



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

EFFECTO DE LA LECITINA SOBRE LA CRISTALIZACION *IN VITRO* DEL CARBONATO DE CALCIO

Carolina Andrea Rojas Beato

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

Profesor guía: María Soledad Fernández
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile
Financiamiento Proyecto FONDECYT 1120173 y Proyecto 5788
Universidad de Chile-Universidad de Bolonia.
SANTIAGO, CHILE
2014



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

EFFECTO DE LA LECITINA SOBRE LA CRISTALIZACION *IN VITRO* DEL CARBONATO DE CALCIO

Carolina Andrea Rojas Beato

Nota Final.....

Prof. Guía:.....

Profesor Corrector:.....

Profesor Corrector:.....

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

Profesor guía: María Soledad Fernández
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile
Financiamiento Proyecto FONDECYT 1120173 y Proyecto 5788
Universidad de Chile-Universidad de Bolonia.
SANTIAGO, CHILE
2014

AGRADECIMIENTOS

En esta instancia, en donde finaliza una gran etapa de mi vida, no puedo dejar de agradecer primero que todo a mi madre, por ser mi pilar, apoyo y sustento durante toda mi vida. Por tener la palabra precisa en los momentos de dificultad, por animarme y apoyarme en todos mis proyectos, y por alegrarse y celebrar juntas cada uno de mis logros.

Asimismo, quiero dar las gracias a los docentes con lo que compartí tanto en las aulas como en este proceso de memoria de título. Particularmente, me gustaría destacar a la Dra. María Soledad Fernández, Dr. José Luis Arias, Dr. José Ignacio Arias y Dr. Francisco Carvallo, por su dedicación, entrega y enorme calidad humana. Gracias por la solidaridad y vocación con la que comparten sus conocimientos y por haber contribuido en mi formación, no sólo como Médico Veterinario, sino también como persona en aspectos fundamentales en este camino como lo son la perseverancia, rigurosidad, responsabilidad y humildad. Profesionales como ustedes son los que animan a seguir el camino de la ciencia, a querer ser cada día mejor, a querer hacer las cosas como se debe y a querer seguir transmitiendo el mismo espíritu que ustedes transmiten, tanto a los colegas como a las generaciones que vienen.

Agradezco también a mis amigos por haber sido mi apoyo y compañía en todo mi paso por la universidad. Espero que cada uno logre realizar todos sus anhelos y objetivos.

INDICE DE CAPITULOS

1. Resumen.....	Pág. 6
2. Abstract.....	Pág. 7
3. Introducción.....	Pág. 8
4. Revisión bibliográfica.....	Pág. 9
5. Hipótesis y Objetivos.....	Pág. 12
6. Materiales y Método.....	Pág. 13
7. Resultados.....	Pág. 17
8. Análisis de los resultados.....	Pág. 30
9. Discusión.....	Pág. 32
10. Conclusión.....	Pág. 36
11. Bibliografía.....	Pág. 38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración neta de lecitina de cada solución.....	Pág. 15
Tabla 2. Tamaño promedio y desviación estándar de los cristales de calcita y vaterita obtenidos en cada micropocillo.....	Pág. 30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cámara experimental.....	Pág. 13
Figura 2. Espectros estándar de Raman.....	Pág. 17
Figura 3. Espectros de Raman para un micropocillo de poliestireno, un micropocillo M0 y un micropocillo M10.....	Pág. 18
Figura 4. Espectros de Raman para distintas cantidades de CaCO ₃ comercial....	Pág. 19
Figura 5. Fotografías de los cristales obtenidos mediante SEM.....	Pág. 20
Figura 6. Cristales de calcita de un micropocillo control M0.....	Pág. 21
Figura 7. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M1.....	Pág. 21
Figura 8. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M2.....	Pág. 22
Figura 9. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M3.....	Pág. 22
Figura 10. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M4.....	Pág. 23
Figura 11. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M5.....	Pág. 23
Figura 12. Cristales de vaterita de un micropocillo M6.....	Pág. 24
Figura 13. Cristales de vaterita de un micropocillo M7.....	Pág. 24
Figura 14. Cristales de vaterita de un micropocillo M8.....	Pág. 25
Figura 15. Cristales de vaterita de un micropocillo M9.....	Pág. 25
Figura 16. Cristales de vaterita de un micropocillo M10.....	Pág. 25
Figura 17. Cristales de vaterita de un micropocillo M11.....	Pág. 26
Figura 18. Cristales de vaterita de un micropocillo M12.....	Pág. 26
Figura 19. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 1.6 mg/ml.....	Pág. 27
Figura 20. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 10 mg/ml.....	Pág. 27
Figura 21. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 150 mg/ml.....	Pág. 28
Figura 22. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 300 mg/ml.....	Pág. 28
Figura 23. Tamaños de los cristales según concentración neta de lecitina.....	Pág. 29

RESUMEN

La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), comúnmente conocida como lecitina, es una molécula ampliamente utilizada para estudiar el efecto de los lípidos en el proceso de biomineralización, debido a que constituye uno de los fosfolípidos más abundantes en la membrana celular. En este sentido, al evaluar su efecto en la cristalización del CaCO_3 , se ha determinado que no sólo es capaz de actuar como plantilla para la cristalización, sino también, que puede modificar la morfología de los cristales obtenidos.

