



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



**“EFECTO DE QUITOSANO SULFONADO SOBRE LA
CRISTALIZACIÓN HETEROGÉNEA DE CARBONATO DE
CALCIO *IN VITRO*”**

JUAN CARLOS DEVIA MATTA

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

PROFESOR GUÍA: JOSE LUIS ARIAS

**SANTIAGO, CHILE
2014**



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



**“EFECTO DE QUITOSANO SULFONADO SOBRE LA
CRISTALIZACIÓN HETEROGÉNEA DE CARBONATO DE
CALCIO *IN VITRO*”**

JUAN CARLOS DEVIA MATTA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: JOSE LUIS ARIAS
PROFESOR CONSEJERO: ANDRÓNICO NEIRA- CARRILLO
PROFESOR CONSEJERO: MARIA SOLEDAD FERNANDEZ

SANTIAGO, CHILE
2014

Memoria de Título

**“EFECTO DE QUITOSANO SULFONADO SOBRE LA CRISTALIZACIÓN
HETEROGÉNEA DE CARBONATO DE CALCIO *IN VITRO*”**

**“EFFECT OF SULPHATED CHITOSAN ON THE HETEROGENEOUS
CRYSTALLIZATION OF CALCIUM CARBONATE *IN VITRO*”**

Juan Carlos Devia Matta

Laboratorio de Materiales Bio-relacionados (CIMAT) y de Síntesis y Caracterización de Polímeros Funcionalizados y de Biomoléculas (Polyforms), Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. Financiamiento **FONDECYT Nº 1110194**

Resumen

En el presente trabajo se estudió la influencia que ejerce un soporte polimérico en base a quitosano (Qo) sulfonado en ensayos de cristalización heterogénea *in vitro* de carbonato de calcio (CaCO_3) usando la técnica de difusión de gases. Para ello primeramente se elaboró un soporte de Qo sulfonado y se realizaron cuatro tratamientos de cristalización. Dos de ellos fueron ensayos control (1 y 2) y dos fueron ensayos que utilizaron soportes poliméricos, film de Qo puro (3) y un soporte de Qo sulfonado (4). El ensayo 4 fue el único que utilizó una superficie funcionalizada y sobre la cual se formaron cristales de CaCO_3 . Los cristales de CaCO_3 obtenidos fueron caracterizados mediante las técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), espectroscopía Raman e Infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y con difracción de rayos x (XRD). Los resultados morfológicos mediante SEM de los cristales depositados sobre el soporte de Qo sulfonado mostraron una morfología romboédrica concordante con calcita. Los resultados obtenidos mediante Raman y FTIR comprobaron la naturaleza físico química tanto de soporte utilizado como del material cristalino obtenido. Así, Raman mostró la presencia de Qo sulfonado y cristales con ciertos patrones del polimorfo de calcita. FTIR por su parte permitió caracterizar el soporte y reafirmar el polimorfismo de estos cristales. La técnica XRD corroboró la naturaleza del polimorfo de calcita.

En resumen, de acuerdo a los resultados obtenidos en esta Memoria de Título se concluye que Qo sulfonado como soporte en un ensayo de cristalización heterogénea de CaCO_3 actúa como una superficie efectiva para el control de la nucleación y crecimiento de cristales, haciendo de este modelo de cristalización un modelo muy simplificado y una aproximación más plausible a las condiciones biomiméticas en que ocurre el fenómeno de mineralización biológica.

Palabras claves

Quitosano, sulfatación, cristalización heterogénea, cristalización *in vitro*, calcita, polimorfismo.

Abstract

In this work was studied the influence of a polymeric support based on sulfated chitosan (Qo) in heterogeneous *in vitro* crystallization assays of calcium carbonate (CaCO_3) using the gas diffusion technique. For that, we primarily elaborated a sulfated Qo support and four crystallization assays were performed. Two of these assays were controls (1 and 2) and two were trials utilizing polymeric supports, pure Qo films (3) and a sulfated Qo support (4). The assay of 4 was the only one to use a functionalized surface on which CaCO_3 crystals were formed. CaCO_3 crystals obtained were characterized by using scanning electron microscopy (SEM), Raman Spectroscopy and Fourier Transform Infrared (FTIR) and x-ray diffraction (XRD) techniques. Morphological results by SEM of the deposited crystals on the sulfated Qo support showed a rhombohedral morphology concordant to calcite. The results obtained by Raman and FTIR verified the physicochemical nature of both utilized materials support and the crystalline deposit. Thus Raman showed the presence of sulfated Qo and crystals with certain patterns of calcite polymorph. FTIR allowed us to characterize the support and reaffirm the polymorphism of these crystals. The XRD technique confirmed the nature of the calcite polymorph.

In summary, according to the results obtained in this Memory we concludes that sulphated Qo as support in heterogeneous crystallization assay of CaCO_3 acts as an effective surface for the control of the nucleation and crystal growth, making this model of crystallization a very simplified model and a more plausible approach to biomimetic conditions in which the phenomenon of biological mineralization occurs.

Keywords

Chitosan, sulfation heterogeneous crystallization, *in vitro* crystallization, calcite, polymorphisms.

INTRODUCCIÓN

La biomineralización es un proceso que involucra la formación de cristales inorgánicos llevado a cabo por los organismos vivos. Este proceso representa un evento esencial y saludable en plantas y animales, que da origen a la formación de estructuras con funciones complejas y variadas tales como conchas, huesos y dientes (Estroff, 2008). La biomineralización involucra la participación de macromoléculas y minerales secretadas por parte de células especializadas, que se precipitan y ordenan según un plan de construcción definido, otorgando a los seres vivos que los generan mecanismos de defensa, alimentación y soporte.

