



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

**EFECTO DEL ÁCIDO POLIACRÍLICO Y DE QUITOSANO  
SOBRE LA ELECTROCRISTALIZACIÓN  
DE CARBONATO CÁLCICO**

**EDUARDO IGNACIO CASTAÑEDA ZÚÑIGA**

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

PROFESOR GUÍA: DR. ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

FONDECYT N° 1140660

SANTIAGO, CHILE

AÑO 2015



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

**EFEECTO DE LOS ÁCIDOS POLIACRÍLICO Y DE QUITOSANO  
SOBRE LA ELECTROCRISTALIZACIÓN  
DE CARBONATO CÁLCICO**

**EDUARDO IGNACIO CASTAÑEDA ZÚÑIGA**

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

Nota Final.....

Prof. Guía	ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO	Firma.....
Profesor Corrector	JOSÉ LUIS ARIAS	Firma.....
Profesor Corrector	MARCO GALLEGUILLOS	Firma.....

PROFESOR GUÍA: DR. ANDRÓNICO NEIRA-CARRILLO

FONDECYT N° 1140660

SANTIAGO, CHILE

AÑO 2015

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

El logro de haber llegado hasta acá no hubiera sido posible sin la ayuda de la gente que conocí dentro del laboratorio, gracias a Yazmín, Patricio y Marianela por sus buenas intenciones y ayuda desinteresada. Probablemente el camino hubiera resultado más difícil que lo que fue, sin la ayuda de ellos. Destacar a mi profesor guía Andrónico Neira, por acogerme en su laboratorio desde el primer momento, por el tiempo dedicado y por sus enseñanzas tanto de bioquímica como de Kung Fu.

A mi familia, que desde mis primeros años de estudio se han dedicado a brindarme lo mejor dentro de sus posibilidades y que gracias a eso he logrado ser lo que soy en la actualidad. A mi madre, pilar fundamental para que mis brazos jamás cayeran, incluso en los momentos de mayor dificultad. A mis hermanas, Fernanda y Belén, que juntos hemos pasado por los mismos procesos de estudio, pero que pese a las dificultades las hemos podido ir sorteando, aportando cada uno, a su modo, en la formación del otro.

A mis amigos, a todos los que de alguna u otra forma han estado presentes en estos años de universidad, apoyándome o preocupándose, dándome una mano cuando lo necesité. No daré nombres porque podría olvidar a algunos, pero siempre agradeceré haber compartido tantos carretes y buenos momentos, donde casi nada importaba, sólo pasarlo bien.

Dar las gracias a Dios y a la vida misma, que te da y te quita, pero creo que así debe ser la vida, vivir en una eterna montaña rusa.

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	5
<b>SUMMARY</b>	6
<b>INTRODUCCIÓN</b>	7
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	7
Biom mineralización	7
Carbonato de Calcio	8
Quitosano, Ácido Poliacrílico	8
<b>HIPÓTESIS</b>	11
<b>OBJETIVOS GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	11
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	11
Evaluación de la respuesta electroquímica.	12
Preparación de electrodos y electrodeposición.	12
Electrocristalización de carbonato de calcio.	12
Análisis morfológico y físico-químico de los cristales de CaCO <sub>3</sub> mediante técnicas microscópicas, espectroscópicas y de difracción.	13
<b>RESULTADOS</b>	14
Electrocristalización de CaCO <sub>3</sub> sobre sustrato ITO (control).	15
▪ Curva cronoamperométrica.	15
▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM).	15
▪ Difracción de rayos X.	15
Electrocristalización de CaCO <sub>3</sub> sobre sustrato ITO en presencia de APA. Efecto de la concentración del aditivo.	16
▪ Curvas cronoamperométricas.	16
▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM).	17
▪ Difracción de rayos X.	19
Electrocristalización de CaCO <sub>3</sub> sobre sustrato ITO en presencia de APA. Efecto del voltaje aplicado.	19
▪ Curvas cronoamperométricas.	19
▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM).	20
▪ Difracción de rayos X.	21
Electrocristalización de CaCO <sub>3</sub> sobre sustrato ITO en presencia de APA. Efecto del tiempo.	21
▪ Curvas cronoamperométricas.	21
▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM).	22
▪ Difracción de rayos X.	23
Electrodeposición de Qo sobre sustrato ITO.	23
Electrocristalización de CaCO <sub>3</sub> sobre Qo previo electrodeposición en sustrato ITO. Ensayos en presencia y ausencia de APA.	23
▪ Curvas cronoamperométricas.	23
▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM).	24
▪ Difracción de rayos X.	25
<b>DISCUSIÓN</b>	25
<b>CONCLUSIONES</b>	27
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	28
<b>ANEXOS</b>	30

## RESUMEN

La formación de minerales inorgánicos es controlada biológicamente en los organismos vivos (biomineralización) formando materiales compósitos híbridos orgánico-inorgánicos. Estos materiales híbridos poseen propiedades superiores, las cuales han sido ampliamente estudiadas. A nivel de laboratorio, el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ha sido investigado siendo útil para el estudio de la biomineralización y la formación de nuevos biomateriales. Para controlar las características de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  es necesario comprender los mecanismos por los cuales los cristales se forman y las interacciones entre sus componentes orgánico e inorgánico. En este contexto, polímeros naturales y sintéticos han sido utilizados como aditivos y/o sustratos en ensayos de cristalización *in vitro*, modificando la morfología de cristales  $\text{CaCO}_3$ . Así, el quitosano (Qo) y el ácido poliacrílico (APA) han mostrado ser activos en el control de la nucleación, crecimiento y orientación cristalográfica del  $\text{CaCO}_3$ . En este trabajo se evaluó Qo y APA sobre la cristalización de  $\text{CaCO}_3$  *in vitro* usando una técnica electroquímica. Se estudiaron las reacciones químicas involucradas en la formación electroquímica del  $\text{CaCO}_3$  mediante cronoamperometría en electrodos ITO como electrodo de trabajo. Se evaluaron las variables de tiempo, voltaje y concentración de APA. El Qo fue utilizado como sustrato biopolimérico en la electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$ . Los resultados de los ensayos se evaluaron mediante SEM y XRD. Las curvas amperométricas demuestran que en los primeros 3 minutos ocurre una disminución importante en los valores de corriente en todos los ensayos, lo que demuestra la formación de cristales o depósito de  $\text{CaCO}_3$ . Al realizar ensayos de  $\text{CaCO}_3$  sin aditivo, se obtienen cristales con tamaño de 10  $\mu\text{m}$ , de morfología tetraédrica y romboédrica con fases alargadas y bordes bien definidos. Al usar APA se observaron aglomerados de partículas de forma irregular distribuidos ampliamente en la superficie del ITO. Mientras que, en presencia de un film de Qo, se observan cristales superpuestos y con formas tetraédricas. Finalmente, al combinar ambos polímeros en un mismo ensayo, se observan cristales con formas esféricas bien definidas. Mediciones de XRD de ángulo rasante, confirman la formación de  $\text{CaCO}_3$  amorfo (ACC) en los ensayos donde se encuentra presente APA. Por otro lado, al usar Qo se demuestra que es un modulador de la morfología y disposición de los cristales sin alterar su fase cristalina romboédrica.

## SUMMARY

The formation of inorganic minerals is controlled biologically in living organisms (biomineralization) forming organic-inorganic hybrid composites materials. These hybrid materials have superior properties which have been widely studied. A laboratory level, calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) has been investigated and useful for the study of biomineralization and the formation of new biomaterials. To control the characteristics of  $\text{CaCO}_3$  crystals is necessary to understand the mechanisms by which crystals form and the interactions between organic and inorganic components. In this context, natural and synthetic polymers have been used as additives and/or substrate crystallization tests in vitro, modifying the morphology of  $\text{CaCO}_3$  crystals. Thus, chitosan (Qo) and polyacrylic acid (PAA) have proven to be active in the control of nucleation, growth, and crystallographic orientation of  $\text{CaCO}_3$ . In this work, Qo and APA were evaluated on crystallization of  $\text{CaCO}_3$  in vitro using an electrochemical technique. The chemical reactions involved in the electrochemical formation of  $\text{CaCO}_3$  were studied using chronoamperometry with ITO electrodes as working electrode. The variables of time, voltage and concentration of APA were evaluated. The Qo biopolymer was used as substrate in the electro-crystallization of  $\text{CaCO}_3$ . The test results were evaluated by SEM and XRD. Amperometric curves show that in the first 3 minutes a significant decrease occurs in the current values in all tests, showing the formation of  $\text{CaCO}_3$  crystals or deposit of inorganic materials. When testing without additive  $\text{CaCO}_3$  crystals are obtained with size of 10 microns, tetrahedral and rhombohedral phases elongated morphology with well-defined edges. APA using crystalline agglomerates widely distributed irregularly on the surface of ITO is observed. While, in the presence of a film of Qo, tetrahedral forms and overlapping crystals are observed. Finally, combining both polymers in the same test, crystals were observed with well-defined spherical shapes. XRD measurements of grazing angle, confirm the formation of amorphous  $\text{CaCO}_3$  (ACC) in trials where APA is present. Furthermore, when using Qo shows that is a modulator of the morphology and arrangement of the crystals without altering the rhombohedral crystalline phase.

## INTRODUCCIÓN

La biomedicina se ha dedicado, a lo largo de los años, a la búsqueda de nuevos biomateriales capaces de combatir diversas patologías que afectan tanto a las personas como a los animales. Esta búsqueda continúa y se enfoca en encontrar variantes y/o derivados de materiales orgánicos e inorgánicos que presenten mejoras en cuanto a sus características de biocompatibilidad, biodegradabilidad, entre otros. En este sentido, el carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), un material inorgánico, ha sido uno de los compuestos mayormente estudiados y utilizados en la biomedicina. Esto se debe a que es un material fácil de obtener y sintetizar, presenta características que son compatibles con el organismo, no es tóxico y se degrada rápidamente. En la actualidad, el  $\text{CaCO}_3$  se ha utilizado como transportador de fármacos en diversas patologías, principalmente en el tratamiento contra el cáncer. Además, ha sido utilizado en el desarrollo de implantes mejorando las características del mismo, en el tratamiento de heridas, formación de tejidos, entre otros. Sin embargo, estudios recientes han dado luz a nuevas opciones respecto al uso del  $\text{CaCO}_3$ . Es así como a través de diversos métodos de cristalización se ha intentado investigar las características de las distintas formas cristalinas que presenta el  $\text{CaCO}_3$ , con el fin de ir optimizando el uso de este biomaterial para cada tratamiento. En este trabajo de tesis de pregrado, estudiaremos un método no

tradicional de cristalización llamado electrocristalización, para la síntesis y estabilización de  $\text{CaCO}_3$  amorfo (CCA), fase no cristalina poco estudiada y que podría presentar mejores características biomédicas dado sus propiedades de alta solubilidad y capacidad de moldearse, respecto de las fases cristalinas como vaterita, aragonita o calcita. Además, se evaluará el efecto de dos biopolímeros en la estabilización de  $\text{CaCO}_3$  durante la electrocristalización sobre un electrodo de aluminio-silicato de óxido indio estaño, sustrato ITO, de su sigla en inglés “Indium Tin Oxide”. Los biopolímeros usados fueron el ácido poliacrílico (APA) y quitosano (Qo), que previamente han sido reportados como moduladores de la cristalización de  $\text{CaCO}_3$ .

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Biom mineralización

La cristalización biológica (biomineralización) de biocerámicas en los organismos vivos ha atraído por décadas la atención de los investigadores, por ejemplo, en un intento por desarrollar formas de replicarlo a nivel de laboratorio (biomimética). La biomineralización promueve la formación y precipitación de compuestos inorgánicos en forma controlada sobre un sustrato orgánico (Guru y Dash, 2014). Proteínas y polisacáridos son macromoléculas orgánicas que cumplen la función de controlar la orientación cristalográfica, polimorfismo y tamaño de los cristales neoformados, actuando como moldes para

su nucleación, crecimiento y agregación (Pai y Pillai, 2008). El componente inorgánico es el resultado de la reacción de cristalización, en donde se consideran principalmente las sales de calcio en sus distintas presentaciones: carbonatos, oxalatos y fosfatos.