En el presente estudio se utilizó el método de difusión de gases para evaluar el efecto de cuatro soluciones de lecitina de diferentes concentraciones, en la cristalización del CaCO_3 *in vitro*, con el objetivo de analizar la importancia de la disposición espacial de las micelas de lecitina en la nucleación de los cristales de CaCO_3 . Los resultados fueron analizados mediante SEM y una espectroscopia Raman, a través de los cuales se pudo establecer la presencia de dos polimorfos de CaCO_3 denominados calcita y vaterita. Asimismo, se observaron abundantes alteraciones en la superficie de ambos polimorfos dependiendo de la concentración de lecitina utilizada, lo cual permitió concluir que el tipo de micela, ya sea tradicional o inversa, y su disposición espacial, no sólo pueden modificar la morfología de los cristales de CaCO_3 obtenidos, sino también, que son capaces de determinar la formación de los distintos polimorfos observados, aspecto que refleja la presencia de nucleación de cristales a nivel intramicelar e intermicelar.

Palabras clave: Biomineralización, Carbonato de Calcio, Lecitina, Micelas.

ABSTRACT

Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), commonly known as lecithin, is a molecule very used to study the effect of lipids in the biomineralization process because is one of the most abundant phospholipid in the cell membrane.

To evaluate the effect of lecithin in the crystallization of CaCO_3 , it has been determined that is capable of acting as a template for the crystallization, and also may change the morphology of crystals obtained.

In the present study, gas diffusion method was used to evaluate the effect of four lecithin solutions in the crystallization of CaCO_3 *in vitro*, in order to analyze the importance of the lecithin micelles spatial arrangement in the CaCO_3 crystals growth. The results were analyzed by SEM and Raman spectrum analysis, and showed two CaCO_3 polymorphs called calcite and vaterite. According on the concentration of lecithin solution used, different alterations on the crystal surface were observed, both calcite as vaterite crystals. These results showed that type of micelle, traditional or reverse micelles, and their spatial arrangement, can change the CaCO_3 crystal morphology, and furthermore, are able to cause the formation of vaterite or calcite, showing the presence of crystal nucleation intermicelar or intramicelar.

Key words: Biomineralization, Calcium carbonate, Lecithin, Micelles.

INTRODUCCIÓN

La biomineralización es un proceso mediante el cual los organismos precipitan minerales inorgánicos en matrices orgánicas, formando los denominados biominerales con morfologías y propiedades mecánicas características. Diversos estudios han demostrado la importancia del componente orgánico en el proceso de cristalización, en relación a la gran influencia que tienen las diferentes macromoléculas orgánicas sobre la estructura de la superficie, morfología y configuración geométrica de los cristales formados (Hutchens *et al.*, 2006).

En la actualidad, se han descrito diversas superficies orgánicas que sirven de modelo para estudiar los fenómenos de biomineralización, dentro de los cuales las películas de Langmuir-Blodgett y monocapas auto ensambladas han sido de gran ayuda para estudiar el efecto de los lípidos sobre la cristalización (Szczęś, 2013).

Considerando que fosfolípidos como la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), más conocida como lecitina, constituyen los componentes principales de la membrana celular, la lecitina ha servido como modelo para estudiar la influencia de este componente orgánico sobre la cristalización del carbonato de calcio (CaCO_3). En este sentido, se ha observado que las vesículas de lecitina pueden determinar la formación de los polimorfos de CaCO_3 , así como también, influir en la morfología y propiedades de los cristales (Wan *et al.*, 2009). Producto de lo anterior, es que se considera que la determinación del efecto que tiene la lecitina sobre los procesos de cristalización del CaCO_3 , es de gran importancia debido a que permite comprender la influencia que tendría la membrana celular sobre los procesos de biomineralización.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los procesos de biomineralización han sido ampliamente estudiados debido al creciente interés por conocer los mecanismos por los cuales ocurre la formación de minerales biológicos en la naturaleza (Yaodong *et al.*, 2011). La presencia de este tipo de minerales, está ampliamente distribuida en el medio ambiente en los exoesqueletos de los insectos, en los dientes, los huesos, las conchas de los moluscos, e incluso en procesos de origen patológico, como la formación de cálculos renales o biliares en los organismos animales (Wang *et al.*, 2012). Uno de los sistemas de biomineralización, más estudiados corresponde a la cáscara del huevo aviar debido a la naturaleza del depósito de minerales, la ausencia de células entremezcladas con la estructura mineralizada, y la gran rapidez de la mineralización (Arias *et al.*, 2007).

Los biominerales son compuestos de moléculas orgánicas y minerales que cumplen con una variedad de funciones en diferentes organismos. La producción de materiales cristalinos con estructuras y propiedades parecidas a las de los biominerales es un reto para una amplia gama de tecnologías que incluyen la formación de nanomateriales, productos farmacéuticos y biomateriales (Stephens *et al.*, 2011). Entre los más de setenta biominerales conocidos hasta el momento, el CaCO_3 es una de las moléculas más estudiadas (Gower, 2008). En relación a lo anterior, se describe que es una molécula que cumple un rol importante en el ciclo del carbono, y que a nivel estructural se encuentra formando parte de las conchas de protección de los moluscos, en los corales, en el exoesqueleto de insectos y crustáceos, mármol, piedra caliza, y como componente principal de la cáscara del huevo (Wang *et al.*, 2012).