En el proceso de biomineralización se reconocen dos componentes, uno inorgánico como sales de calcio, fosfatos, oxalatos o carbonatos y un componente orgánico formado por proteínas, polisacáridos o lípidos (Heuer *et al*, 1992). En la actualidad es plenamente aceptado que la fase (matriz) orgánica ejerce un control selectivo sobre la nucleación, crecimiento y orientación cristalina del material inorgánico, sin desconocer la influencia que variables como el pH, sobresaturación, confinamiento y la temperatura tienen sobre este fenómeno (Lowenstam y Weiner, 1989). Sin embargo el mecanismo preciso involucrado en el control de la nucleación, crecimiento cristalino, y la disposición cristalográfica aún no es del todo claro.

Es en la búsqueda de un mayor y mejor conocimiento de este fenómeno es que se han planteado diversos enfoques de

estudio tales como: caracterización de las estructuras biomineralizadas, caracterización del proceso de ensamblaje durante el desarrollo biológico de tales estructuras, caracterización de procesos de reparación de estructuras biomineralizadas. Adicionalmente, un nuevo enfoque que se ha mostrado como más promisorio, es el uso de polímeros sintéticos modificados con grupos químicos ácidos conocidos en estructura y localización, lo que permite correlacionar la influencia de estos grupos aniónicos con su capacidad de controlar la nucleación, el crecimiento y la morfología de los cristales inorgánicos.

El estudio y desarrollo del fenómeno de biomineralización, como de los materiales derivados de ella, ha generado conocimiento que ha contribuido al desarrollo en el área de la biomimética, disciplina que busca por medio de la imitación de procesos biológicos lograr obtener biomateriales eficientes y con propiedades físicas y químicas optimizadas (Aizenberg, 2004). Así las vías biológicas de estructuración de los biominerales se han convertido en un enfoque importante para la síntesis de nuevos materiales.

Uno de los sistemas de cristalización más ampliamente estudiados en condiciones de laboratorio es la cristalización de carbonato de calcio (CaCO_3). El CaCO_3 es un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza y fundamental en la constitución de formas vivientes, además de ser muy utilizado en la industria química. Sus principales formas cristalinas corresponden a los polimorfos tales como: calcita, aragonita y vaterita. La

morfología de estos polímeros puede ser alterada al precipitar, modificando variables tales como el pH de la solución, temperatura, concentración de los reactantes, sobresaturación, fuerza iónica, tipo y concentración de aditivos (Tai y Chen, 1998). Es en la búsqueda de nuevos materiales que diversos aditivos han sido estudiados para determinar su influencia sobre la precipitación de CaCO_3 . En las últimas décadas el interés por conocer y desarrollar nuevos polímeros sintéticos ha llevado a la obtención de compuestos con las más variadas propiedades y aplicaciones (Abarrategui, 2008). Los materiales poliméricos pueden ser clasificados como naturales, artificiales o sintéticos.

Con relación a los polímeros naturales, la quitina poli (β (1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D glucosa), representa el segundo biopolímero más abundante en los organismos vivos después de la celulosa. La quitina se encuentra formando parte de conchas de crustáceos, el exoesqueleto de insectos y crustáceos, además de formar parte de las paredes celulares de muchos hongos, levaduras y algas. Sin embargo, su rol en la mineralización es pasivo ya que participa en los procesos de biomineralización gracias a su asociación con otras macromoléculas como proteínas y proteoglicanos (Arias y Fernández, 2008). La quitina es altamente insoluble en agua por lo que se ha preferido usar su derivado desacetilado, el quitosano. El quitosano (Qo) se obtiene mediante la desacetilación alcalina de la quitina, dando lugar a un polímero lineal más soluble y biodegradable formado por sus unidades monoméricas D-glucosamina

desacetiladas y N-acetil-D-glucosamina distribuidas al azar.

El Qo debido a sus características de biodegradación y biocompatibilidad, ha sido intensamente estudiado para diferentes aplicaciones médicas. Es así como se han obtenido Qo modificados con diferentes grupos funcionales y que utilizados como aditivos en fenómenos de cristalizaciones de sales inorgánicas han mostrado propiedades de gran importancia sobre todo en el área médico farmacéutica.

Se sabe que la influencia de la matriz orgánica, en base de quitina, en la biomineralización se relaciona con diferentes macromoléculas biológicas como: proteínas, proteoglicanos asociadas a ésta, lo que resulta en la modificación morfológica de los biomateriales (Arias *et al.*, 2002). La presencia y distribución de ciertos grupos funcionales como: fosfato, carboxilato o sulfato en estas macromoléculas es la responsable de generar las modificaciones más evidentes de los materiales cristalinos (Grassmann y Lobmann, 2004; Neira-Carrillo *et al.*, 2010). Si estos grupos y su distribución es efectivamente responsable de controlar la nucleación, crecimiento y orientación cristalográfica de la fase inorgánica, entonces su acoplamiento específico sobre la superficie de quitina podrá controlar la textura cristalina obtenida. Por lo tanto, la oportunidad de evaluar el efecto de un polímero natural modificado con grupos químicos activos evitando la necesidad de utilizar biomoléculas en base a proteínas y polisacáridos, serviría como un modelo simplificado y novedoso de utilizar, para comprender algunos de los procesos

moleculares involucrados en la biomineralización. Si bien existe evidencia de que sustancias sulfatadas generan cambios morfológicos en el CaCO_3 cuando actúan como aditivos en presencia de soluciones homogéneas de reactantes durante ensayos de la cristalización *in vitro* de CaCO_3 (Arias *et al.*, 2004), no existe evidencia de cómo se comportarían estas sustancias sulfatadas cuando son presentadas sobre superficies en un modelo de nucleación y crecimiento heterogéneo.

