D. J. 2000.** Deposition of calcium carbonate films by a polymer-induced liquid precursor (PILP) process. *J. Cryst. Growth.* 210: 719-734.

- **GRASSMANN, O.; LÖBMANN, P. 2004.** Biomimetic nucleation and growth of CaCO₃ in hydrogels incorporating carboxylate groups. University of Würzburg, Röntgenring 11, Würzburg dD-97070, Germany. *Biomaterials* 25: 277-82.

- **GREENAWAY, P. 1985.** Calcium balance and moulting in land crabs. *J. Crust. Biol.* Vol. 13: 191-197.

- **GREEN, D.; WALSH, D.; YANG, X.; MANN, S.; OREFFO, R. 2004.** Stimulation of human bone marrow stromal cells using growth factor encapsulated calcium carbonate porous microspheres. *J. Mater. Chem.* Vol. 14: 2206 - 2212.

- **GUAN, Z.; ROLAND, J. T.; BAI, J. Z.; MA, S. X. ; McINTIRE, T. M. ; NGUYEN, M. 2004.** Modular domain structure: A biomimetic strategy for advanced polymeric materials. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 2058-2065.

- **HECKER, A.; TESTENIÈRE, O.; MARIN, F.; LUQUET, G. 2003.** Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures. FEBS Lett. Vol. 535: 49 - 54.

- **HEUER, A. H.; FINK, D. J.; LARAIA, V.J.; ARIAS, J. L.; CALVERT, P. D.; KENDALL , K.; MESSING, G. L.; BACKWELL, J.; RIEKE, P. C.; THOMPSON, D. H.; WHEELER, A. P.; VEIS, A.; CAPLAN, A. I. 1992.** Innovative materials processing strategies: A biomimetic approach. Science. 255:1098-1105.

- **HU, Z.; SHAO, M.; CAI, Q.; DING, S.; ZHONG, C.; WEI, X.; DENG, Y. 2008.** Synthesis of needle-like aragonite from limestone in the presence of magnesium chloride. J. Mater. Process Technol.

- **HUXLEY, T. H. 1880.** The crayfish, an introduction to the study of zoology. V. XXVIII of the International Scientific Series. Appleton and Company, New York, USA (Reprinted 1973, 1974, 1977, M.I.T. Press, Cambridge, MA, USA). 371p.

- **IOWA STATE UNIVERSITY. 2009.** Welcome to the World of Scanning Electron Microscopy. [en línea]. < <http://mse.iastate.edu/microscopy/home.html> > [consulta : 06-05- 2009]

- **KATO, T. 2000.** Polymer/Calcium carbonate layered Thin-film composites. Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8656 (Japan). Adv. Mater 12: 1543-1546.

- **KOGA, N.; NAKAGOE, Y.; TANAKA, H. 1998.** Crystallization of amorphous calcium carbonate. *Thermochim. Acta* 318: 239-244.
- **KRISHNA, R. 2005.** Synthesis and Characterization of Polymer-Mediated Biomimetic Calcium Carbonate Materials. Doctor Degree Dr. rer. nat. To the Faculty of Natural Sciences requirement dissertation. Ulm University, Germany.
- **LEE, H. S.; HA, T. H.; KIM, K. 2005.** Fabrication of unusually stable amorphous calcium carbonate in a ethanol médium. *Mater. Chem. Phys.* 93: 376-382.
- **LOWENSTAM, H. A.; WEINER, S. 1989.** *On Biomineralization*, Oxford, UK: Oxford University Press, New York, 324 pp
- **MORNET, S.; VASSEUR, S.; GRASSET, F.; DUGUET, E. 2004.** Magnetic nanoparticle design for medical diagnosis and therapy. *J. Mater. Chem.* Vol. 14: 2161 - 2175.
- **NAVARRETE, M. J. 2004.** Caracterización de algunas macromoléculas involucradas en la mineralización de gastrolitos de la langosta tenaza roja, *Cherax quadricarinatus* (von Martens, 1868). Memoria de título. Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile.
- **NEIRA-CARRILLO, A.; ACEVEDO, D.; MIRAS, M.; BARBERO, C.; GEBAUER, D.; CÖLFEN, H.; ARIAS, J. L. 2008.** Influence of conducting polymers based on carboxylated polyaniline on *in vitro* CaCO₃ Crystallization. *Langmuir.* 24: 12496-12507.
- **NEIRA-CARRILLO, A.; PAI, R. K; FERNANDEZ, M. S.; CARREÑO, E.; VAZQUEZ, P; ARIAS, J. L. 2009.** Synthesis and characterization of sulfonated

polymethylsiloxane polymer as template for crystal growth of CaCO₃. Colloid. Polym. Sci. 287, 385-393.