El CaCO_3 se puede presentar en seis formas estructurales distintas denominadas calcita, aragonita, vaterita, monohidrato de carbonato de calcio (monohidroxicalcita), hexahidrato de carbonato de calcio (hexahidrocalcita) y carbonato de calcio amorfo (CCA) (Loste *et al.*, 2003). Estos polimorfos al precipitar pueden modificar su morfología, y en estudios realizados *in vitro* se ha observado que los principales factores condicionantes de las morfologías obtenidas corresponden a la temperatura, pH de la solución, concentración de los reactantes y/o aditivos, entre otros (Al-Rawajfeh, 2008). Cabe destacar que de todos estos polimorfos, la vaterita es la forma cristalina más inestable, mientras que la calcita es la más estable a temperatura ambiente y presión atmosférica (Bäuerlein, 2003; Zhou *et al.*, 2010).

Como se mencionó, en la naturaleza los organismos fabrican monocristales inorgánicos con inclusiones de proteínas, lípidos y polisacáridos, generando biominerales con ciertas propiedades macroscópicas y microscópicas (Li y Stroff, 2009). Considerando este punto, y tomando en cuenta que el ambiente biológico donde se forman los biominerales está en constante contacto con diferentes tipos celulares, se han desarrollado diferentes estudios acerca de la influencia de los fosfolípidos en el crecimiento y morfología de los cristales (Wan *et al.*, 2009). En este sentido, un aspecto interesante de estudiar en los procesos de biomineralización dice relación con los mecanismos de reconocimiento molecular que existen en la interfaz orgánico-inorgánico durante la cristalización, lo cual se atribuye a interacciones electrostáticas, estereoquímica y combinaciones geométricas (Pal *et al.*, 2010).

La dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), es un fosfolípido que se caracteriza por tener un grupo colina positivo y un grupo fosfato negativo. La forma sintética de esta molécula se denomina lecitina, y es la molécula que se utiliza comúnmente para los estudios de cristalización *in vitro*. Al disponer la lecitina en un medio soluble forma micelas, en donde los grupos hidrofóbicos se disponen hacia el interior, mientras que los grupos fosfatidil hidrofílicos se ordenan hacia el exterior. En relación a este punto, estudios anteriores muestran que cuando el medio soluble contiene iones de Calcio (Ca^{+2}), se produce una interacción entre estos iones y la superficie de las vesículas lipídicas, lo cual constituye la base para la nucleación de cristales de CaCO_3 a nivel intermicelar (Szcze's, 2013). Asimismo, se determinó que los liposomas de DPPC son capaces de modificar la nucleación y cristalización del CaCO_3 , siempre y cuando no exista presencia de colesterol en el liposoma, otro elemento ampliamente presente en las membranas lipídicas (Lee y Guo Chen, 2009).

En esta misma línea de investigación, en un estudio realizado por Kim *et al.*, 2011, se observó la presencia de micelas en cristales individuales de calcita. Al realizar un análisis de las secciones transversales de los cristales a través de la fractura de los mismos, fue posible observar una inclusión altamente eficiente de las micelas con el cristal de calcita, en donde las micelas representaron hasta un 13% del peso y un 29% del volumen total del cristal. También se describe que las micelas son capaces de generar un cambio en la estructura del cristal en el cual se incorporan, lo cual proporciona un modelo único para la comprensión de la biomineralización, gracias a esto es posible conocer el mecanismo por el cual las macromoléculas pueden incorporarse dentro de cristales individuales, y

además la relación que existe entre las propiedades mecánicas macroscópicas de un cristal y su estructura microscópica (Metzler *et al.*, 2010).

En otro estudio realizado por Wan *et al.*, 2009, se trabajó con liposomas de lecitina multilaminar como plantilla orgánica para modificar el crecimiento de los cristales de CaCO_3 . Los resultados mostraron que los iones de calcio eran atraídos por los liposomas de lecitina cargados negativamente hasta incluso cambiar la carga del liposoma de negativo a positivo, lo que refleja la fuerte interacción entre los liposomas de lecitina y los iones de calcio. Adicionalmente, se determinó que la superficie del liposoma de lecitina actuaría como superficie para la precipitación y cristalización de polimorfos de CaCO_3 , los que en este caso correspondieron a vaterita y calcita. Cabe destacar que la vaterita es un polimorfo de CaCO_3 muy inestable, que en solución acuosa posee una gran capacidad de disolución pudiendo transformarse en calcita estable fácilmente. Por este motivo, es que dada la presencia de ambos polimorfos en los resultados observados se concluyó que los liposomas podrían inducir la formación de vaterita, y al mismo tiempo retardar la transformación de vaterita a calcita, generando evidencia clara acerca de la influencia de los fosfolípidos en los procesos de biomineralización.