Creemos que este nuevo enfoque experimental permitiría acercarnos de mejor manera al entendimiento y de como ocurre el fenómeno de biomineralización en condiciones naturales.

Según lo expuesto y los antecedentes bibliográficos en esta Memoria de Título se evaluó el efecto de un Qo sulfonado presentado como soporte (film) usando un modelo simplificado de nucleación y crecimiento heterogéneo en ensayos *in vitro* de cristalización de CaCO_3 .

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

El quitosano (Qo) sulfonado usado fue un Qo comercial (Aldrich-Sigma) de bajo peso molecular (PM = 70 KDa) y grado de desacetilación $\geq 75\%$, el cual fue purificado mediante un protocolo establecido en el laboratorio CIMAT (Neira-Carrillo *et al.* 2005). Este Qo purificado se usó en la síntesis del Qo sulfonado mediante una reacción de sulfonación proceso realizado y corroborado por el laboratorio CIMAT de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. El Qo sulfonado utilizado era un polvo color ámbar. Otro material empleado fue un film de quitosano puro, igualmente obtenido con anterioridad en el laboratorio CIMAT.

Para los ensayos de cristalización de CaCO_3 *in vitro* se utilizaron los reactivos de cloruro de calcio (CaCl_2), bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) y la solución amortiguadora de Tris (hidroximetil)-aminometano ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$).

Métodos

Preparación del soporte de quitosano sulfonado.

La preparación del soporte de Qo sulfonado se realizó usando la técnica de evaporación del solvente para lo cual se disolvieron 25 ml de una solución de Qo sulfonado (80 mg) en ácido acético al 5% en una placa de Petri durante 24 horas, luego de lo cual fue secada en una estufa a 37 °C. La superficie de la placa en donde se formó un depósito uniforme de Qo sulfonado fue lavada con agua destilada para eliminar el exceso de sales depositadas sobre la superficie de Qo sulfonado adherida a la placa de Petri. La obtención del soporte de Qo sulfonado se logró con ayuda de una hoja de bisturí directamente desde la placa de Petri obteniendo delgadas láminas de poliestireno sobre las que se encuentra adherido el film Qo sulfonado. La decisión de usar esta metodología se tomó por la fragilidad y la difícil manipulación que presentó el films de Qo sulfonado por tanto al obtenerlo en conjunto con una lámina delgada de poliestireno de la propia placa de Petri donde se formó. Esto le permitió una mayor resistencia y capacidad para realizar convenientemente todos los procedimientos experimentales y técnicas analíticas.

Caracterización de las láminas con quitosano sulfonado.

Luego de formadas las láminas con Qo sulfonado mediante la técnica de evaporación del solvente, los aspectos morfológicos de éstas fueron estudiados mediante SEM y la formación del depósito de Qo sulfonado espectroscópicamente mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR).

Cristalización de carbonato de calcio (CaCO₃) *in vitro*.

Los ensayos de cristalización de CaCO₃ fueron realizados usando el método de difusión de gases, fenómeno que ocurre dentro de una cámara experimental que consiste en una cámara hermética. La cámara está compuesta por una placa de Petri de 85 mm de diámetro con un orificio central en la base de 8 mm. La placa de Petri se une en la parte inferior a un recipiente de 50 mm de diámetro y 30 mm de altura en donde se depositan 3 mL de una solución de bicarbonato de amonio (NH₄)HCO₃ 25 mM. Esta solución se descompone en amoníaco y dióxido de carbono, generando una atmósfera gaseosa de CO_{2(g)}. En la parte superior de la cámara se disponen los micropocillos, en estos se deposita un volumen de 35 µL de una solución de CaCl₂ 200 mM, el cual se encuentra tamponado a pH 9 usando una solución amortiguadora TRIS 0.2 M. El ion calcio

(Ca²⁺) que se presenta en el micropocillo reacciona con el CO_{2(g)} formando cristales de CaCO₃. Los ensayos de cristalización de CaCO₃ se realizaron a pH 9,0 y tuvieron una duración de 1 hora realizados a temperatura ambiente.

Se realizaron un total de cuatro tratamientos de cristalización de CaCO₃, es decir se dispusieron cuatro micropocillos por cada proceso de cristalización *in vitro*.

Durante el desarrollo experimental surgieron cuestionamientos sobre la disposición más adecuada que debería tener el soporte de Qo sulfonado dentro del micropocillo, considerando como principio que los cristales sobre esta superficie sean producto del efecto nucleador del soporte ofrecido y no el resultado de la formación de cristales en solución y posterior precipitación o adhesión al soporte. Luego de los resultados experimentales se consideró que la forma más práctica era utilizando una cinta adhesiva transparente a la cual se adhiere el soporte. Esta cinta se dispuso de forma longitudinal sobre el menisco que forma la solución de 35 µL de CaCl₂ asegurándose que el soporte esté en contacto directo con la solución y que la cinta no ocluya el orificio del micropocillo permitiendo la difusión del CO_{2(g)}.

Se realizaron cuatro tratamientos al unisonó, el primer ensayo (1) fue el experimento control, en el cual se depositó los 35 µL de CaCl₂ y permitió corroborar que el procedimiento de cristalización de CaCO₃ *in vitro* fuese correctamente realizado. En el segundo micropocillo (2) se dispuso sobre el menisco de 35 µL de CaCl₂ cinta

adhesiva transparente, este ensayo tuvo como propósito evaluar el posible efecto del material adhesivo en la formación de cristales y de corroborar que las dimensiones y disposición de la cinta no influyeran en la difusión de los gases al micropocillo, de esta forma este experimento también tiene carácter de ensayo control. En un tercer micropocillo (3), a la cinta adhesiva se le unió un trozo de film de Qo puro. El cuarto micropocillo (4) utilizó el soporte de Qo sulfonado.