### **Carbonato de Calcio**

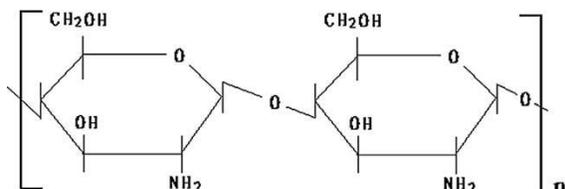
El  $\text{CaCO}_3$  es un compuesto inorgánico que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. El proceso de formación del  $\text{CaCO}_3$  presenta distintas etapas, comenzando desde un precursor amorfo de  $\text{CaCO}_3$  (CCA), para luego transformarse en fases cristalinas con estabilidades termodinámicas mayores: vaterita, aragonita y calcita. La calcita resulta ser el polimorfo más estable y menos soluble en el ambiente. Ensayos *in vitro* han demostrado que la morfología del  $\text{CaCO}_3$  puede ser modulada por efecto de la temperatura, pH de la solución, aditivos, fuerza iónica, sobresaturación, entre otros (Pavez *et al.*, 2005). Dentro de sus propiedades se encuentra que es un polvo micro-cristalino, de color blanco, inodoro, insípido y estable a temperatura ambiente. El  $\text{CaCO}_3$  ha sido estudiado y utilizado en varias aplicaciones industriales: producción de papel con mejores propiedades de brillo, en la fabricación de pasta de dientes, cosméticos y en el tratamiento de aguas como agente filtrador, entre otros. El  $\text{CaCO}_3$  es considerado un material seguro para la administración de biomoléculas y fármacos dentro de sistemas biológicos, ya que su eliminación no deja residuos al interior del organismo (Sukhorukov *et al.*, 2004), por lo que se ha utilizado

recientemente para el tratamiento de algunas enfermedades. Según Wei *et al.* (2008), el  $\text{CaCO}_3$  comparado con otros materiales inorgánicos, es muy adecuado para la formación de micro y/o nanopartículas que actúan como transportador de fármacos anticancerígenos debido a sus propiedades de biocompatibilidad y biodegradabilidad. De esta forma, micropartículas esféricas a base de  $\text{CaCO}_3$  - doxorrubicina, es capaz de liberar el fármaco sólo bajo condiciones específicas, por ejemplo, en el ambiente levemente ácido del medio extracelular en tumores sólidos (pH=6) o en el interior de los lisosomas en las células tumorales (pH= 4.5). Por otro lado, Sukhorukov *et al.* (2004) sugirieron la posibilidad de fabricar microcápsulas  $\text{CaCO}_3$  debido a que su estructura presenta nanoporos y canales que permitirían capturar macromoléculas biológicas como las proteínas. En otro estudio, Green *et al.* (2004) sintetizaron microesferas de vaterita para la incorporación de biomoléculas como hemoglobina, colágeno tipo I, proteína morfogenética ósea (rhMBP-2) o plasmidios de ADN para incluirlas en la médula ósea con el fin de estimular el crecimiento del hueso en casos de lesiones por trauma o degeneración.

### **Quitano**

El Qo es un polisacárido catiónico lineal compuesto por unidades de  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-amino-D-glucopiranososa (D-glucosamina) y  $\beta$ -(1-4)-2-desoxi-2-acetamido-D-glucopiranososa (N-acetil-D-glucosamina). El Qo se obtiene de la desacetilación de la quitina. Aplicaciones

industriales del Qo están presentes en la industria lechera, del agua, agrícola, entre otros; mientras que en la biomedicina se utiliza como agente inmunoestimulante, antimicrobiano y transportador de fármacos. La estructura química del Qo se muestra en la Figura 1 (Zhang *et al.*, 2006).



**Fig. 1.** Estructura molecular del quitosano.

Existen variados estudios del efecto de Qo sobre la cristalización del CaCO<sub>3</sub>. Estos estudios muestran que el Qo al unirse entre sí, ya sea en una solución acuosa o en una solución de ácido débil, el grupo amino se protona, lo cual le confiere a la molécula carga positiva (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Esta característica del Qo es única en los biopolímeros ya que generalmente presentan carga negativa.

Los ensayos que generalmente se describen en la literatura utilizan el Qo junto a APA como agente adhesivo para que el CaCO<sub>3</sub> precipite. Sin embargo, existen ensayos que explican la acción del Qo por sí solo, usando una variante del mismo. Según Liang *et al.* (2004), el uso de carboximetil quitosano (CMQo) actúa como un modificador de la morfología del CaCO<sub>3</sub> pero no como un inductor de cambio de fase cristalina, promoviendo la formación de calcita. Además, considera que al aumentar la concentración del CMQo, los cristales se modificarían

desde la morfología clásica romboédrica a formas esféricas y morfologías tipo “maní”. Así, el tamaño de los cristales disminuyen pero aumentan en cantidad y por consiguiente los lugares de nucleación. Confirmando esto, Yang *et al.* (2010) a través del método de difusión de gases, ocupó el CMQo y formó cristales de calcita con morfología esférica, concluyéndose que el Qo es un modulador de la morfología de los cristales CaCO<sub>3</sub>.

Los inhibidores de la biomineralización son aditivos químicos que se usan para controlar la formación y/o deposición de cristales. Existen tres grupos de inhibidores: polímeros que contienen ácidos carboxílicos (R-COOH), por ejemplo el ácido poliacrílico y el ácido polimaleico; polímeros que contienen grupos fosfatos (R-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>), como los polifosfatos y ésteres de polifosfatos; y por último, los polímeros que contienen grupos sulfonatos (R-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ejemplo son los polisacáridos sulfonados, dermatán y keratán sulfatos, entre otros. Las características de estos inhibidores es que son aditivos de fácil manejo, costo reducido, requieren baja dosis de utilización y óptima capacidad para inhibir formaciones de algunos cristales. Se ha sugerido que los inhibidores de incrustaciones de sarro calcáreo pueden operar por mecanismos tales como: secuestro y adsorción. El primero se refiere a la posibilidad de disminuir la concentración iónica en la solución, secuestrando iones reactantes e impidiendo la nucleación. El segundo implica la adsorción del inhibidor en puntos de nucleación impidiendo la

agregación, promoviendo la adición electrostática y/o estabilización estérica (Al- Hamzah *et al.*, 2014).

Las diferencias morfológicas de los cristales formados en presencia de aditivos ocurren por la adsorción selectiva de los inhibidores en los puntos de crecimiento de los cristales, causando una reducción diferencial en la tasa de crecimiento de diferentes planos del cristal. En el caso del  $\text{CaCO}_3$ , los inhibidores pueden estabilizar cristales de vaterita y prevenir su transformación en aragonita o calcita. Los aditivos modifican la morfología de los cristales en formación mediante una reducción en la velocidad de crecimiento, una menor eficacia en la agregación o la formación de un depósito más poroso y más fácil de remover (Al- Hamzah *et al.*, 2014).

### **Ácido Poliacrílico**

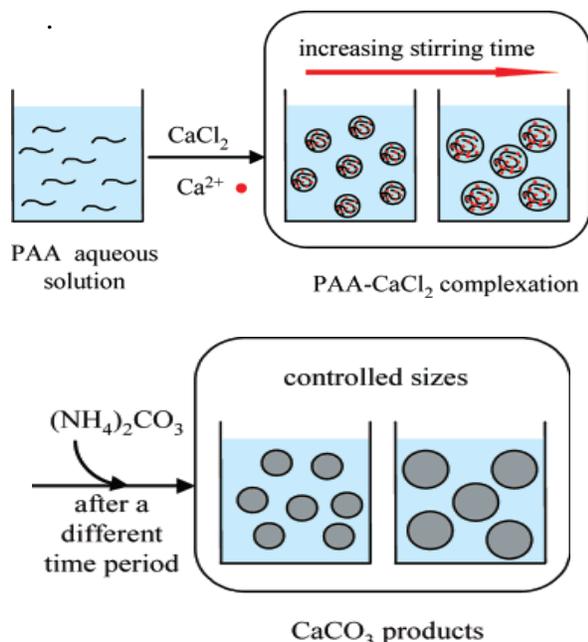
El ácido poliacrílico (APA) es un polímero sintético que actúa como un polielectrolito en diversas reacciones químicas. Deriva del ácido acrílico que está constituido por etileno unido a un grupo carboxilo. Se utiliza principalmente como un agente espesante y emulsionante en fármacos y cosméticos. El APA ha resultado un aditivo interesante en experimentos de cristalización *in vitro* para  $\text{CaCO}_3$ , oxalato cálcico ( $\text{CaOx}$ ) y otros compuestos inorgánicos. Mantilaka *et al.* (2013), estudiaron la forma de estabilizar el CCA bajo la influencia de APA, a través de la ruta de carbonación vía dolomita (mineral compuesto de  $\text{CaCO}_3$  y de magnesio). En su trabajo se demostró que al aumentar la concentración de APA aumenta el

porcentaje de CCA. Además, al aumentar la temperatura y el pH de la solución, aumenta el efecto estabilizador del APA sobre el CCA, logrando porcentajes mayores que las formas cristalinas.

Otros autores utilizan el APA como inhibidor, pero consideran otras variables en su estudio. Huang *et al.* (2008) evaluaron el efecto del peso molecular del APA y el tiempo que demoró en ser agregado sobre la cristalización de  $\text{CaCO}_3$  por el método de adición retardada. En casi todos los ensayos se logró estabilizar el polimorfo de vaterita. Ellos demostraron que al aumentar el peso molecular del APA aumenta la estabilidad de vaterita. Por otro lado, al comparar el momento en que es agregado el APA, demostraron que al adicionarlo en el tiempo cero, la inhibición de la cristalización fue parcial, logrando formarse desde la forma amorfa hasta calcita. En cambio, al agregar el APA a tiempos diferentes (3 a 60 minutos) se logra estabilizar vaterita. Además, se observó que la vaterita estabilizada se formaba a través del crecimiento de esferulitas y no de la forma clásica.

Adicionalmente, Huang *et al.* (2007) a través del método de adición controlada de carbonato, lograron sintetizar esferas de CCA de tamaño controlado y de alta estabilidad. Esto ocurre por el hecho de formar un complejo APA- $\text{CaCl}_2$ , el cual a medida que avanza el tiempo de adición de iones carbonato, aumenta el tamaño del complejo y las esferas de CCA. Con estos resultados se demostró que, a menor tiempo de adición del carbonato, mayor será el grado de estabilidad de las esferas de CCA. Esto se explicaría por el hecho

de que al formarse el complejo APA- $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$  existe una serie de intermediarios que inducirían una coordinación aleatoria del ion  $\text{Ca}^{2+}$  con el APA (Fig. 2).



**Fig. 2.** Método de adición controlada de carbonato. (Huang *et al.*, 2007).

Además, se concluye que a medida que el peso molecular disminuye desde 2100 a 1200 g/mol del APA se inhibe la nucleación de  $\text{CaCO}_3$ . En contraposición, al aumentar el peso molecular del APA (25000 g/mol) se sintetizó una mezcla de la fase amorfa junto con vaterita y calcita.

## HIPÓTESIS

Dado que el ácido poliacrílico (APA) ha sido utilizado como estabilizador de precursores de carbonato de calcio amorfo (CCA) en ensayos de cristalización clásicos, se espera que también module la morfología, tipo y

tamaño de cristales con la técnica electroquímica.

## OBJETIVO GENERAL

Obtener los precursores de  $\text{CaCO}_3$  y/o estabilizar CCA mediante ensayos de electrocristalización.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar y obtener un protocolo de electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$ .
2. Evaluar el efecto inhibitor de APA en la electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$  y su efecto utilizando películas de Qo electrodepositadas.
3. Obtener películas electrodepositadas de Qo sobre sustratos ITO.
4. Caracterizar morfológica y físico-químicamente los cristales de  $\text{CaCO}_3$  mediante técnicas de microscópicas (óptica, SEM), espectroscópicas (FTIR y/o RAMAN) y de difracción de Rayos X (XRD).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Materiales

Quitosano (Aldrich-Sigma) comercial de peso molecular y grado de desacetilación conocidos (70 KDa; > 75% grado de desacetilación) fue usado en los ensayos de electrodeposición de películas y electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$ . Brevemente, se preparó Qo al 1% p/v en solución de HCl 0,1 M, dejando agitar durante 24 horas. Se utilizó APA de peso molecular 5100 (Sigma-Aldrich). Los reactivos peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% p/v y ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  70% p/v

(Winckler) fueron utilizados para preparar la solución de lavado “piraña”.