Pese a los diversos estudios existentes respecto a este tema, no existe evidencia sobre la forma en como la disposición espacial de las micelas de lecitina influye en la cristalización de CaCO_3 , ni tampoco sobre los factores que determinarían las características de estas micelas. En el presente estudio se utiliza el método de difusión de gases para determinar el efecto que tiene el uso de distintas soluciones de lecitina en el proceso de cristalización, con el fin de determinar la importancia de la disposición espacial de las micelas de cada una de estas soluciones, al actuar como matriz para de nucleación de cristales de CaCO_3 *in vitro*.

HIPOTESIS

La disposición espacial de las micelas de lecitina afecta la cristalización del CaCO_3 , alterando la morfología de los cristales obtenidos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la lecitina sobre la cristalización de CaCO_3 *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el tamaño y los polimorfos de los cristales de CaCO_3 obtenidos.
2. Comparar morfológicamente los cristales obtenidos en presencia y en ausencia de la molécula de lecitina.

MATERIALES Y MÉTODO

En los ensayos de cristalización *in vitro* se utilizó el método de difusión de gases para determinar el efecto de la lecitina sobre el crecimiento de los cristales de CaCO_3 . Para esto se utilizó el siguiente modelo experimental:

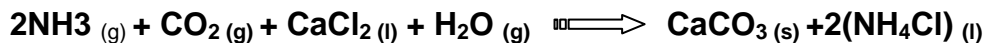
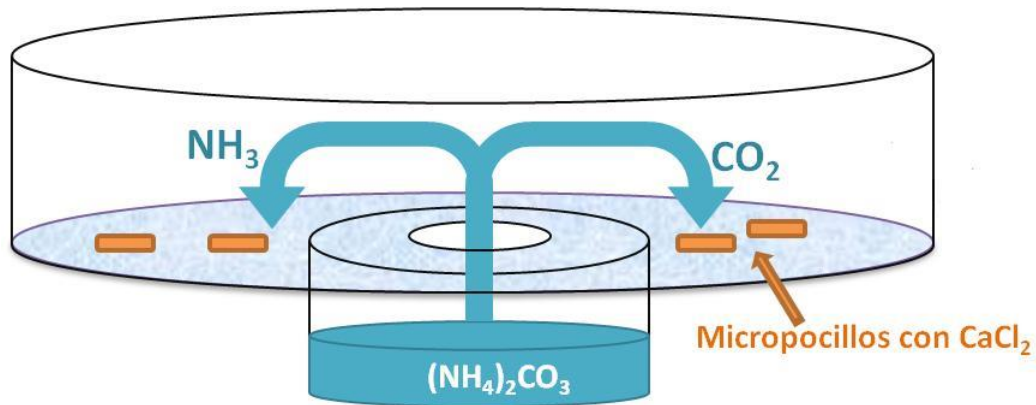


Figura 1. Cámara experimental. El bicarbonato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$) depositado en el recipiente cilíndrico se descompone en amoníaco (NH_3) y dióxido de carbono (CO_2) creando una atmósfera en la cual este último interacciona con el cloruro de Calcio (CaCl_2) presente en los micropocillos para formar carbonato de calcio (CaCO_3).

Este diseño consiste en una cámara cubierta compuesta de una placa *Petri* de vidrio de 85 mm de diámetro, con un orificio central en su base que la comunica con un recipiente cilíndrico de vidrio de 50 mm de diámetro y 30 mm de altura. La base de la placa fue dividida en diez sectores circulares iguales donde se colocaron los micropocillos de poliestireno (Hampton Res., Laguna Niguel, CA). En cada uno de los micropocillos se depositaron 35 μl de una solución de CaCl_2 y lecitina de soya, en diferentes concentraciones.

Para la preparación de la solución CaCl_2 200 mM se diluyeron 294 mg de CaCl_2 dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 10 ml de TRIS 0,2 M a pH 9.

Paralelamente se preparó una solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 20 mM diluyendo 19 mg de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ en 10 ml de agua desionizada.

Adicionalmente se prepararon cuatro soluciones de lecitina de soya con las concentraciones y cantidades que se indican a continuación:

1. 10 ml de solución de lecitina de soya en concentración de 1,6 mg/ml
2. 10 ml de solución de lecitina de soya en concentración de 10 mg/ml
3. 10 ml de solución de lecitina de soya en concentración de 150 mg/ml
4. 10 ml de solución de lecitina de soya en concentración de 300 mg/ml

Todas las soluciones fueron preparadas con lecitina de soya marca Vital Nature®, y disueltas en agua desionizada. Para lograr una adecuada emulsión, las soluciones fueron sonicadas por 20 minutos en modo continuo, al 10% de amplitud, utilizando un equipo Branson Digital Sonifier, Merck.

Para la preparación de los micropocillos se utilizaron las soluciones de CaCl_2 y lecitina. Para cada micropocillo se utilizó una combinación específica de ambas soluciones, usando un tubo Eppendorf en donde se depositaron 100 μl de la solución de TRIS/ CaCl_2 y diferentes concentraciones de lecitina como se detalla a continuación:

Solución 0: Control. 35 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 1: 1 μl de solución de 1,6 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 2: 5 μl de solución de 1,6 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 3: 10 μl de solución de 1,6 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 4: 1 μl de solución de 10 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 5: 5 μl de solución de 10 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 6: 10 μl de solución de 10 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 7: 1 μl de solución de 150 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 8: 5 μl de solución de 150 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 9: 10 μl de solución de 150 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 10: 1 μl de solución de 300 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 11: 5 μl de solución de 300 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

Solución 12: 10 μl de solución de 300 mg/ml de lecitina en 100 μl de CaCl_2 0.2M

En la siguiente tabla se muestra la cantidad neta de lecitina expresada en μg presente en cada solución preparada, y desde la cual se extrajeron $35\ \mu\text{l}$ para ser depositados en cada micropocillo.