Caracterización de los cristales de carbonato de calcio

Una vez transcurrido el tiempo del ensayo de cristalización, los cuatro micropocillos y las tres cintas adhesivas, fueron identificados y lavados en forma separada. El lavado se realizó con agua desionizada y posteriormente con etanol en concentraciones crecientes de 80%, 90% y 100%. Este procedimiento permitió evaluar tanto los cristales de CaCO_3 precipitados en el fondo de los micropocillo (1, 2, 3, 4) y determinar su eventual presencia en las superficies de 2, 3 y 4 usando microscopía electrónica de barrido (SEM) en un instrumento Tesla BS 343A. La observación al SEM se realizó montando las muestras en una cinta adhesiva doble faz sobre un soporte metálico el cual fue recubierto con oro (Electron Microscopy Sciences) EMS-550 y observadas al SEM a 15 Kv.

La presencia de cristales de CaCO_3 sobre alguna de las tres superficies, mediante SEM nos permite determinar el polimorfismo de estos cristales mediante las técnicas de difracción de rayos

(XRD), espectroscopía infrarroja (FTIR) y/o Raman.

La difracción de rayos X (XRD) es una técnica de caracterización cristalográfica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal lo que permite dilucidar la estructura cristalina de éste. Los difractogramas de XRD se realizaron en cristales obtenidos sobre el soporte de Qo sulfonado, esto posterior a evidenciar su presencia mediante SEM. Los difractogramas de XRD se obtuvieron en un equipo Siemens D-5000X.

Por otro lado, se utilizó la técnica espectroscópica infrarroja (FTIR) para estudiar el polimorfismo de los cristales obtenido sobre el soporte de Qo sulfonado. Los equipos FTIR que se utilizaron fueron los espectrómetros modelo Brucker Vector 22 y el FTIR Interspectrum Interspec p/n 200-X, propiedad de laboratorio CIMAT.

Raman es una técnica espectroscópica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico. Se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de luz incidente, teóricamente esta técnica nos permitiría determinar el polimorfismo de los cristales de CaCO_3 formados sobre el soporte de Qo sulfonado. El equipo empleado fue DetaNu modelo Advantage Systems y el

láser empleado de 785 nm propiedad del laboratorio CIMAT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Preparación del soporte de quitosano sulfonado.

Inicialmente el film puro de Qo sulfonado se preparó mediante la técnica de evaporación del solvente, sin embargo el producto obtenido resultó de difícil manipulación por su fragilidad que lo hizo inapropiado para resistir las técnicas experimentales y analíticas (figura 1), por lo cual se decidió obtener el film en conjunto con una delgada lámina de poliestireno obteniendo un soporte de Qo sulfonado que cumplió con todos requisitos para nuestro objetivo de ofrecer una superficie polimérica sulfatada que haga de confinamiento en el modelo de nucleación y crecimiento heterogéneo en cristalización de CaCO_3 *in vitro*.

Las características morfológicas del soporte de Qo sulfonado fueron analizadas mediante SEM. La observación al SEM se realizó montando el soporte de Qo sulfonado en una cinta adhesiva doble faz sobre un soporte metálico y observado al SEM a 15 Kv.

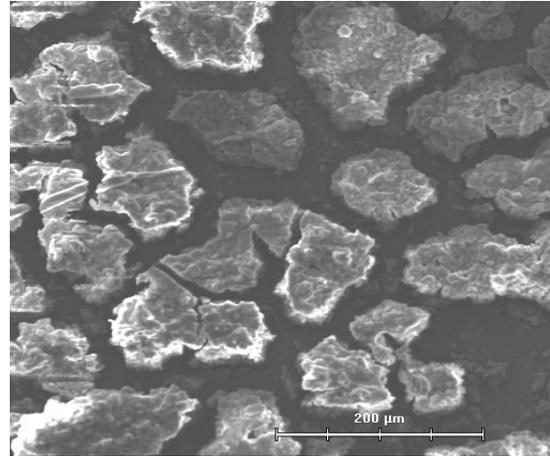


Fig.1. SEM de soporte de Qo sulfonado

En la **Fig.1** se observa una estructura fragmentada compuesta de zonas regulares de 50 a 100 µm del soporte de Qo sulfonado con una disposición microscópica uniforme del film sobre la lámina de poliestireno. En la superficie del soporte de Qo sulfonado y alrededor de las zonas fragmentadas se puede observar la lámina o base de poliestireno que permite sustentar el frágil film de Qo sulfonado.

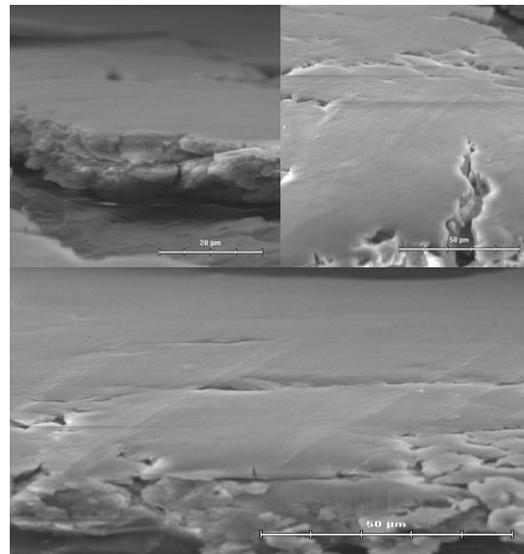


Fig.2. SEM de soporte de Qo sulfonado.

de las láminas con

En la **Fig.2** podemos observar una disposición más uniforme con una superficie más lisa del film de Qo sulfonado sobre la superficie de poliestireno esto se logró acelerando la evaporación del solvente, realizando agitaciones constantes y una manipulación muy cuidadosa al recortar con la hoja de bisturí. Además, es posible apreciar el grosor del film de Qo sulfonado sobre la superficie de poliestireno con una dimensión de aproximadamente de 10 μm .