## **2. Métodos**

### **2.1 Evaluación de la respuesta electroquímica.**

Las propiedades funcionales de los depósitos fueron estudiados utilizando un potenciostato/galvanostato Epsilon Basi, acoplado a una celda electroquímica de vidrio con tres electrodos y controlado mediante un computador usando un software especializado (BASi Epsilon-EC). El contraelectrodo que se utilizó fue de platino (23 cms de largo) y el ER será de plata cloruro plata (Ag/AgCl). Una solución de buffer PBS a pH básico, desgasificada con argón, fue utilizada para los estudios electroquímicos.

### **2.2. Preparación de electrodos y electrodeposición.**

La preparación de la celda electroquímica (ECE) y los sustratos ITO, se realizó de la siguiente forma:

- Los sustratos ITO tienen dimensiones de 25 mm x 25 mm. Cada sustrato ITO fue cortado obteniendo dos trozos con tamaño de 25 mm x 12,5 mm. El corte de los ITO fue realizado con guantes, bajo una superficie limpia. Idealmente sobre papel para remover con mayor facilidad restos del sustrato ITO.
- El corte sobre el lado conductor del ITO se realizó con un lápiz punta de diamante. El lado conductor del ITO se identificó con un téster digital.
- Se colocaron un par de gotas de pasta grafito (Graphite Conductive Adhesive

112) en la parte superior del sustrato ITO. Luego, se insertaron cables con los terminales de cobre expuestos (de 5-7 cm), de manera que uno de los terminales interactúe con el grafito depositado y se dejó secar a temperatura ambiente por 10 min. Se reforzó esta unión con una gota de pasta grafito de manera de proteger toda la conexión y secar el sustrato ITO a temperatura ambiente por 10 min.

- Se aplicó sobre la conexión grafito-cobre una película de esmalte de uñas transparente como aislamiento. Se dejó secar del mismo modo anterior.
- Finalmente, los electrodos ITO preparados fueron puestos en vasos de vidrio de 10 ó 25 mL según corresponda y lavados con metanol en un baño sonicador (Branson Digital Sonifier, modelo S450D) durante 5 min, a temperatura de 25 °C y potencia intermedia. Luego, se repitió el mismo procedimiento pero esta vez con agua Mili-Q obtenida en un sistema de purificación de agua LaboStar® 4-DI/UV.

### **2.3. Electrocrystalización de CaCO<sub>3</sub>.**

Para la realización de la electrocrystalización (EC) todo el material de vidrio fue lavado usando solución piraña elaborado en nuestro laboratorio:

- Para la EC se preparó soluciones de 25 mL de CaCl<sub>2</sub> (6 mM), NaHCO<sub>3</sub> (18 mM), NaCl (30 mM) en matraces aforados de 25 mL.
- Se mezclaron las soluciones anteriores y se vertieron en un vaso precipitado adecuado. Las concentraciones finales de los compuestos fueron las siguientes: CaCl<sub>2</sub> (2 mM), NaHCO<sub>3</sub> (6 mM), NaCl

(10 mM). La solución resultante fue agitada a 1000 rpm por 1 min en un agitador magnético *Heidolph*<sup>®</sup>.

- El pH de la solución resultante se ajustó a 7,8 mediante adición de gotas de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 mM.
- Luego, un volumen de 30 mL (medida en una probeta) de la solución anterior, fue puesta en una ECC de vidrio con tres compartimentos. La solución debe alcanzar a cada uno de los compartimentos de la ECC. Se selló las principales aberturas de la ECC con papel parafilm, dejando una salida para el gas.
- Se ajustó la manguera de O<sub>2</sub> en la ECC y se saturó durante 40 min. Luego de la saturación, se insertó en la ECC los electrodos de referencia (RE), electrodo auxiliar (EA) y el electrodo de trabajo (ET).
- Finalmente, todos los electrodos son conectados al Potenciostato-Galvanostato para iniciar la EC. Así, el proceso de EC y depósito de cristales de CaCO<sub>3</sub> sobre los sustratos ITO transcurre según las siguientes ecuaciones:

1.  $O_2 \rightleftharpoons O_{2(ads)}$
2.  $O_2 + H_2O + \bar{e} \rightleftharpoons O_2H_{(ads)} + OH^-$
3.  $O_2H_{(ads)} + \bar{e} \rightleftharpoons O_2H^-_{(ads)}$
4.  $O_2H^-_{(ads)} + H_2O \rightarrow H_2O_2 + OH^-$
5.  $HCO_3^- + OH^- \rightleftharpoons CO_3^{2-} + H_2O$
6.  $Ca^{2+} + CO_3^{2-} \rightarrow CaCO_3(s)$

### 3. Análisis morfológico y físico-químico de los cristales de CaCO<sub>3</sub>.

#### 3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología de los cristales CaCO<sub>3</sub> obtenidos en los ensayos de EC como también la de los sustratos ITO fueron estudiados mediante microscopía usando los microscopios electrónicos de barrido TESLA BS 343A y FEI Inspect F50. Los cristales de CaCO<sub>3</sub> depositados sobre el electrodo ITO fueron secados a temperatura ambiente, montados sobre soportes metálicos y recubiertos con una capa de oro ultrafina (12 nm) en un instrumento Sputter-EMS-550 (Electron Microscopy Science) antes de ser observados.

#### 3.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y RAMAN

Las técnicas de FTIR y Raman son técnicas espectroscópicas complementarias, las cuales presentan mecanismos de absorción y dispersión de la luz con la muestra analizada respectivamente. Ambas técnicas fueron utilizadas para evaluar el polimorfismo de los cristales de CaCO<sub>3</sub> obtenidos. FTIR determina la presencia de grupos químicos contenidos en una molécula o compuesto macromolecular a través de patrones de absorción de luz infrarroja característicos. Por su parte, Raman es una técnica espectroscópica de alta resolución complementaria a FTIR que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi

cualquier material o compuesto orgánico y/o inorgánico. Éste se basa en el examen de la luz dispersada por un material al incidir sobre él un haz de luz monocromático. Los resultados son mostrados en espectrogramas de coordenadas transmitancia (%) vs. número de longitudes de onda ( $\lambda$ ), los cuales serán comparados con espectros descritos para cada polimorfo de los cristales de  $\text{CaCO}_3$ .

### **4.3. 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  $\text{CaCO}_3$  obtenidos durante los ensayos de EC. XRD está basado 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 fueron mostrados en difractogramas de coordenadas U.I vs.  $2\theta$ , los cuales fueron comparados con difractogramas estándares de calcita, aragonita y vaterita usando la base de datos teóricos PCDWIN. Los difractogramas de XRD fueron obtenidos con un instrumento Siemens D-5000 con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ubicado en la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

## **RESULTADOS**

Los siguientes resultados fueron analizados mediante las curvas cronoamperométricas obtenidas de los

ensayos de EC, mientras que la morfología y fase cristalina de  $\text{CaCO}_3$  se determinó mediante SEM y XRD respectivamente. En primera instancia, se optimizó y realizó un ensayo EC de  $\text{CaCO}_3$  como control en ausencia del aditivo. Posteriormente, se realizaron ensayos de EC de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de APA. Se evaluó la eficiencia inhibitoria de APA sobre  $\text{CaCO}_3$ , al ser agregado antes o después de la saturación con oxígeno ( $\text{O}_2$ ) al sistema electroquímico. Una vez determinada la adición de APA previa saturación, se procedió a evaluar tres parámetros: concentración de APA, voltaje aplicado al sistema y tiempo de duración del ensayo. Por otro lado, se utilizó  $\text{Qo}$  para evaluar su electrodeposición como película (film), su distribución y forma sobre el sustrato ITO, y posterior uso en los ensayos de EC de  $\text{CaCO}_3$  en presencia y ausencia de APA. Microscopía electrónica de barrido (SEM) fue utilizada para analizar la superficie de todos los electrodos de trabajo y evaluar la morfología de los cristales obtenidos.

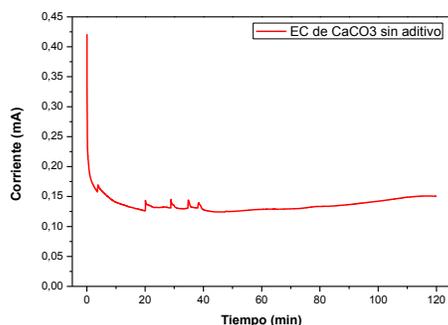
Adicionalmente, se realizó espectroscopía FT-IR y Raman para evaluar la electrodeposición de quitosano ( $\text{Qo}$ ) y la electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de ácido poliacrílico (APA) y quitosano ( $\text{Qo}$ ) sobre electrodo ITO. Tanto el sustrato ITO como los aditivos APA y  $\text{Qo}$  fueron comparados con  $\text{CaCO}_3$  comercial (Merck) para determinar la formación de  $\text{Qo}$  sobre la superficie del ITO y la electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$ . En general, la electrodeposición fue determinada complementariamente por ambas técnicas, sin embargo, debido a la cantidad de cristales depositados y

sensibilidad de los análisis sólo se logró caracterizar el sustrato ITO y los aditivos. Mayores detalles respecto de las bandas de absorción por FTIR y picos activos en Raman característicos se encuentran y describen en los anexos 2 y 3, respectivamente. Finalmente, se procedió a realizar análisis de difracción de rayos (XRD) a ciertas muestras seleccionadas de acuerdo a sus características morfológicas y así poder determinar la fase cristalina a las cuales pertenecían.

## 1. Electrocrystalización de $\text{CaCO}_3$ sobre sustrato ITO (control).

### 1.1 Curva cronoamperométrica.

Los parámetros utilizados en los ensayos de EC fueron: voltaje de  $-890$  mV durante 120 min. Se obtuvo una curva descendente durante los primeros minutos del ensayo, desde  $0,42$  hasta  $0,13$  mA, donde se logró estabilizar volviéndose asíntota alrededor de ese valor hasta el final del ensayo.

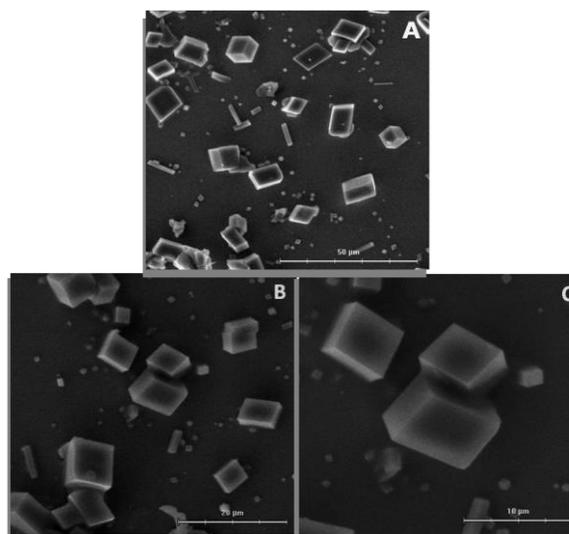


**Fig. 3.** Curva cronoamperométrica de EC de  $\text{CaCO}_3$  en ausencia de aditivos.

### 1.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Al analizar mediante SEM se observaron cristales en su mayoría con morfología romboédrica, con bordes bien definidos

característicos de calcita, con tamaños promedio de  $10 \mu\text{m}$ , distribuidos en todo el sustrato ITO. Junto a éstos, se observó cristales con forma de paralelepípedos alargados, como se muestra en la figura 4.A. Esto podría corresponder a alteraciones de las formas cristalinas durante su formación que no alcanzaron a estabilizar su cristalina final.