Tabla 1. Concentración neta de lecitina de cada solución.

SOLUCION	μg DE LECITINA EN CADA SOLUCIÓN	NUMERO DE MICROPOCILLO	μg DE LECITINA EN CADA MICROPOCILLO ($\mu\text{g}/35\mu\text{L}$ de solución)
0	0	M0	0
1	1.6	M1	0,56
2	8	M2	2,8
3	16	M3	5,6
4	10	M4	3,5
5	50	M5	17,5
6	100	M6	35
7	150	M7	52,5
8	750	M8	262,5
9	1500	M9	525
10	300	M10	105
11	1500	M11	525
12	3000	M12	1050

Posteriormente se depositaron $3\ \text{ml}$ de la solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ en el recipiente cilíndrico que forma parte de la placa.

Para finalizar, la placa se cubrió con una tapa de vidrio, se selló con un parafilm y se dejó reposar por $24\ \text{horas}$ a temperatura ambiente.

Transcurridas $24\ \text{horas}$, se realizaron distintos lavados de cada micropocillo, utilizando las siguientes soluciones con su respectivo orden: dos lavados con agua destilada, dos lavados con alcohol etílico al 50% , dos lavados con alcohol etílico al 80% , dos lavados con alcohol etílico al 100% y dos lavados con hipoclorito de sodio al 5% .

Luego, cada pocillo fue sombreado con oro utilizando un equipo sombreador Electron microscopy sciences EMS-550 (Automated sputter coated). Las preparaciones fueron

observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) con un microscopio modelo TESLA BS-343A, usando un voltaje de 15 kV.

Con el objetivo de determinar la forma y el tamaño de los cristales de CaCO_3 . Para esto, una vez colocada la preparación dentro del microscopio, se ubicó el centro del micropocillo usando el aumento menor (67x). Luego, se fue subiendo paulatinamente el aumento hasta llegar a 670x, 1700x y/o 3300x. Para evaluar el tamaño de los cristales, se midió el eje mayor de cada cristal con la herramienta presente en el computador del microscopio electrónico para este fin. Para sacar el tamaño promedio de los cristales de cada preparación, se tomaron aleatoriamente cinco cristales del total de cristales presentes en el campo y se consideraron cuatro campos distintos por cada micropocillo, obteniéndose un total de veinte mediciones de tamaño de cristal para cada tipo de solución.

Los valores obtenidos fueron analizados estadísticamente para obtener los valores promedio y desviación estándar de cada preparación.

Paralelamente con la toma de fotografías, se realizó una espectroscopía Raman utilizando un equipo DeltaNu modelo Advantage Systems, para determinar los polimorfos presentes en las preparaciones.

RESULTADOS

Para determinar el polimorfo de CaCO_3 presente en las preparaciones se utilizó espectroscopia Raman, y para su análisis se tomaron como referencia los espectros estándar de Raman para calcita, vaterita y aragonita descritos por Wehrmeister *et al.*, el 2009.