- **NEIRA-CARRILLO, A.; YAZDANI-PEDRAM, M.; RETUERT, J.; DIAZ-BOSQUE, M.; GALLOIS, S.; ARIAS, J. L. 2005.** Selective crystallization of calcium salts by poly(acrylate)-grafted chitosan. J. Colloid Interface Sci. 286: 134-141.
- **NUMONOI, H. 1939.** Behavior of blood calcium in the formation of gastrolith in some decapod crustaceans. The Japanese Journal of Zoology. Vol 8: 357-363.
- **OUHENIA, S.; CHATEIGNER, D.; BELKHIR, M. A.; GUILMEAU, E. ; KRAUSS, C. 2008.** Synthesis of calcium carbonate polymorphs in the presence of polyacrylic acid. J. Cryst. Growth. 310: 2832-2841.
- **PAYNE, S. R.; HEPPENSTALL-BUTLER, M.; BUTLER, M. F. 2007.** Formation of thin calcium carbonate films on chitosan biopolymer substrates. Cryst. Growth Des. Vol. 7: 1262 - 1276.
- **RODRIGUEZ, J. UNIVERSIDAD DE CERVERA. 2008.** [en línea]. <http://www.unedcervera.com/c3900038/ciencia_materiales/indices_miller.html> [consulta: 20-01- 2009]
- **ROQUÉ, J.; MOLERA, J.; VENDRELL-SAZ, M.; SALVADÓ, N. 2004.** Cristal size distributions of induced calcium carbonate crystals in polyaspartic acid and *Mytilus edulis* acidic organic proteins aqueous solutions. J. Cryst. Growth. 262: 543-553.

- **SIMKISS, K.; WILBUR, K. M. 1989.** Biomineralization cell biology and mineral disposition. Academic Press. San Diego, USA. 337 pp.
- **TAI, C. Y.; CHEN, F. B. 1998.** Polymorphism of CaCO₃ precipitated in a constant-composition environment. Am. Inst. Chem. Engin. J. 44:1790-1799.
- **TESTENIÈRE, O.; HECKER, A.; LE GURUN, S.; QUENNEDEY, B.; GRAF, F.; LUQUET, G. 2002.** Characterization and spatiotemporal expression of orchestin, a gene encoding an ecdysone-inducible protein from a crustacean organic matrix. Biochem. J. Vol. 361: 327 - 335.
- **UNIVERSITY OF CAMBRIDGE 2007.** DoITPoMS, Department of Materials Science and Metallurgy.[en línea]. < <http://www.doitpoms.ac.uk/tlplib/xray-diffraction/index.php> > [consulta : 06-05- 2009]
- **WEGNER, G. 2000.** Functional polymers. Acta mater. 48: 253-262.
- **WEISSBUCH, I.; ADDADI, L.; LAHAV, M.; LEISEROWITZ, L. 1991.** Molecular recognition at crystal interfaces. Science, 253: 637- 645.
- **XU, A. W.; YU, Q.; DONG, W-F.; ANTONIETTI, M.; CÖLFEN, H. 2005.** Stable Amorphous CaCO₃ Microparticles with Hollow Spherical Superstructures Stabilized by Phytic Acid. Adv. Mater. Vol. 17: 2221 - 2224.
- **XU, A. W.; YURONG, M. A.; CÖLFEN, H. 2006.** Biomimetic mineralization. J. Mater. Chem. Vol. 17: 415 - 449.

- **XU, X.; CAI, A.; LIU, R.; PAN, H. ; TANG, R. ; CHO, K. 2008.** The roles of water and polyelectrolytes in the phase transformation of amorphous calcium carbonate. *J. Cryst. Growth.* 310: 3779-3787.

- **YU, J. ; LEI, M.; CHENG, B.; ZHAO, X. 2004.** Effects of PAA additive and temperature on morphology of calcium carbonate particles. *J. Solid. State Chem.* 177: 681-689.