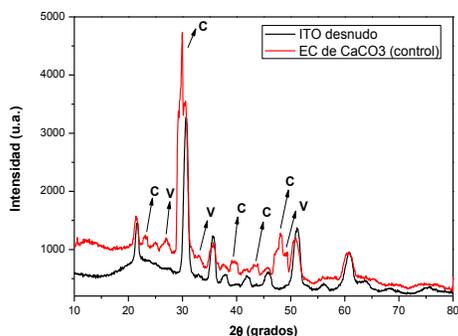


**Fig. 4.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO en ausencia de aditivos.

### 1.3 Difracción de rayos X.

Al analizar las formas cristalinas mediante difracción de rayos X (XRD) en el ensayo control se determinó en los difractogramas la presencia de picos característicos tanto de calcita como de vaterita, predominando la fase calcítica (Figura 5). Esto se ve reflejado principalmente por el pico obtenido a  $2\theta = 29^\circ$ , que es el pico más intenso de calcita (c). Junto a éstos, aparecen otros picos en los siguientes valores  $2\theta = 21^\circ$ ,  $39^\circ$ ,  $43^\circ$  y  $48^\circ$ . Por otro lado, aparecen picos menos marcados de vaterita (v), por

los cuales se evidencia la presencia de esta fase cristalina, sin ser la predominante en la muestra. Los valores de los picos observados fueron de  $2\theta = 27^\circ, 32^\circ$  y  $49^\circ$ . Los principales picos del sustrato ITO fueron de  $2\theta = 21^\circ, 30^\circ, 35^\circ$  y  $51^\circ$ .



**Fig. 5.** XRD de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sin aditivos (control).

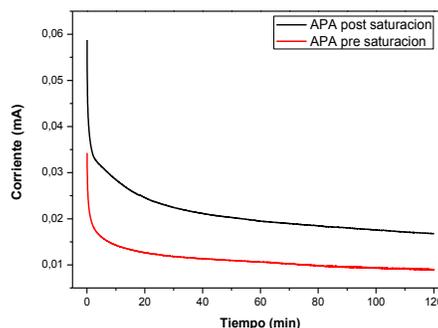
## 2. Electrocrystalización de $\text{CaCO}_3$ sobre sustrato ITO en presencia de APA. Efecto de la concentración del aditivo.

### 2.1 Curvas cronoamperométricas.

En la primera parte de los ensayos, se realizaron pruebas con adición de APA previo y posterior a la saturación con  $\text{O}_2$ , con los siguientes parámetros:  $-890$  mV, 120 min y 48 mg de APA (estándar). Con esto, se comparó la eficiencia inhibitoria de APA sobre  $\text{CaCO}_3$ .

En el ensayo con APA agregado después de la saturación con  $\text{O}_2$ , se observa que a medida que transcurre el tiempo del ensayo (120 min), disminuye el paso de corriente a través del ITO, desde 0,06 mA hasta 0,03 mA en los primeros dos minutos del ensayo. Posteriormente la curva se estabiliza alrededor de un valor de 0,025 mA. En el ensayo con APA agregado antes de la saturación con  $\text{O}_2$  se

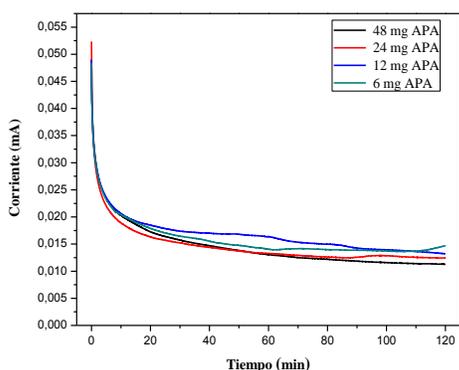
observó una curva similar pero ésta registró valores desde 0,035 mA hasta 0,015 mA en los primeros minutos de ensayo. Posteriormente la curva se estabiliza nuevamente alrededor de un valor de 0,01 mA.



**Fig. 6.** Curvas cronoamperométricas de EC con APA agregado antes y después de saturación con  $\text{O}_2$ .

Posteriormente, se evaluó el efecto de la concentración en los ensayos de EC, para esto se utilizaron cuatro concentraciones de APA en los ensayos: 6, 12, 24 y 48 mg. En el ensayo con 6 mg, se evidencia una curva similar a las anteriores, en las cuales durante los primeros tres minutos se observó un descenso importante desde 0,048 a 0,032 mA. Luego de esto, la curva cronoamperométrica describe una curva descendente constante que se estabiliza al llegar a 0.14 mA. Al utilizar una concentración de 12 mg en el ensayo de EC, se observó una curva cronoamperométrica similar a las anteriores, en la cual durante los primeros tres minutos se registró una caída drástica de la curva desde 0,049 a 0,032 mA. Luego de esto, la curva cronoamperométrica descende en forma constante hasta 0,013 mA. Al utilizar una concentración de 24 mg de APA durante

el ensayo de EC, se describe una curva cronoamperométrica similar a la anterior, pero que durante los primeros tres minutos alcanza un valor aún más bajo que el anterior de 0,031 mA, comenzando desde un valor de 0,05 mA. Luego, continúa descendiendo con pequeñas fluctuaciones hasta llegar a 0,012 mA. Finalmente, al utilizar una concentración de 48 mg de APA durante el ensayo de EC, se registró una curva cronoamperométrica que durante los tres minutos disminuye drásticamente la intensidad de corriente desde 0,05 mA hasta 0,035 mA. Luego, la curva describe un descenso más lento pero constante hasta llegar a el valor más bajo registrado de 0,015 mA.

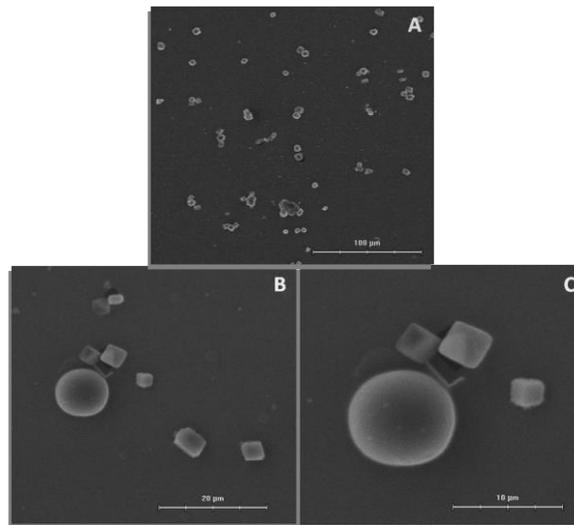


**Fig. 7.** Curvas cronoamperométricas de EC con distintas concentraciones de APA.

## 2.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

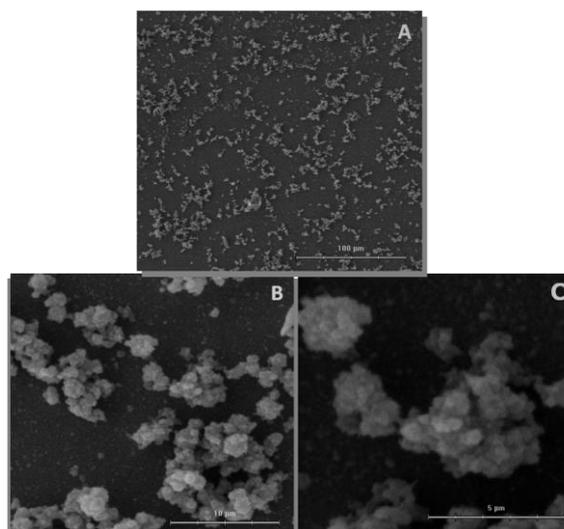
En el ensayo con APA agregado post saturación con  $O_2$ , se observan formas calcíicas pero esta vez presentan una morfología de cristales truncados, pierden los bordes definidos y tienen un tamaño inferior de  $5 \mu m$ . Además, se observan

cristales de formas esféricas con distintos tamaños.



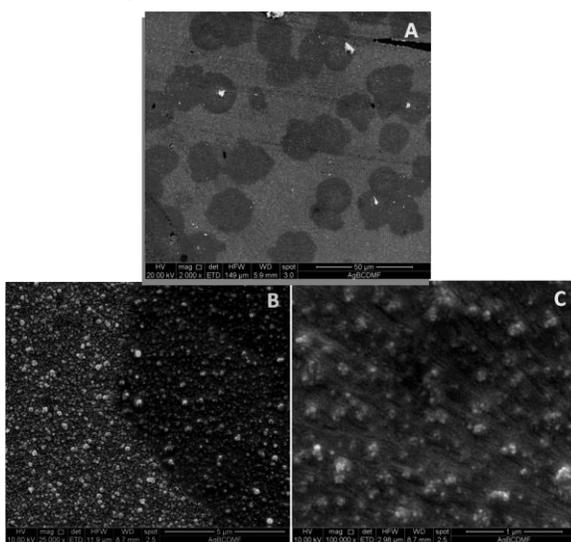
**Fig. 8.** SEM de  $CaCO_3$  mediante EC sobre el ITO con APA (48 mg) agregado después de saturar con  $O_2$ .

Por otro lado, al agregar APA en el sistema de presaturación con  $O_2$ , se observan aglomerados de cristales de tamaño nanométricos, que se distribuyen ampliamente sobre la superficie del ITO. No se observan otras formas cristalinas.



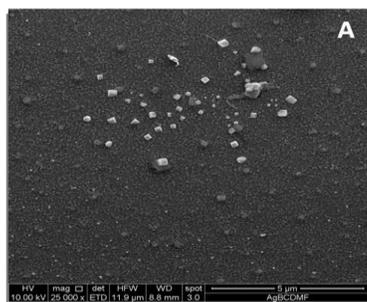
**Fig. 9.** SEM de  $CaCO_3$  mediante EC sobre el ITO con APA (48 mg) agregado antes de saturar con  $O_2$ .

Los cuatro ensayos a distintas concentraciones de APA, se evaluaron mediante SEM. En la muestra con 6 mg (Fig.10), se observan zonas más oscuras y claras sobre el depósito cristalino en el ITO. En ambas zonas se distinguen pequeños cúmulos de partículas de  $\text{CaCO}_3$ , siendo de mayor cantidad en las zonas claras. No se observan otras morfologías características  $\text{CaCO}_3$ .



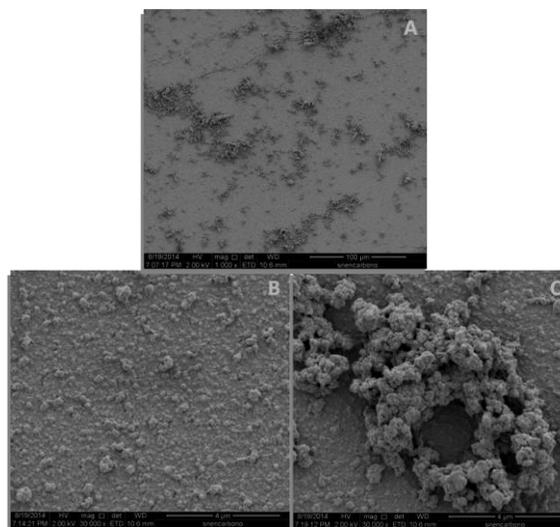
**Fig. 10.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con 6 mg de APA.

En el ensayo con 12 mg, se mantiene la capa de partículas  $\text{CaCO}_3$ , pero esta vez aparecen cristales de forma romboédrica, con bordes bien definidos, pero solo en ciertas zonas de la muestra (hallazgos).



**Fig. 11.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con 12 mg de APA.

En el ensayo con 24 mg (Fig.12), se observa una capa de partículas  $\text{CaCO}_3$  sobre el sustrato ITO. En ciertas zonas de la muestra se evidencian cúmulos de partículas de  $\text{CaCO}_3$  con morfologías irregulares características sobre el sustrato ITO.

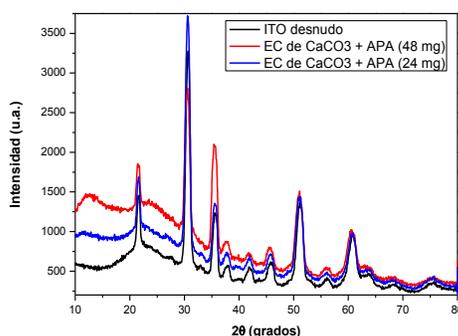


**Fig. 12.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con 24 mg de APA.

### 2.3 Difracción de rayos X.

Los difractogramas obtenidos mediante XRD demuestran la formación de  $\text{CaCO}_3$  amorfo (ACC). En la figura 13 se muestra un análisis comparativo de XRD de  $\text{CaCO}_3$  usando APA con concentraciones de 24 y 48 mg. Al usar 48 mg de APA (línea roja), el XRD muestra una curva descendente en el rango de  $2\theta = 20$  a  $30^\circ$ , zona donde se evidencia la presencia de CCA, sin la aparición de los picos más intensos de las tres fases cristalinas para  $\text{CaCO}_3$ , con un área bajo la curva mayor a los otros ensayos. Al usar la concentración de 24 mg (línea azul) en el ensayo de EC, el XRD muestra la misma trayectoria de la curva en el rango anterior, sin embargo, el

área bajo la curva es notoriamente menor que el anterior.