Análisis espectroscópico FTIR de soporte de Qo sulfonado

El polvo de Qo sulfonado analizado fue obtenido y caracterizado previamente (Dr. A. Neira-Carrillo). Este Qo sulfonado en polvo fue utilizado para la preparación del soporte de Qo sulfonado y utilizado en los ensayos de cristalización *in vitro* de CaCO_3 .

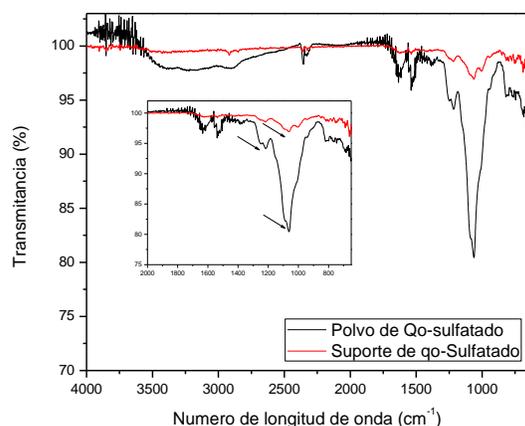


Fig.3. Espectro FTIR del soporte de Qo sulfonado y de polvo de Qo sulfonado.

La **Fig.3** muestra los espectrogramas FTIR del polvo de Qo sulfonado y del soporte de Qo sulfonado. La línea de color negro representa el espectrograma del polvo de Qo sulfonado y se indican los picos de absorción característicos de los grupos amina I y II de este polímero y la línea de color rojo corresponde al soporte de Qo sulfonado (films de Qo sulfonado sobre lámina de poliestireno). Es posible apreciar que ambos espectros FTIR presentan similitudes en los números de longitudes de onda característicos de Qo aunque el porcentaje de transmitancia varia, este efecto es atribuible a la naturaleza de la muestra ya que una se presenta en polvo y otra es una superficie. La mayor intensidad de absorción cercana a 1000 cm^{-1} permitiría comprobar la presencia de funcionalidades químicas sulfatadas. Por otro lado, la presencia de poliestireno contribuye a la diferencia tanto en transmitancia como en número de longitudes de onda. Mediante el análisis de FTIR se pudo caracterizar el soporte de Qo sulfonado y determinar su presencia sobre el poliestireno.

Cristalización de carbonato de calcio *in vitro*.

1. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

1.1 Cristalización de CaCO_3 : Ensayo Control.

Tanto en el control **1** como en el **2** se observa la precipitación de cristales parecidos a calcita, cristales cúbicos de forma romboédrica de planos. En el fondo de ambos micropocillos se encontró abundante cantidad de cristales sin modificaciones y distribuidos en forma individual. En el control **2** no se

observó formación de cristales sobre la cinta adhesiva y los cristales formados y precipitados no presentaron modificación. Este hallazgo experimental nos permitió asumir que la composición y disposición de la cinta adhesiva no interfiere en la difusión de gases que permiten el fenómeno de cristalización *in vitro*. (Fig. 4).

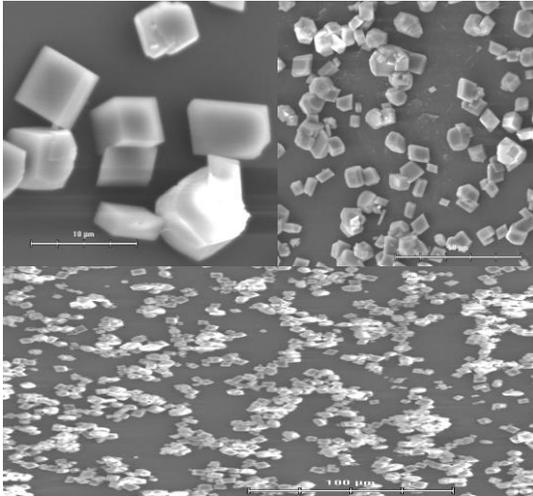


Fig.4. SEM cristales de CaCO_3 . Ensayos control (1 y 2), fondo de micropocillo.

1.2 Cristalización Ensayos Experimentales.

En el ensayo 3 para la cristalización de CaCO_3 se utilizó como soporte un film de Qo puro de bajo peso molecular. En el análisis mediante SEM no se observó formación de cristales sobre esta superficie, sin embargo si fue posible observar una abundante precipitación de cristales con algún grado de modificación en el fondo del micropocillo. Estos cristales modificados presentaron a su vez una aglomeración evidente y fue posible ver que estos cristales son similares a cristales de calcita. (Fig.5.).

Las modificaciones que presentan estos cristales sugieren una difusión de Qo hacia la solución generando modificaciones en los cristales al actuar como un agente modificador de la morfología, dado que está comprobado que su participación en los fenómenos de biomineralización es meramente pasiva. (Arias y Fernández, 2008)

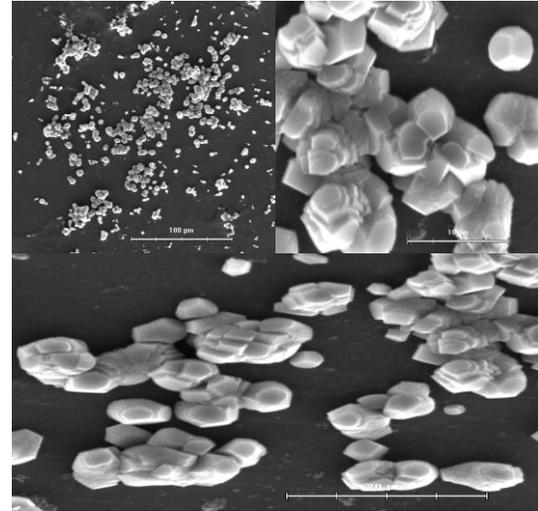


Fig.5. SEM de CaCO_3 . Ensayo 3, fondo micropocillos. Cristales aun conservando forma romboédrica característica de polimorfo calcita.