- **ZHANG, Z.; GAO, D.; ZHAO, H.; GUAN, G.; WANG, D.; YU, S. H. 2006.** Biomimetic assembly of polypeptide-stabilized CaCO₃ nanoparticles. *Materials*, University of Science and Technology of China, Hefei, Anhui 230026, P.R. China.

APÉNDICES

1. Índice de Abreviaciones

AF	Ácido fítico
APS	Ácido poliaspártico
APA	Ácido poliacrílico
Ca ²⁺	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CaCO ₃	Carbonato de calcio
CCA	Carbonato de calcio amorfo
CO ₂	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
FS	Fracción soluble
FI	Fracción insoluble
FTIR	Espectroscopía de infrarroja
NEM	N-Etilmaleimida
PGs	Proteoglicanos
PG-FS	Proteoglicanos de fracción soluble
PG-FI	Proteoglicanos de fracción insoluble
PMSF	Fluoruro de metil fenil sulfónico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
XPS	Espectroscopía fotoelectrónica de rayos X
XRD	Difracción de rayos X

2. Índice de Tablas

Tabla 1.	Combinatorias de fracciones y polímeros comerciales usados en los procesos de cristalización de CaCO_3 <i>in vitro</i> .	31
-----------------	---	----

3. Índice de Figuras

Figura 1.	Estructura química del ácido fólico (AF).	18
Figura 2.	Estructura química del ácido poliaspártico (APS).	19
Figura 3.	Estructura química del ácido poliacrílico (APA).	20
Figura 4.	Procedimiento de extracción y purificación de FS y FI y de las moléculas orgánicas PGs extraídas desde gastrolitos.	23
Figura 5.	Cámara experimental para la cristalización <i>in vitro</i> de CaCO_3 mediante difusión de gases.	31
Figura 6.	Imágenes SEM de los polimorfos de CaCO_3 (Neira-Carrillo, A. <i>et al.</i> , 2007).	32
Figura 7.	Difractograma de XRD de los tres polimorfos del cristal de CaCO_3 .	34
Figura 8.	Imagen SEM de los sustratos esponja y gastrogel.	37

Figura 9.	Difragtograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 1.	38
Figura 10.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 1.	39
Figura 11.	Difragtograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 2.	40
Figura 12.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo (A, a y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) usando el ensayo N° 2.	41
Figura 13.	Difragtograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 3.	42
Figura 14.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 3.	43
Figura 15.	Difragtograma XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos usando el ensayo N° 4.	44
Figura 16.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO_3 obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 4.	45
Figura 17.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 5.	46

Figura 18.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 5.	47
Figura 19.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 6.	48
Figura 20.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 6.	49
Figura 21.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 7.	50
Figura 22.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo usando el ensayo N° 7.	51
Figura 23.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 8.	52
Figura 24.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 8.	53
Figura 25:	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 9.	54
Figura 26.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja en el ensayo N° 9.	55

Figura 27.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 10.	56
Figura 28.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 10.	57
Figura 29.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 11.	58
Figura 30.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C, D y E) en el ensayo N° 11.	60
Figura 31.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 12.	61
Figura 32.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 12.	62
Figura 33.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 13.	63
Figura 34.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 13.	65

Figura 35.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 14.	66
Figura 36.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C, D y E) en el ensayo N° 14.	68
Figura 37.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 15.	69
Figura 38.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 15.	70
Figura 39.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 16.	71
Figura 40.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 16.	73
Figura 41.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 17.	74
Figura 42.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C y D) en el ensayo N° 17.	75

Figura 43.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 18.	76
Figura 44.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato esponja (C, D, d, E y e) en el ensayo N° 18.	78
Figura 45.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 19.	79
Figura 46.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato gastrogel (C y D) en el ensayo N° 19.	81
Figura 47.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 20.	82
Figura 48.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato gastrogel (C y D) en el ensayo N° 20.	83
Figura 49.	Difragtograma XRD de los cristales obtenidos usando el ensayo N° 21.	84
Figura 50.	Imagen de SEM que muestra los cristales de CaCO ₃ obtenidos del fondo del micropocillo (A y B) y sobre el sustrato gastrogel (C y D) en el ensayo N° 21.	85