**Fig. 13.** XRD de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC usando APA a dos concentraciones.

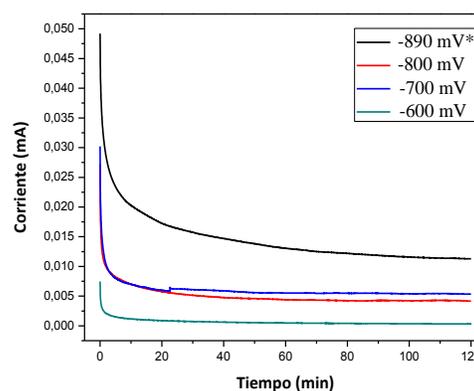
### 3. Electrocrystalización de $\text{CaCO}_3$ sobre sustrato ITO en presencia de APA. Efecto del voltaje aplicado.

#### 3.1 Curvas cronoamperométricas.

Se utilizaron cuatro voltajes para los ensayos: -600, -700, -800 y -890 mV (Fig.14). Al usar un voltaje de -600 mV, se registró una curva cronoamperométrica que desciende durante los primeros tres minutos desde 0,0075 mA a 0,0025 mA. Transcurrido el min 3 del ensayo, la curva cronoamperométrica se vuelve asíntota al eje de la abscisa estabilizándose durante el ensayo de EC. Al usar un voltaje de -700 mV, se observó comportamiento cronoamperométrico de la curva similar al anterior. Ésta se inicia desde 0,03 mA hasta alrededor de 0,01 mA en los primeros tres minutos. Transcurrido el cuarto min, la pendiente disminuye estabilizándose en un valor final de 0,005 mA.

Al usar un voltaje de -800 mV, se observó comportamiento cronoamperométrico similar al voltaje de -700 mV, pero ésta

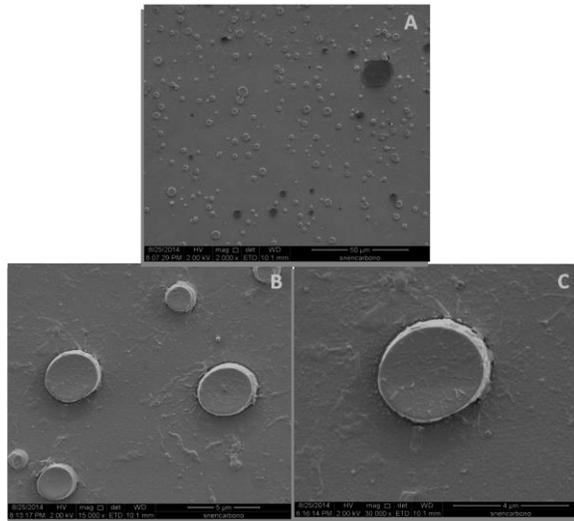
comienza desde 0.027 mA hasta llegar a valores menores de 0.01 mA en los primeros tres minutos. Luego, la pendiente disminuye desde el cuarto min logrando un valor mínimo de 0.004 mA hasta el final del ensayo. Finalmente, al usar un voltaje de -890 mV con una concentración de 48 mg, se observó comportamiento distinto de la curva cronoamperométrico, en el sentido de que ésta comienza (0.048 mA) y se estabiliza a valores mayores (0.015 mA) de corriente.



**Fig. 14.** Curvas cronoamperométricas usando distintos voltajes sobre el sistema.

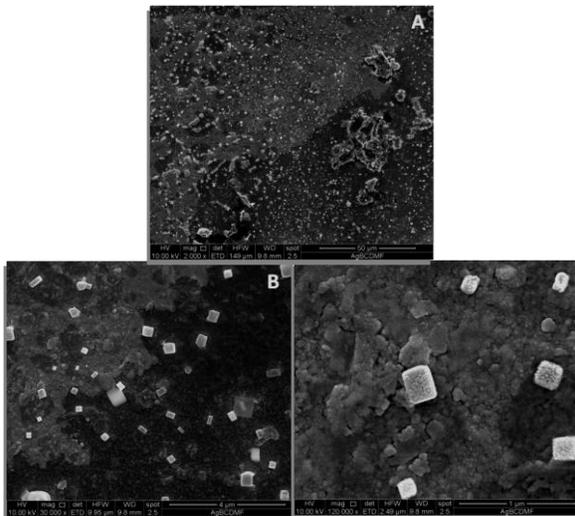
#### 3.2 Microscopía electrónica de barrido.

Los cuatro ensayos de EC usando distintos voltajes en el rango desde -600 a -890 mV, se evaluaron mediante SEM (Fig.15). Al usar -600 mV, se observó cristales perfectamente circulares (tipo torta) de  $\text{CaCO}_3$  con bordes definidos, que se encuentran homogéneamente distribuidos sobre la superficie del ITO.



**Fig. 15.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con APA, a un voltaje de -600 mV.

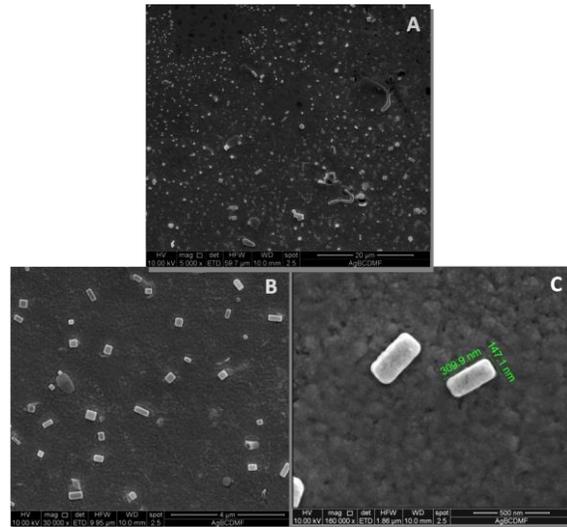
En el ensayo con -700 mV, se observa abundantes cristales con morfología romboédrica con tamaños nanométricos desde 200 nm hasta 400 nm, con bordes bien definidos y superficie rugosa.



**Fig. 16.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con APA, a un voltaje de -700 mV.

En el ensayo con -800 mV, se observó abundantes cristales con morfología romboédrica y paralelepípeda con tamaños nanométricos desde 200 nm

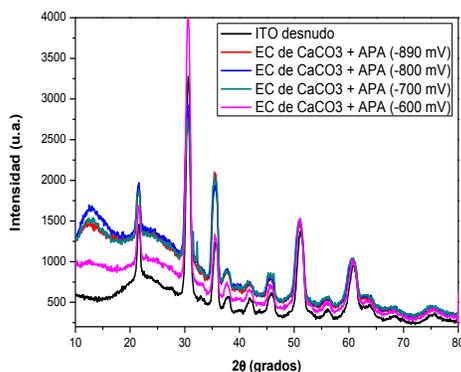
hasta 500 nm, con bordes bien definidos y superficie más compacta de la anterior.



**Fig. 17.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con APA, a un voltaje de -800 mV.

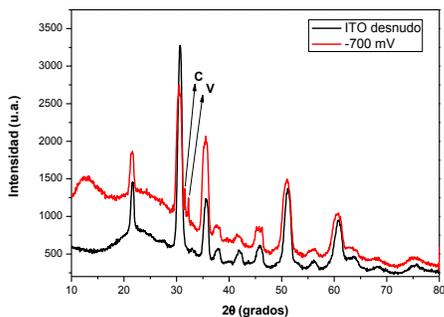
### 3.3 Difracción de rayos X.

Se utilizaron cuatro voltajes descritos (Fig.14) para analizar la estructura cristalina mediante análisis de XRD (Fig.18). En todos los ensayos a distintos voltajes, se determinó que predomina la fase amorfa de  $\text{CaCO}_3$ , como lo demuestra el difractograma en el rango  $2\theta = 20 - 30^\circ$ . Por otro lado, se observan curvas similares al utilizar los tres voltajes más altos del estudio. Sin embargo, el valor de voltaje menor de -600 mV (Fig. 18: línea rosada), se obtuvo un área bajo la curva menor y una curva menos pronunciada.



**Fig. 18.** XRD de ensayos de EC de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de APA a distintos voltajes.

Además cabe señalar, que se encontraron dos picos cristalinos en el ensayo a  $-700$  mV, los cuales se encuentra a  $2\theta = 31^\circ$  y  $2\theta = 32^\circ$  y corresponden a los polimorfos de calcita y vaterita, respectivamente.



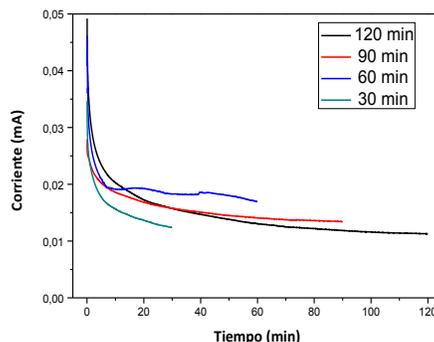
**Fig. 19.** XRD de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de APA. Voltaje aplicado  $-700$  mV.

#### 4. Electrocrystalización de $\text{CaCO}_3$ sobre sustrato ITO en presencia de APA. Efecto del tiempo.

##### 4.1 Curvas Cronoamperométricas.

Se utilizaron cuatro tiempos para los ensayos de EC de 30, 60, 90 y 120 min (Fig. 20). En el ensayo de EC de 30 min, la curva cronoamperométrica mostró que desciende durante los primeros minutos desde los  $0,035$  mA a  $0,015$  mA.

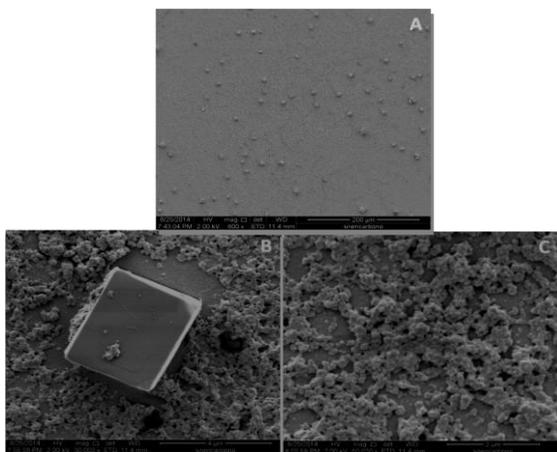
Transcurrido los primeros minutos, la curva cronoamperométrica pierde su pendiente, volviéndose asíntota con el eje de la abscisa hasta los  $0,01$  mA. En el ensayo de EC de 60 min, se muestra una curva similar, ésta se inicia a  $0,045$  mA llegando hasta  $0,02$  mA de corriente en los tres minutos. Desde el cuarto min, la pendiente disminuye y la curva se mantiene a los  $0,02$  mA hasta el final del ensayo de EC. Al usar 90 min, se describe una curva similar a las anteriores, pero comenzando desde  $0,03$  mA hasta llegar a los  $0,02$  mA en los tres minutos. Luego, la pendiente disminuye notablemente desde el cuarto min hasta el final del ensayo, alcanzando un valor mínimo de  $0,01$  mA. Finalmente, el cuarto ensayo de EC realizado con 120 min, corresponde al mismo usado para evaluar la concentración de  $48$  mg y voltaje de  $-890$  mV. Con este tiempo se observó que mantiene un patrón similar a los tres ensayos anteriores, solo que presenta un delta de corriente mayor en los primeros minutos.



**Fig. 20.** Curvas cronoamperométricas usando distintos tiempos en los ensayos.

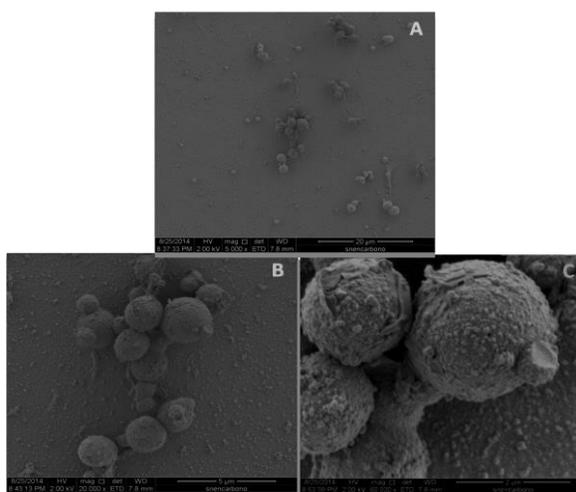
## 4.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

Los cuatro ensayos de EC a los tiempos mencionados, se analizaron con SEM (Figs. 21-23). Al usar 90 min, se observó una capa nanométrica de cristales típico al usar APA. Además, se observan cristales romboédricos de 4-5  $\mu\text{m}$ , distribuidos homogéneamente en el ITO.