En el ensayo 4, se utilizó el soporte de Qo sulfonado en el ensayo de cristalización de CaCO_3 *in vitro*. Esta superficie fue la única sobre la cual se observó presencia de cristales con una morfología distintiva. En a Fig.6, los cristales que se pueden observar presentan una morfología semicircular característica y se encuentran altamente modificados y formando conglomerados cristalinos. Esto sugiere que la disposición de estas formaciones cristalinas evidencia que su formación o punto de nucleación esta sobre superficie de Qo sulfonado observándose un pequeño vástago de unión entre la

superficie de Qo sulfonado y la formación cristalina. Por otra parte la disposición del vástago y la formación cristalina con respecto a la superficie evidencia la adhesión a esta segunda pues se disponen en una dirección que se relaciona con el arrastre mecánico que genera el lavado de la superficie posterior a la formación de cristales.

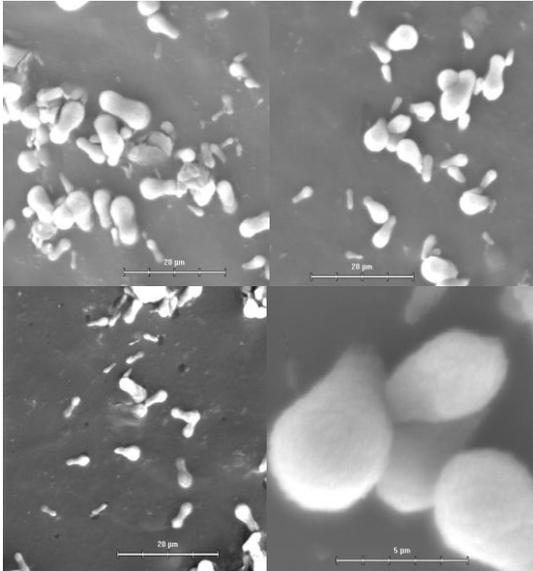


Fig.6. SEM cristales de CaCO_3 en crecimiento formados sobre el soporte de Qo sulfonado.

A través de las microfotografías obtenidas por SEM se puede ver que la disposición de los aglomerados formados, está influenciada por la gravedad nucleando sobre la superficie y creciendo hacia el centro del fondo del micropocillo.

En un acercamiento de los cristales aglomerados es posible observar (Fig.7) que aunque se presentan modificaciones cristalinas aún se aprecian caras de cristales.

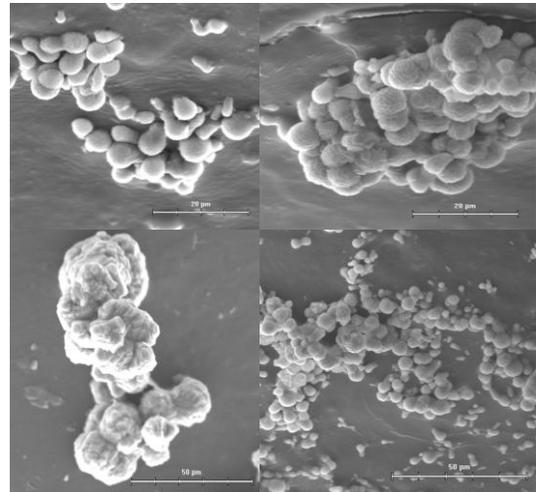


Fig.7. SEM de cristales de CaCO_3 aglomerados, modificados y creciendo hacia el fondo del micropocillo.

En el fondo del micropocillo del ensayo 4 se observa la precipitación de abundantes cristales con un grado de modificación mayor al visto en el fondo del micropocillo del ensayo 3. Así, en la Fig.8 se aprecian formaciones cristalinas similares a las formadas sobre el soporte de Qo sulfonado que nos hacen pensar que precipitaron luego de ser formadas en el soporte. Al igual que en el ensayo 3 la presencia de cristales modificados en el fondo del micropocillo evidencia cierto grado de difusión desde el soporte hacia la solución, dado la naturaleza ácida que le confiere el grupo sulfato la difusión de Qo sulfonado generaría modificaciones por acción pasiva y química como lo evidencia estudios previos (Arias *et al.* (2004))

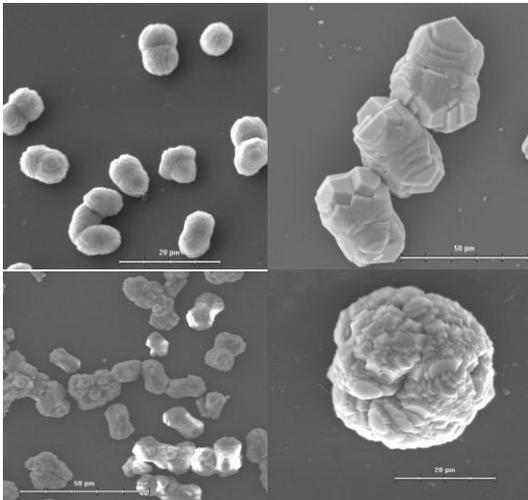


Fig.8. SEM de cristales de CaCO_3 modificados encontrados en el fondo del micropocillo del ensayo 4.

2. Análisis espectroscópico de los cristales formados sobre el soporte de Qo sulfonado.

2.1 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

Esta técnica espectroscópica determina grupos funcionales químicos contenidos en una molécula o compuesto macromolecular a través de patrones de absorción de luz infrarroja.