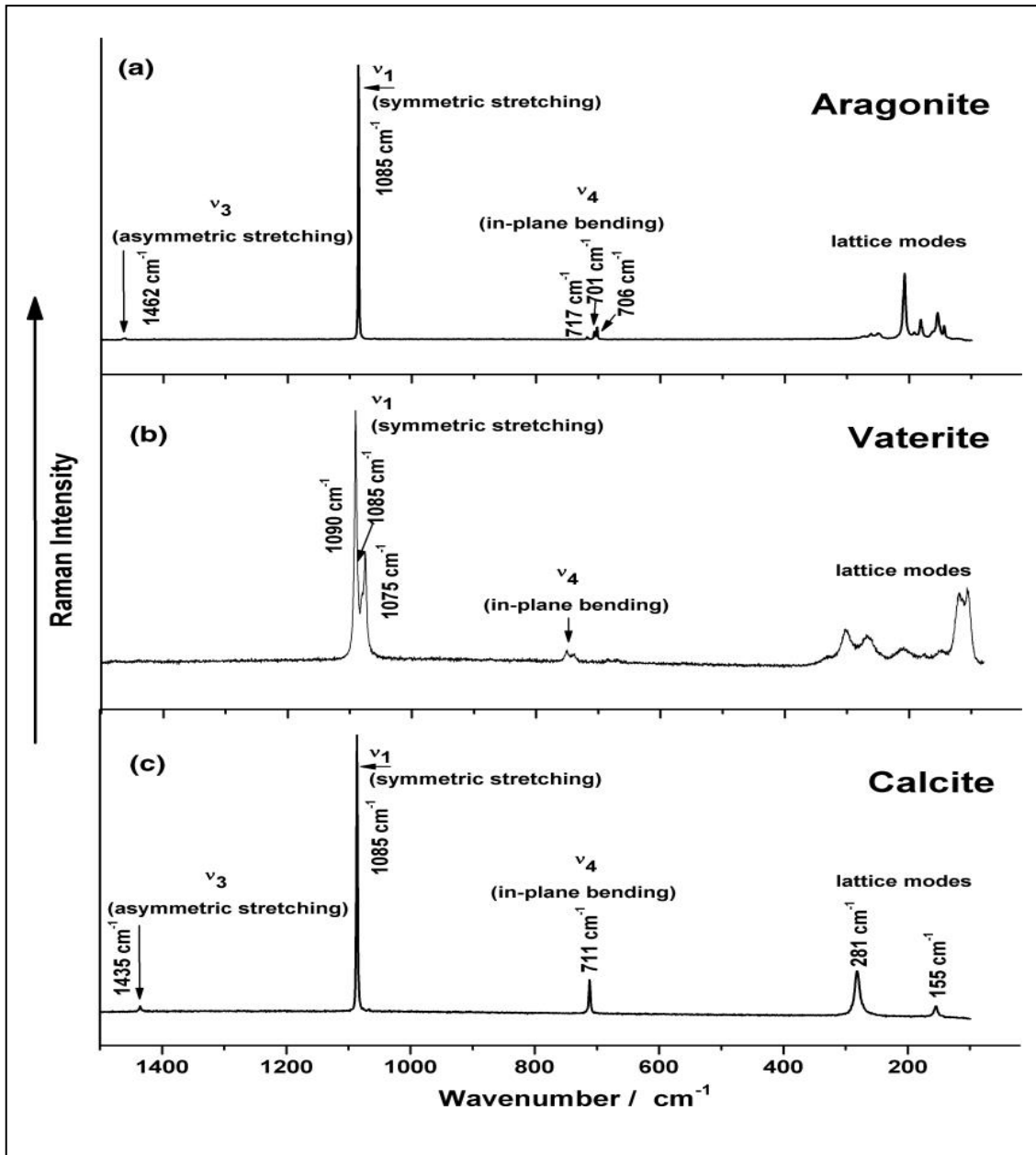


Figura 2. Espectros estándar de Raman. La figura muestra los espectros estándar de Raman para calcita, vaterita y aragonita de la base de datos del Departamento de Geociencias de la Universidad de Johannes Gutenberg, Mainz (Wehrmeister *et al.*, 2009).

Para comenzar el análisis, se midió el espectro de Raman para un micropocillo de poliestireno limpio, sin ninguna solución ni cristal. Asimismo, se analizó una muestra de CaCO_3 comercial Merck®. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento con un micropocillo control (micropocillo M0) y un micropocillo con una alta concentración de lecitina (micropocillo M10). Los resultados obtenidos son los siguientes:

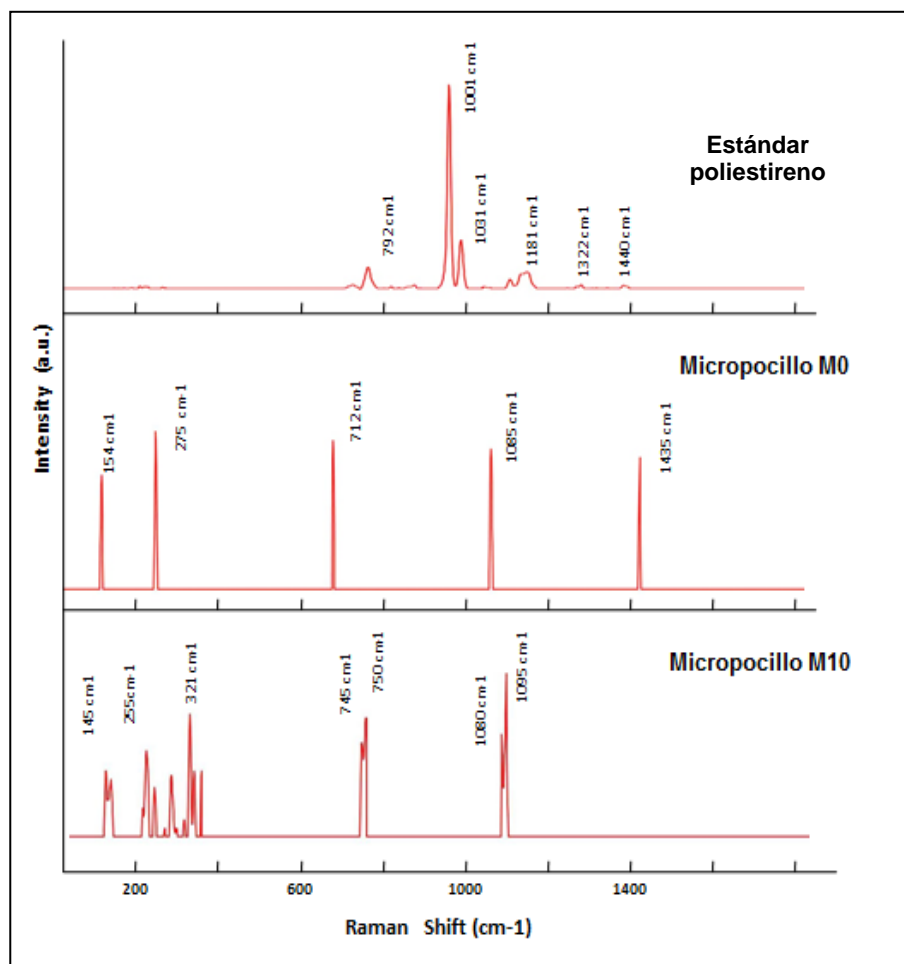


Figura 3. Espectros de Raman para un micropocillo de poliestireno, un micropocillo M0 y un micropocillo M10. Los espectros fueron obtenidos usando un láser de 785 nm en un equipo DeltaNu modelo Advantage Systems, propiedad del laboratorio CIMAT. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