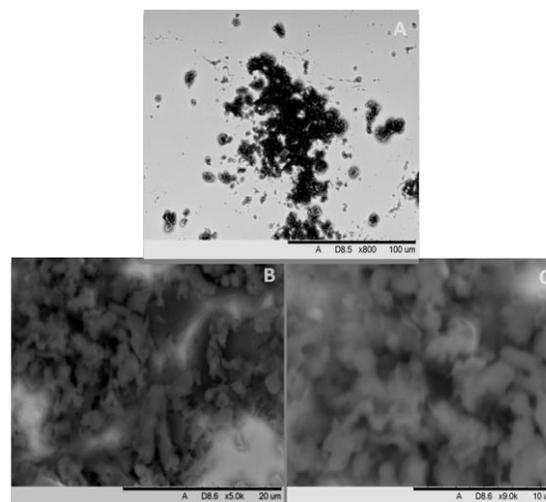
**Fig. 21.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con 48 mg de APA, a 90 min.

Con 60 min, se observó partículas esféricas de  $\text{CaCO}_3$  de 2-3  $\mu\text{m}$  sobre el ITO, además de la capa de partículas que cubre el sustrato.



**Fig. 22.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con 48 mg de APA, a 60 min.

Al usar 30 min, ocurre algo similar a lo observado en las muestras anteriores, donde es clara la presencia de una capa de partículas irregulares de  $\text{CaCO}_3$  distribuidas sobre la superficie del ITO. Esporádicamente se observan cristales calcínicos sobre el ITO.

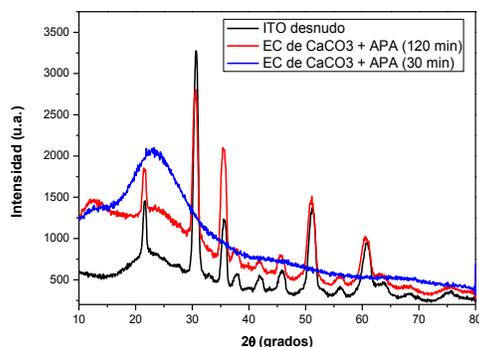


**Fig. 23.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre el ITO con 48 mg de APA, a 30 min.

## 4.3 Difracción de rayos X.

Dos de los cuatro ensayos de EC realizados a los tiempos mencionados, se evaluaron mediante XRD (Figs. 24). Al usar 30 min, se observa que el espectro de XRD corresponde a un comportamiento amorfo característico de un mineral, lo cual demuestra la formación de CCA (Fig. 24: Línea azul). El rango del halo amorfo del CCA se encontró entre los valores  $2\theta = 15-35^\circ$ , donde generalmente se encuentran los picos cristalinos característicos de calcita, aragonita y vaterita del para  $\text{CaCO}_3$ . Al usar 120 min, se observó un difractograma con una región amorfa menor (Fig. 24: Línea roja). Se evidenció indicios de picos

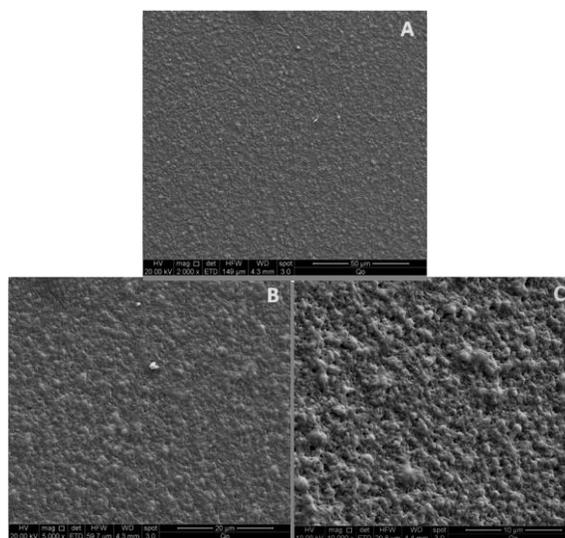
cristalinos para  $\text{CaCO}_3$  sobre el ITO, los cuales fueron coincidentes con los picos del sustrato ITO, debido a que el haz atraviesa una capa delgada de cristales depositados sobre el sustrato ITO. Esto sugiere que a 30 min existe un mayor depósito de CCA sobre el sustrato.



**Fig. 24.** XRD de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC usando APA a distintos tiempos.

### 5. Electrodeposición de Qo sobre sustrato ITO.

Mediante la técnica de cronoamperometría se logró electrodepositar una película (film) de Qo sobre los electrodos ITO (Fig. 24). Al observar mediante SEM la capa de Qo obtenida, se observó una cubierta compacta con una superficie irregular con protuberancias nanométricas del polímero a lo largo de todo el sustrato ITO.

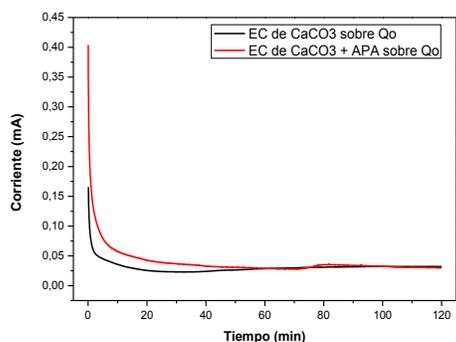


**Fig. 25.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante electrodeposición de Qo sobre el ITO.

### 6. Electrocrystalización de $\text{CaCO}_3$ sobre Qo previo electrodeposición en sustrato ITO. Ensayos en presencia y ausencia de APA.

#### 6.1 Curvas cronoamperométricas.

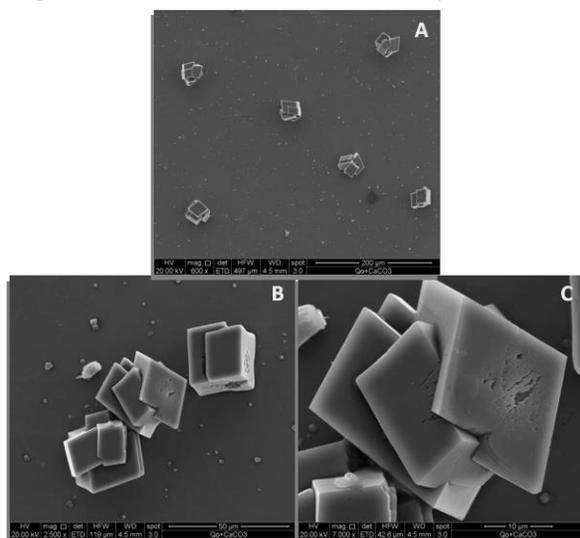
Se evaluó el comportamiento de la respuesta cronoamperométrica en los ensayos de EC de  $\text{CaCO}_3$ , con Qo electrodepositado, en presencia y ausencia de APA (Fig. 26). En el ensayo de EC de  $\text{CaCO}_3$  sobre Qo (Fig. 26: Línea negra) se observó que en los primeros minutos, disminuye el paso de corriente a través del ITO desde 0,16 mA hasta valores cercanos a 0,05 mA, estabilizándose la curva cronoamperométrica alrededor de 0,04 mA. En el ensayo de EC de  $\text{CaCO}_3$  sobre Qo en presencia de APA (Fig. 26: Línea roja) se observó una curva similar a la anterior, pero ésta inicia a una corriente mayor de 0,4 mA, estabilizándose de la misma forma alrededor de 0,04 mA.



**Fig. 26.** Curvas cronoamperométricas comparando la EC de  $\text{CaCO}_3$  sobre Qo en presencia y ausencia de APA.

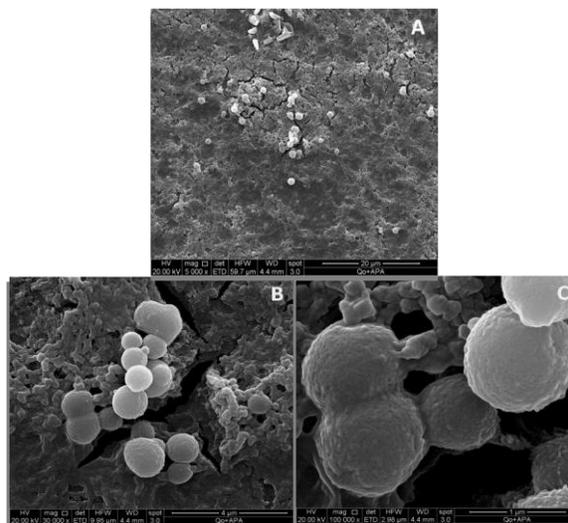
## 6.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM).

En el ensayo de EC de  $\text{CaCO}_3$  en ausencia de APA, se observó la presencia de cristales con morfología romboédrica, los cuales se encontraban aglomerados, estos cristales presentaron bordes bien definidos como se muestra en la figura 27. El tamaño promedio de los cristales aglomerados varió entre 20 a 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 27.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre Qo previamente electrodepositado sobre ITO, en ausencia de APA.

Por otro lado, en el ensayo de EC de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de APA, se observaron cristales con morfología esférica definida, con tamaños promedios de 1-2  $\mu\text{m}$ , acumulados en ciertos sectores de la muestra. Se evidenció que algunos cristales se encuentran unidos, como se muestra en la Figura 28.C.

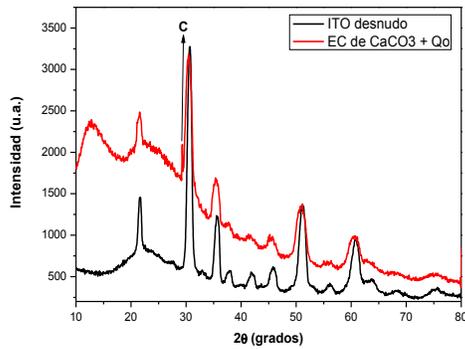


**Fig. 28.** SEM de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC sobre Qo previamente electrodepositado sobre ITO, en presencia de APA.

## 6.3 Difracción de rayos X.

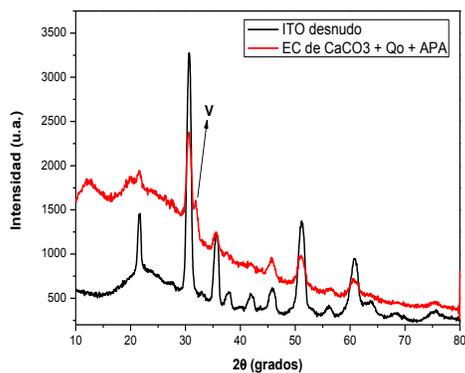
Se determinó el polimorfismo de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  obtenidos en los ensayos de EC de  $\text{CaCO}_3$  sobre Qo en ausencia (Fig. 29) y presencia de APA (Fig. 30). El XRD de  $\text{CaCO}_3$  en presencia sólo de Qo mostró un difractograma modificado respecto del XRD para el ITO desnudo en el rango  $2\theta =$  entre  $10^\circ - 25^\circ$ , lo cual es debido por la presencia del depósito del film de Qo. Además, se determinó el pico de la fase {104} más intenso de calcita a  $2\theta = 29^\circ$ , demostrando con esto que los cristales observados mediante SEM corresponden a calcita.

## DISCUSIÓN



**Fig. 29.** XRD de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC en presencia de Qo.

Por otro lado, el XRD de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de Qo y simultáneamente APA mostró un difractograma característico de Qo levemente modificado respecto del XRD del ITO desnudo en el rango  $2\theta =$  entre  $20^\circ$ - $25^\circ$ , lo cual es debido por ambos componentes. Es importante destacar, sin embargo, que se determinó el pico de la fase {102} más intenso de vaterita a  $2\theta = 32^\circ$ , demostrando con esto que los cristales esféricos observados mediante SEM (ver Fig. 28) corresponden a vaterita.