La principal motivación al usar esta técnica fue comprobar que el equipo de FTIR perteneciente al laboratorio CIMAT podía detectar pequeñas cantidades de cristales de CaCO_3 y determinar su polimorfismo, esto considerando lo escaso de la muestra, la naturaleza de esta (soporte sólido), la disposición de los cristales (previamente vista por SEM).

Por todo lo anterior se consideró que lo más apropiado sería realizar un análisis comparativo entre los resultados del

FTIR de CaCO_3 comercial Merck para probar la sensibilidad del equipo.

La Fig. 9 resume un análisis de FTIR comparativo de los diferentes espectros analizados. La línea negra muestra el espectro FTIR de los cristales de CaCO_3 comercial (Merck), obtenido sobre el soporte de Qo sulfonado, la línea roja corresponde al espectro FTIR del Qo sulfonado y la línea azul al espectro FTIR de los cristales de CaCO_3 depositados sobre el soporte una vez realizado los ensayos de cristalización *in vitro*. Es importante destacar que el espectro FTIR del material cristalino depositado sobre soporte de Qo sulfonado presentó los picos de absorción característicos del CaCO_3 comercial a 3500 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} . Al mismo tiempo el pico de absorción típico de calcita fue obtenido a 700 cm^{-1} (flecha de color negro). Por otro lado, la presencia del pico de absorción cercano a 1250 cm^{-1} del Qo sulfonado también fue observado.

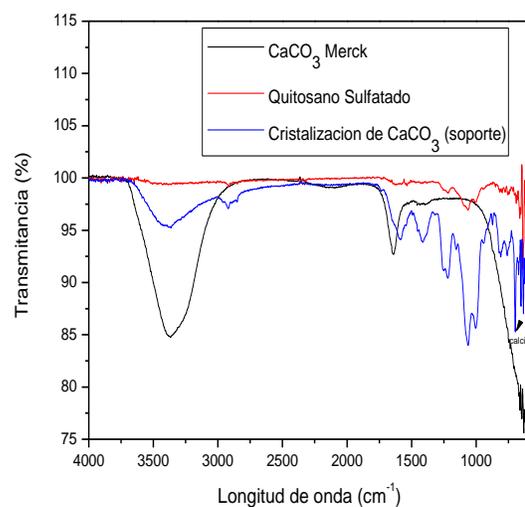


Fig.9. Espectros FTIR comparativos permiten evidenciar la presencia de

cristales de CaCO_3 sobre el soporte y determinar que corresponden al polimorfo calcita.

2.2 RAMAN

La espectroscopía Raman corresponde a una técnica espectroscópica de alta resolución que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico. Se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de luz incidente.

El equipo Raman que se utilizó permite simultáneamente una visualización microscópica de la muestra analizada, esto represento una gran ventaja pues en tiempo real es posible determinar con mayor precisión la zona en que el haz del láser, a 785 nm en este instrumento, está incidiendo. Esta ventaja permite obtener con mayor probabilidad un espectro de Raman en la zona cristalina deseada de la muestra del film de Qo sulfonado (Fig.10). Por tal razón, la técnica de Raman permite aumentar la perspectiva de analizar e identificar cristales de CaCO_3 y determinar su polimorfismo siendo este uno de nuestros objetivos.

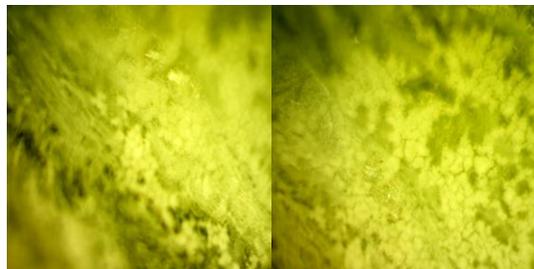


Fig.10. Imágenes de films de Qo sulfonado microscopía óptica obtenidas usando espectroscopía Raman.

La Fig. 11 resume un análisis comparativo de los diferentes espectros Raman analizado. La línea roja muestra el espectro Raman de los cristales de CaCO_3 obtenido sobre el soporte de Qo sulfonado, la línea negra muestra el espectro Raman de una mezcla física preparada con CaCO_3 comercial depositada sobre el soporte previo a su análisis espectroscópico y la línea verde corresponde al espectro Raman del Qo sulfonado usado en los ensayos de cristalización *in vitro*. Es importante destacar que el espectro Raman de la mezcla física es coincidente con el pico activo a 1080 cm^{-1} correspondiente al polimorfo de calcita y al pico activo de 420 cm^{-1} ambos obtenidos usando el soporte de Qo sulfonado en el ensayo de cristalización. Por otro lado, la intensidad del pico activo Raman cercano a 250 cm^{-1} del Qo sulfonado también es observado en el espectro Raman una vez realizado el ensayo de cristalización de CaCO_3 .

a

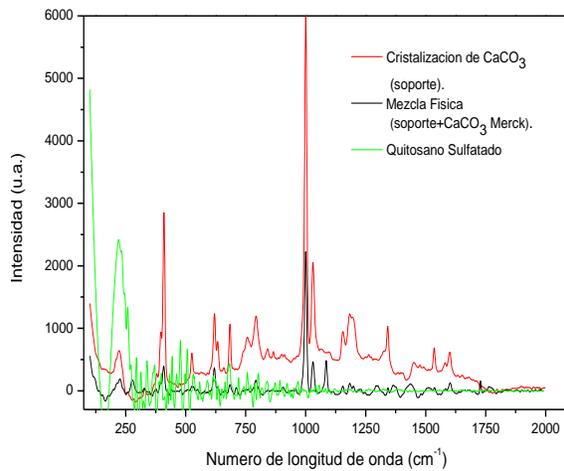


Fig.11. Espectros Raman comparativos de cristales de CaCO_3 sobre el soporte de Qo sulfonado (Línea roja), mezcla física (línea negra) y Qo sulfonado (línea verde).