Como se observa en la figura 3, el espectro de Raman del micropocillo M0 coincide con el estándar descrito por Wehrmeister *et al.*, el 2009 para los cristales de calcita, en donde se observan peak a los 155, 281, 711, 1085 y 1435 cm^{-1} . Por otro lado, el espectro del micropocillo M10 también coincide con el estándar de los cristales de vaterita, no

obstante, en ambos casos, si bien coincide la ubicación de los peak observados, la intensidad del espectro de las preparaciones de este estudio es considerablemente más baja que la del estándar descrito. Por este motivo, para determinar si la intensidad observada en las preparaciones de este estudio tenía relación con la cantidad de cristales presentes en el micropocillo, se analizó el espectro de una preparación de CaCO_3 comercial (Merck®), y se utilizaron distintas cantidades para evaluar el efecto de esta variable en el espectro de Raman observado.

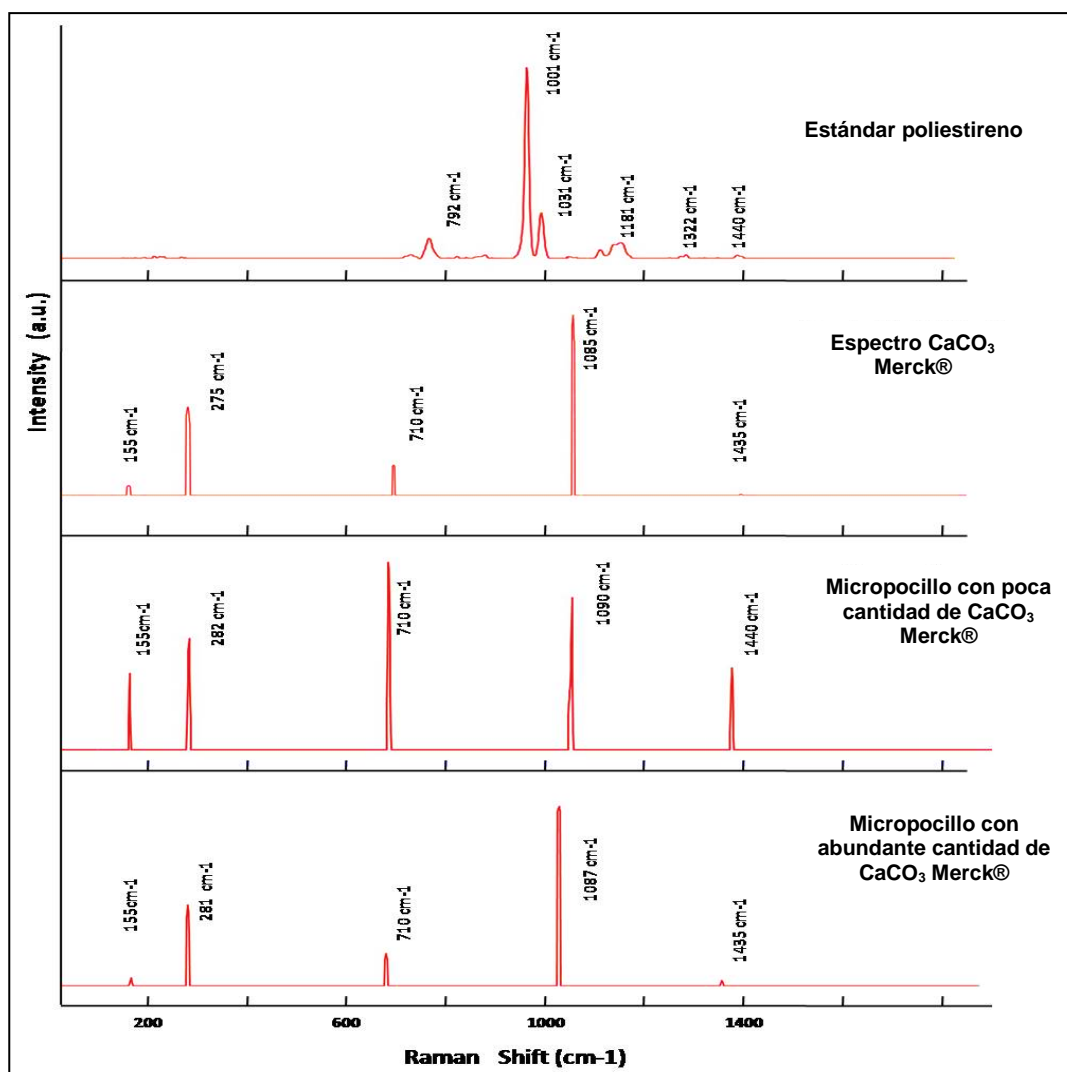


Figura 4. Espectros de Raman para distintas cantidades de CaCO_3 comercial. Los espectros fueron obtenidos usando un láser de 785 nm en un equipo DeltaNu modelo Advantage Systems, propiedad del laboratorio CIMAT. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