**Fig. 30.** XRD de  $\text{CaCO}_3$  mediante EC en presencia de Qo y APA.

Existen diversos estudios respecto a los métodos de cristalización de  $\text{CaCO}_3$ . En nuestro trabajo, se evidencia un control tanto de la morfología como de las estructuras cristalográficas de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  al realizar ensayos de electrocristalización sobre sustratos ITO, ya sea en ausencia o en presencia de APA y/o Qo. Las variaciones observadas fueron desde una forma romboédrica típica de calcita, pasando a formas menos definidas, esféricas o aglomerados de partículas de  $\text{CaCO}_3$ . A partir de estos resultados experimentales y análisis mediante SEM y XRD realizados resulta importante resaltar el efecto de cada aditivo en determinados ensayos. En primer lugar, el APA, como se menciona en la bibliografía es capaz de modificar tanto la fase cristalina como la morfología de los cristales. En relación a lo anterior, se evaluaron distintos parámetros para determinar la influencia de cada uno de estos en los ensayo de EC.

Al determinar la posibilidad de utilizar APA previo o posterior a la saturación del sistema con  $\text{O}_2$ , observamos que al adicionar previamente APA, se obtiene una mejor respuesta inhibitoria sobre la síntesis de  $\text{CaCO}_3$ . Esta observación apoya lo reportado previamente por Huang *et al.* (2008), quienes utilizaron un método retardado de adición de APA al sistema, demostrando que al añadir APA inmediatamente al preparar la solución, se obtuvo  $\text{CaCO}_3$  en su estado amorfo, tal cual como fue observado (Fig. 9). Por el contrario, al retardar la adición de APA al sistema se obtienen cristales de vaterita,

ya que durante el minuto 1 de ensayo ya comienza la unión de iones carbonato con los iones calcio.

Durante los ensayos de variación en la concentración de APA, se observa que las morfologías varían desde formas esféricas a aglomerados de pequeños cristales. Según Mantilaka *et al.* (2014), al aumentar la concentración de APA en la solución provoca junto a la formación de CCA en forma mayoritaria, la aparición de formas cristalinas en menor proporción como calcita o vaterita. Ellos describen por ejemplo que, la vaterita predominaría a una determinada concentración, por lo que al aumentar o disminuir aquella concentración provocará que no aparezca en la muestra, lo que permite proponer que cada fase cristalina tendrá una concentración óptima de APA cuando este aditivo es incluido en la reacción. En este trabajo se obtuvo una respuesta de las curvas cronoamperométricas similares con los cuatro ensayos a distinta concentración. Así lo demuestran las imágenes SEM, en donde se observa un patrón similar, con la presencia de una capa de partículas de  $\text{CaCO}_3$ , del tipo amorfo.

En el caso cuando se varía el voltaje aplicado en el sistema, la literatura indica que el valor óptimo para la formación de  $\text{CaCO}_3$  se alcanza cercano a los  $-0.86\text{ V}$  (Pavez *et al.*, 2005), mientras que Euvrad *et al.* (2000) indican que el valor utilizado en sus ensayos fue de  $-1.0\text{ V}$ , lo que permite suponer que al disminuir el valor del voltaje desde un valor cercano a  $-0.86\text{ V}$ , se obtendrá una menor cantidad de cristales sobre el sustrato ITO en esos ensayos, debido a que se encuentra menos

favorecida la reacción de reducción de  $\text{O}_2$ . En relación a lo anterior, las curvas cronoamperométricas muestran que a  $-890\text{ mV}$ , la corriente disminuye más drásticamente que en los ensayos con voltajes bajo, lo cual resulta ideal para la cristalización, sugiriendo que en ese ensayo se sintetizaron una mayor cantidad de cristales. Pavez *et al.*, (2005) explican que la curva comienza a presentar una pendiente negativa debido a la formación de cristales de  $\text{CaCO}_3$  no conductores sobre el electrodo. Se sospecha que el hecho de ser menos favorecida la formación de cristales, también se modifique la fase cristalina de estos mismos.

Respecto de la variación del tiempo del ensayo, no existe bibliografía previa asociada a este parámetro. Sin embargo, en nuestro estudio hemos determinado que independiente de cuanto dure el ensayo, todos los procesos de formación y agregación de cristales ocurren alrededor de los primeros cuatro minutos, por lo que resulta poco significativo el tiempo que transcurre posterior a éste.

Por otro lado, al usar biopolímeros como aditivos y/o templates en ensayos de electrocristalización ha sido un tópico muy poco explorado en esta área. Nuestros resultados indican que al utilizar Qo con el método electroquímico, hemos logrado determinar que efectivamente modifica la morfología de los cristales  $\text{CaCO}_3$ , al igual que lo reportado por ejemplo por Yang *et al.* (2010) con el método clásico de difusión de gases, en el cual estudia el efecto de la concentración de carboximetil Qo, donde plantea que a mayores concentraciones de polímero los

cristales obtenidos son en su mayoría tipo calcita, mientras que a menores concentraciones la formación de cristales tiende a estabilizarse a vaterita. Nuestro ensayo es concordante con lo descrito ya que el polimorfo que predominó fue calcita, utilizando una alta concentración de Qo (1g/0,1L), mientras que el estudio evaluó pequeñas concentraciones, entre 0,5 y 1,5 g/L.

Finalmente, en relación a los resultados obtenidos en el ensayo de EC CaCO<sub>3</sub> en presencia de Qo electrodepositado y APA, observamos que los cristales resultantes corresponden a vaterita. Este resultado es consistente con las observaciones por He *et al.* (2009), quienes explican que cuando existen concentraciones mayores a  $1 \times 10^{-2}$  g/L de APA en solución, la acción de este es el factor dominante en la reacción, cualquiera sea la concentración de Qo, por lo que el efecto de APA predomina en la formación del polimorfo vaterita.

## CONCLUSIONES

El método de EC resultó ser efectivo en la síntesis de cristales CaCO<sub>3</sub>. Según las curvas cronoamperométricas, en todos los ensayos ocurre un descenso brusco de la corriente en los primeros minutos debido a la formación de CaCO<sub>3</sub> sobre el ITO, lo cual aumenta la resistencia al paso de la misma por el electrodo. Se comprobó que en los ensayos de EC en ausencia de aditivos, la morfología romboédrica es la predominante, y que el tamaño promedio de esos cristales fue de 10 μm.

La fase y la morfología de los cristales CaCO<sub>3</sub> están fuertemente afectados al

agregar APA durante los ensayos de EC. Al estudiar la adición de APA en los ensayos de pre y post-saturación con O<sub>2</sub> se observó que APA favorece el efecto inhibitorio sobre los cristales de CaCO<sub>3</sub>, evitando la formación de calcita en el sistema de presaturación, lo cual está en contraposición respecto del ensayo post saturación, donde se observó un efecto menos marcado de APA.

En la evaluación de los parámetros durante los ensayos de EC se determinó que: al variar la concentración de APA en el sistema, desde 6 a 48 mg, no se obtuvo diferencias significativas en los cristales, donde predominó la presencia de una capa de partículas CaCO<sub>3</sub>, sin presencia de morfologías definidas. En estos ensayos se demostró la formación de CCA mediante XRD.

En el caso de variación de voltaje, desde el valor ideal para este tipo de ensayos, -890 mV, hasta llegar a -600 mV, resultó ser el parámetro que afectó en mayor proporción la morfología de los cristales, ya que en el ensayo con voltaje ideal se obtuvo una capa de partículas con morfología irregular, pasando luego por los ensayos de -800 y -700 mV, donde se observó pequeños cristales romboédricos (1 μm), para terminar con una morfología tipo torta en el ensayo de -600 mV. Al evaluar las muestras mediante XRD, se determinó que en todas se encuentra CCA como componente principal, sin embargo, aparecieron otras fases cristalinas como vaterita o calcita en algunos ensayos.

Al estudiar el efecto tiempo en los ensayos de EC, desde 30 a 120 min, se determinó que no existían diferencias significativas en la morfología de los

cristales, acá predominó la formación de una capa de partículas sin formas definidas. Sin embargo, el análisis por XRD determinó que en ensayos más cortos se obtuvo una cantidad de partículas mayor y más amplia de CCA.

Por otra parte, se determinó que es factible electrodepositar películas de Qo sobre un sustrato ITO, mediante la técnica de cronoamperometría. Al realizar ensayos de EC de CaCO<sub>3</sub> en presencia de estas láminas de Qo, se determinó que Qo afectó directamente en la disposición, morfología y superposición de los cristales, manteniéndose la fase calcítica (ver Fig. 27).

Finalmente, al usar simultáneamente APA y Qo en un mismo ensayo, se determinó la formación de cristales esféricos tipo vaterita (ver Fig. 28), lo cual fue confirmado mediante XRD.

## BIBLIOGRAFÍA

**AL-HAMZAH, A.; EAST, C.; DOHERTY, W.; FELLOWS, C.** 2014. Inhibition of homogenous formation of calcium carbonate by poly(acrylic acid). The effect of molar mass and end-group functionality. *Desalination* 338. 93-105.

**CHEN, X.; QIAN, X.; AN, X.** 2011. Using calcium carbonate whiskers as papermaking filler. *BioResources* 6(3). 2435-2447.

**EUVRARD, M.; FILIATRE, C.; CRAUSAZ, E.** 2000. A cell to study in situ electrocrystallization of calcium carbonate. *J. Cryst. Growth*, 216 466-474.

**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.*14. 2206-2212.

**GURU PS.; DASH S.** 2014. Sorption on eggshell waste-A review on ultrastructure, biomineralization and other applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* Available online 6 January 2014. In Press, Corrected Proof.

**HE, L.; XUE, R.; SONG, R.** 2009. Formation of calcium carbonate films on chitosan substrates in the presence of polyacrylic acid. *Journal of Solid State Chemistry* 182 1082-1087.

**HUANG, S.; NAKA, K.; CHUJO, Y.** 2008. Effect of molecular weights of poly(acrylic acid) on crystallization of calcium carbonate by the delayed addition method. *Polymer Journal*. 40 (2) 154-162.

**HUANG, S.; NAKA, K.; CHUJO, Y.** 2007. A Carbonate controlled-addition method for amorphous calcium carbonate spheres stabilized by poly(acrylic acid)s. *Langmuir* 23. 12086-12095.

**LIANG, P.; ZHAO, Y.; SHEN, Q.; WANG, D.; XU, D.** 2004. The effect of carboxymethyl chitosan on the precipitation of calcium carbonate. *J. of Cryst. Growth*. 261, 571-576.

**MANTILAKA, M.; RAJAPAKSE, R.; KARUNARATNE, D.; PITAWALA, H.** 2013. Preparation of amorphous calcium carbonate nanoparticles from

impure dolomitic marble with the aid of poly(acrylic acid) as a stabilizer. *Adv. Powder Technol.* Vol. 25 (2). 591-598.

**NEIRA-CARRILLO, A.; ACEVEDO, D.; MIRAS, M.; BARBERO, C.; GEBAUER, D.; CÖLFEN, H.; ARIAS, J.** 2008. Influence of Conducting Polymers Based on Carboxylated Polyaniline on *In Vitro* CaCO<sub>3</sub> Crystallization. *Langmuir.* 24. 12496-12507.

**PAI, R.; PILLAI, S.** 2008. Divalent Cation-Induced Variations in Polyelectrolyte Conformation and Controlling Calcite Morphologies: Direct Observation of the Phase Transition by Atomic Force Microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (39). 13074-13078.

**PAVEZ, J.; SILVA, J.; MELO, F.** 2004. Homogeneous calcium carbonate coating obtained by electrodeposition: in situ atomic force microscope observations. *Electrochim. Acta.* Vol. 50 (16-17). 3488-3494.

**QI, L.; CÖLFEN, H.; ANTONIETTI, M.; LI, M.; HOPWOOD, J.; ASHLEY, A.; MANN, S.** 2001. Formation of BaSO<sub>4</sub> fibres with morphological complexity in aqueous polymer solutions. *Chem. Eur. J.* 7 (16). 3526-3532.

**SUKHORUKOV, G.; VOLODKIN, D.; GÜNTHER, A.; PETROV, A.; SHENOY, D.; MÖHWALD, H.** 2004. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds. *J. Mater. Chem.* 14. 2073-2081.

**TORO, P.; QUIJADA, R.; YAZDANI-PEDRAM, M.; ARIAS, J.** 2007. Eggshell, a new bio-filler for polypropylene composites. *Mater. Lett.* 61. 4347-4350.