2.3 Difracción de Rayos X (XRD)

La difracción de rayos X es una técnica de caracterización cristalográfica que consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal lo que permite dilucidar la estructura cristalina de éste.

La Fig. 12 muestra un difractograma de XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos sobre el soporte de Qo sulfonado después de realizado un ensayo de cristalización *in vitro*. La figura muestra los picos cristalinos característicos a $2\theta = 29,0$ de la fase (104) confirmando el polimorfo de calcita. A su vez, las intensidades cercanas a $2\theta = 10$ y $2\theta = 20$ corresponde probablemente a la base de poliestireno.

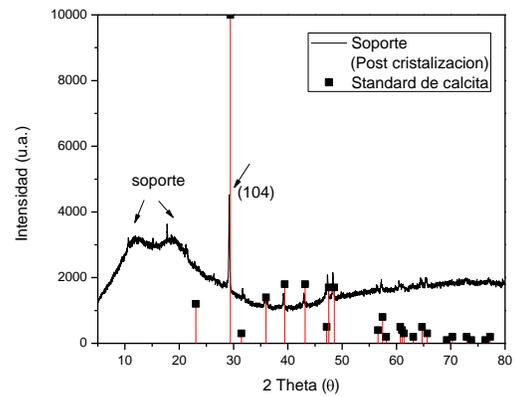


Fig.12. Difractograma de XRD de los cristales de CaCO_3 obtenidos sobre el soporte de Qo sulfonado.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que el Qo sulfonado presentado como soporte en un ensayo de cristalización heterogénea de CaCO_3 *in vitro* actúa como una superficie efectiva para el control de la nucleación y crecimiento de cristales, haciendo de éste un modelo muy simplificado y una aproximación más cercana a las condiciones biomiméticas en que ocurre el fenómeno de mineralización biológica.

Los análisis fisicoquímicos del soporte de Qo sulfonado demostraron que es viable experimentalmente su uso como una superficie que induce la nucleación y crecimiento cristalino con modificaciones morfológicas. Así, el análisis morfológico concluyo que hubo formación de cristales de CaCO_3 sobre el soporte de Qo sulfonado y que no son un depósito cristalino formado por gravedad como ocurre en modelos de cristalización homogénea *in vitro*. Además el hecho que en los ensayo 3 y 4 se observaron cristales en el fondo del micropocillo, y que las modificaciones morfológicas más evidentes y abundantes se observaron en el fondo del micropocillo en el ensayo 4, lo cuales atribuible a la funcionalidad química del soporte polimérico sulfonado.

Los análisis comparativos realizados con las técnicas espectroscópicas de FTIR y Raman nos permitieron caracterizar el soporte de Qo sulfonado, demostrar la presencia de cristales de CaCO_3 , determinar el polimorfismo de los cristales. Finalmente, la técnica de Difracción de rayos X (XRD) corroboró el polimorfismo de los cristales de calcita obtenidos.

REFERENCIAS

ABARRATEGUI, A. 2008. Estudio del quitosano como biomaterial Portador de rhBMP-2: Desarrollo, caracterización y Aplicabilidad en regeneración de tejido Óseo. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biológicas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

AIZENBERG, J. 2004. Patterned crystallization of calcite *in vivo* and *in vitro*. *J. Cryst. Growth* 211:143-148.

ARIAS, J. L.; JURE, C.; WIFF, J. P.; FERNANDEZ, M. S.; FUENZALIDA, V. M. 2002. Effect of sulfate content of biomacromolecules on the crystallization of calcium carbonate. In: *Advanced Biomaterials – Characterization, Tissue Engineering and Complexity*, (S.C. Moss ed.). *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 711:243-248.

ARIAS, J. L.; NEIRA, C. A.; ESCOBAR, C.; BODERO, M.; DAVID, M.; FERNÁNDEZ, M. S. 2004. Sulfated polymers in biological mineralization: a plausible source for bio-inspired engineering. *Mater. Chem.*14: 2154-2160.

ARIAS, J. L.; FERNÁNDEZ, M. S. 2008. Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization. *Chem. Rev.*108 (11): 4475-4482.

ESTROFF, L. 2008. Introduction: Biomineralization. *Chem. Rev.*108 (11): 4329-4331

GRASSMANN, O.; LOBMANN, P. 2004. Biomimetic nucleation and growth of CaCO_3 in hydrogels incorporating

carboxylate groups. In: *Biomaterials*. 25(2) :277-282.

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*. 225:1098-1105.

LOWENSTAM, H. A; WEINER, S; 1989. On biomineralization. Oxford Univ. Press, N.Y., 324p.

NEIRA-CARRILLO, A., YAZDANI-PEDRAM, M., RETUERT, J., DIAZ-DOSQUE, M., GALLOIS, S., ARIAS, JL. 2005. Selective crystallization of calcium salts by poly(acrylate)-grafted chitosan. *Journal of Colloid and Interface Science* 286: 134-141.

NEIRA-CARRILLO, A; VÁSQUEZ-QUITRAL, P; YAZDANI-PEDRAM, M; ARIAS, JL. 2010. Crystal growth of CaCO_3 induced by monomethylitaconate grafted polymethylsiloxane. *Eur. Polym. J.* 46 : 1184-1193.

TAI, C; CHEN, F.B. 1998. Polymorphism of CaCO_3 precipitated in a constant-composition environment. *Am. Inst. Chem. Engin. J.* 44:1790-1799.