**WEI, W.; MA, G.; HU, G.; YU, D.; MCLEISH, T.; SU, Z.; SHEN, Z.** 2008. Preparation of hierarchical hollow CaCO<sub>3</sub> particles and the application as anticancer Drug Carrier. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (47). 15808-15810.

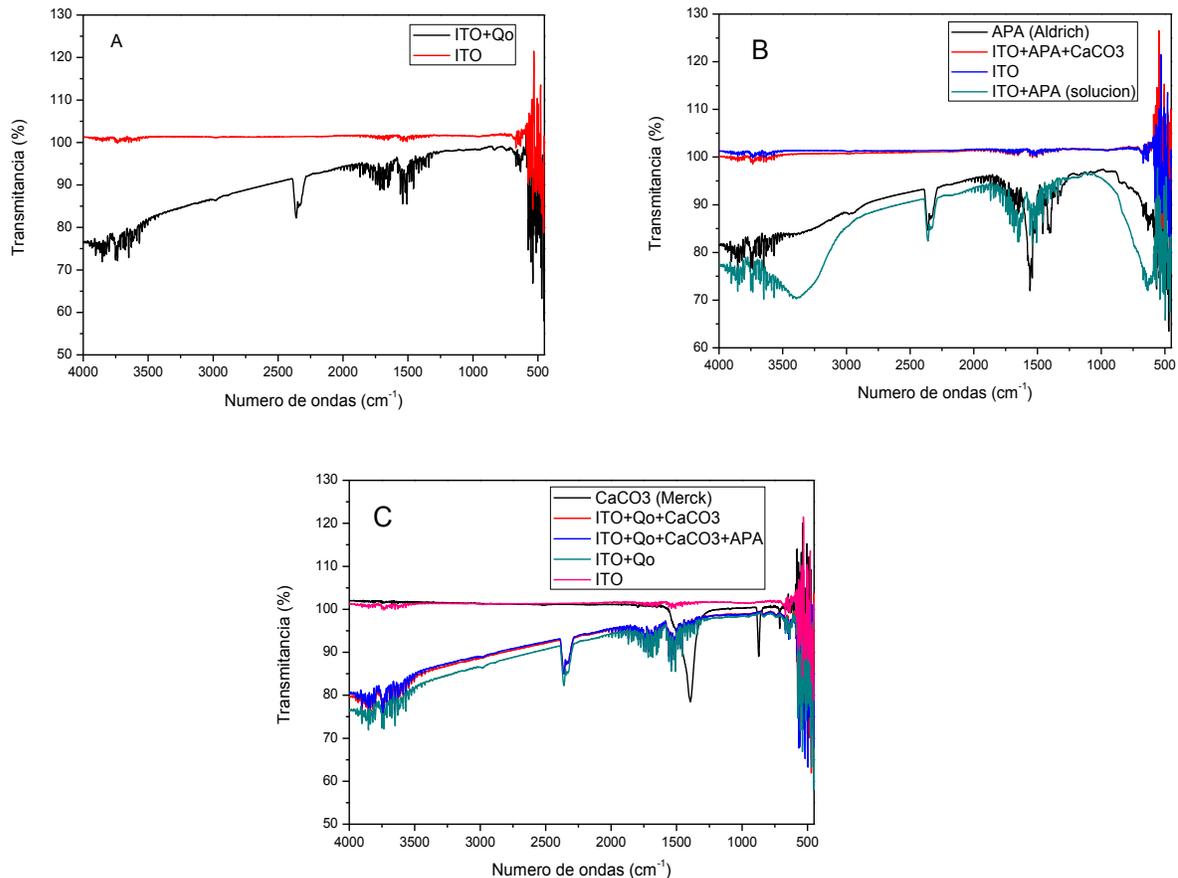
**YANG, X.; XU, G.; CHEN, Y.; LIU, T.; MAO, H.; SUI, W.; AO, M.; HE, F.** 2010. The influence of O-carboxymethylchitosan on the crystallization of calcium carbonate. *Powder Technol.* 204. 228-235.

**ZHANG, F.; WANG, J.; ZHENGCHI, H.; MING, Y.; LEIDONG, X.** 2006. Study of growth of calcium carbonate crystals on chitosan film. *Mater. Design.* 27, 422-426.

## ANEXO 1: ÍNDICE DE FIGURAS

Número de Figuras y Descripción de Leyendas	Pág.
<b>Fig. 1.</b> Estructura molecular del quitosano.	9
<b>Fig. 2.</b> Método de adición controlada de carbonato.	11
<b>Fig. 3.</b> Curva cronoamperométrica de EC de CaCO <sub>3</sub> en ausencia de aditivos.	15
<b>Fig. 4.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO en ausencia de aditivos.	15
<b>Fig. 5.</b> XRD de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sin aditivos (control).	16
<b>Fig. 6.</b> Curvas cronoamperométricas de EC con APA agregado antes y después de saturación con O <sub>2</sub> .	16
<b>Fig. 7.</b> Curvas cronoamperométricas de EC con distintas concentraciones de APA.	17
<b>Fig. 8.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con APA (48 mg) agregado después de saturar con O <sub>2</sub> .	17
<b>Fig. 9.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con APA (48 mg) agregado antes de saturar con O <sub>2</sub> .	18
<b>Fig. 10.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con 6 mg de APA.	18
<b>Fig. 11.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con 12 mg de APA.	18
<b>Fig. 12.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con 24 mg de APA.	18
<b>Fig. 13.</b> XRD de CaCO <sub>3</sub> mediante EC usando APA a dos concentraciones.	19
<b>Fig. 14.</b> Curvas cronoamperométricas usando distintos voltajes sobre el sistema.	20
<b>Fig. 15.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con APA, a un voltaje de -600 mV.	20
<b>Fig. 16.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con APA, a un voltaje de -700 mV	20
<b>Fig. 17.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con APA, a un voltaje de -800 mV	20
<b>Fig. 18.</b> XRD de ensayos de EC de CaCO <sub>3</sub> en presencia de APA a distintos voltajes.	21
<b>Fig. 19.</b> XRD de CaCO <sub>3</sub> en presencia de APA. Voltaje aplicado -700 mV.	21
<b>Fig. 20.</b> Curvas cronoamperométricas usando distintos tiempos en los ensayos.	22
<b>Fig. 21.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con 48 mg de APA a 90 min.	22
<b>Fig. 22.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con 48 mg de APA a 60 min.	22
<b>Fig. 23.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre el ITO con 48 mg de APA a 30 min.	22
<b>Fig. 24.</b> XRD de CaCO <sub>3</sub> mediante EC usando APA a distintos tiempos.	23
<b>Fig. 25.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante electrodeposición de Qo sobre el ITO.	23
<b>Fig. 26.</b> Curvas cronoamperométricas comparando la EC de CaCO <sub>3</sub> sobre Qo en presencia y ausencia de APA.	24
<b>Fig. 27.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre Qo previamente electrodepositado sobre ITO, en ausencia de APA.	24
<b>Fig. 28.</b> SEM de CaCO <sub>3</sub> mediante EC sobre Qo previamente electrodepositado sobre ITO, en presencia de APA.	24
<b>Fig. 29.</b> XRD de CaCO <sub>3</sub> mediante EC en presencia de Qo.	25
<b>Fig. 30.</b> XRD de CaCO <sub>3</sub> mediante EC en presencia de Qo y APA.	25

## ANEXO 2: ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO MEDIANTE FT-IR

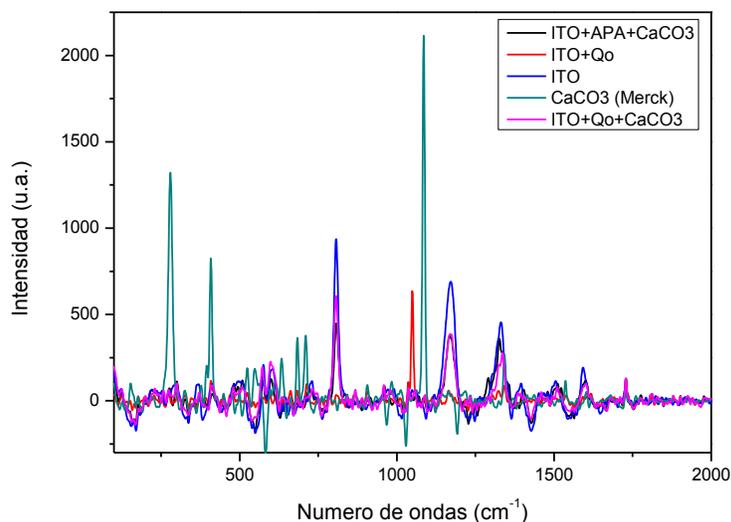


**Fig. 1.** Espectros de FTIR de electrodeposición de quitosano (Qo) sobre electrodo ITO (A), Espectros de FTIR de electrocristalización de CaCO<sub>3</sub> en presencia de ácido poliacrílico (APA) sobre electrodo ITO (B), Espectros de FTIR de electrocristalización de CaCO<sub>3</sub> en presencia de ácido poliacrílico (APA) y quitosano (Qo) sobre electrodo ITO (C).

Las mediciones por FT-IR mostraron bandas de absorción características tanto para APA como para Qo. No se evidenciaron bandas similares en ensayos de electrocristalización de CaCO<sub>3</sub> usando CaCO<sub>3</sub> comercial (Fig. 1.C). Sin embargo, se encontraron bandas de absorción de APA y Qo comercial en los ensayos en presencia de estos aditivos.

En el espectro de FT-IR (Fig. 1.A) se determinaron las bandas de absorción de Qo sobre el sustrato ITO correspondiente a 3853 cm<sup>-1</sup>, 3735 cm<sup>-1</sup>, 3649 cm<sup>-1</sup>, 1541 cm<sup>-1</sup>, 1507 cm<sup>-1</sup> y 1457 cm<sup>-1</sup>. En la Fig. 1.B, se determinaron las bandas de absorción características de APA, tanto en polvo como en solución: APA (Aldrich): 3751 cm<sup>-1</sup>, 3649 cm<sup>-1</sup>, 3367 cm<sup>-1</sup>, 1558 cm<sup>-1</sup>, 1457 cm<sup>-1</sup>, 1404 cm<sup>-1</sup> y 1340 cm<sup>-1</sup>, siendo la señal a 1558 cm<sup>-1</sup> la más intensa; APA en solución registró las señales de 3853 cm<sup>-1</sup>, 3751 cm<sup>-1</sup>, 3736 cm<sup>-1</sup>, 3649 cm<sup>-1</sup>, 3567 cm<sup>-1</sup>, 1647 cm<sup>-1</sup>, 1541 cm<sup>-1</sup>, 1507 cm<sup>-1</sup> y 1458 cm<sup>-1</sup>, además de una banda de absorción pronunciada entre 3500-3000 cm<sup>-1</sup>. Finalmente, en la Fig. 1.C, se determinaron las bandas de absorción de CaCO<sub>3</sub> (Merck) a 1394 cm<sup>-1</sup>, 871 cm<sup>-1</sup> y 712 cm<sup>-1</sup>.

### ANEXO 3: ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO MEDIANTE RAMAN



**Fig. 1.** Espectros de Raman de electrodeposición de quitosano (Qo) y electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$  tanto en presencia de ácido poliacrílico (APA) como de Qo sobre electrodo ITO.

Las mediciones por la técnica Raman mostraron espectros con señales característicos de ITO desnudo,  $\text{CaCO}_3$  comercial (Merck) y Qo sobre sustrato ITO. Sin embargo, Raman no fue capaz de detectar señales diferentes en ensayos de electrocristalización de  $\text{CaCO}_3$  en presencia de Qo o APA. Los picos de intensidad obtenidos para el sustrato ITO fue de  $807 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1171 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1332 \text{ cm}^{-1}$  y  $1593 \text{ cm}^{-1}$  y para  $\text{CaCO}_3$  (Merck) de  $280 \text{ cm}^{-1}$ ,  $408 \text{ cm}^{-1}$ ,  $684 \text{ cm}^{-1}$ ,  $710 \text{ cm}^{-1}$  y  $1085 \text{ cm}^{-1}$ , siendo este último la señal más intensa. Al evaluar la electrodeposición de Qo, la única señal Raman obtenida fue a  $1049 \text{ cm}^{-1}$  (Línea roja: ITO+Qo).