Como se observa en la figura 4, el espectro de Raman para la formulación de CaCO_3 Merck® coincide con el estándar descrito por Wehrmeister *et al.*, el 2009, para los cristales de calcita. Al evaluar distintas cantidades de este CaCO_3 se determinó que al utilizar una baja cantidad de muestra, el espectro de Raman se asemeja al espectro observado en las preparaciones de este estudio. Asimismo, al utilizar una abundante cantidad, el espectro se asemeja al estándar del CaCO_3 Merck®. El aumento de intensidad en el espectro del CaCO_3 comercial después de agregar una mayor cantidad al micropocillo, da cuenta de la influencia que tiene la cantidad de cristal analizado en este método de análisis.

Una vez que se determinó la presencia de calcita y vaterita en las preparaciones, se procedió a analizar la morfología de los cristales de CaCO_3 mediante SEM.

En el micropocillo M0 se observaron sólo cristales de calcita, a diferencia de lo que ocurrió en las preparaciones M1, M2, M3, M4, M5 y M6 donde se observó calcita y vaterita, o en M7, M8, M9, M10, M11 y M12 donde sólo hubo presencia de vaterita. Cabe destacar que en los micropocillos M1 a M6, la proporción de vaterita fue aumentando conforme se incrementó la concentración de lecitina, y al mismo tiempo la proporción de calcita fue disminuyendo.

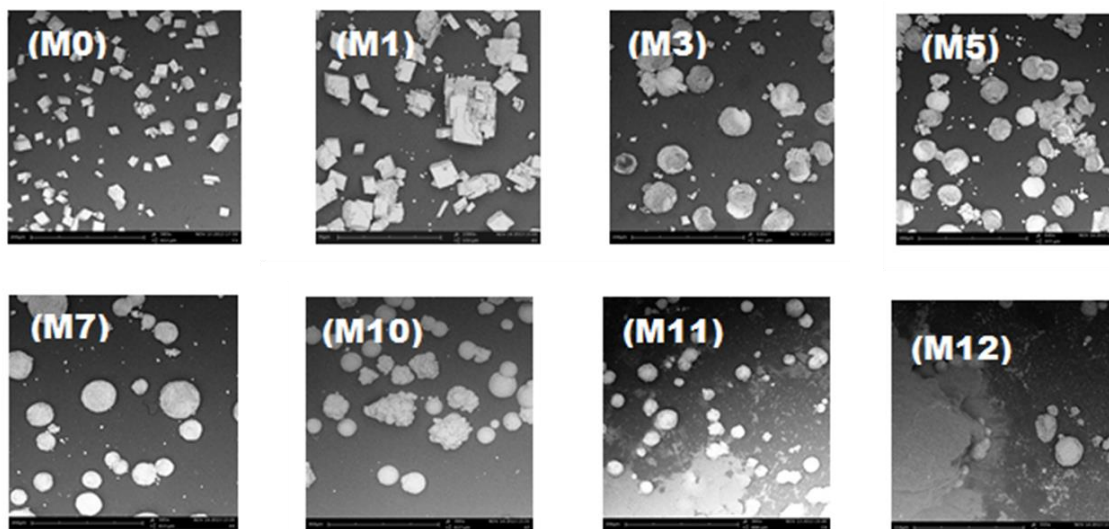


Figura 5. Fotografías de los cristales obtenidos mediante SEM. Las fotografías corresponden a los distintos polimorfos de CaCO_3 de los micropocillos M0, M1, M3, M5, M7, M10, M11 y M12.

En relación a la morfología de los cristales, en M0 se observó cristales de calcita aislados, en abundante cantidad, con caras lisas y simétricas, de un tamaño promedio de 20 μm aproximadamente, y muy uniformes entre sí. No se observaron cristales de vaterita.

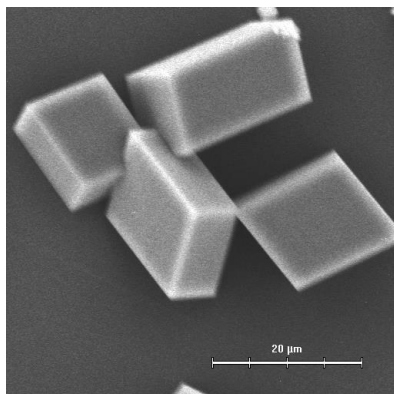


Figura 6. Cristales de calcita de un micropocillo control M0.

En las muestras de cristales formados en contacto con la solución de lecitina, en M1 se observaron cristales de calcita de un tamaño promedio de 30 μm aproximadamente, con modificaciones en sus caras de tipo cóncavas. Los cristales de vaterita presentaron un tamaño promedio de 30 μm aproximadamente, y en su mayoría se encontraban formando parte de aglomeraciones de cristales en donde había un componente preponderante de cristales de calcita y un componente menor de cristales de vaterita. Su superficie era de aspecto laminar.

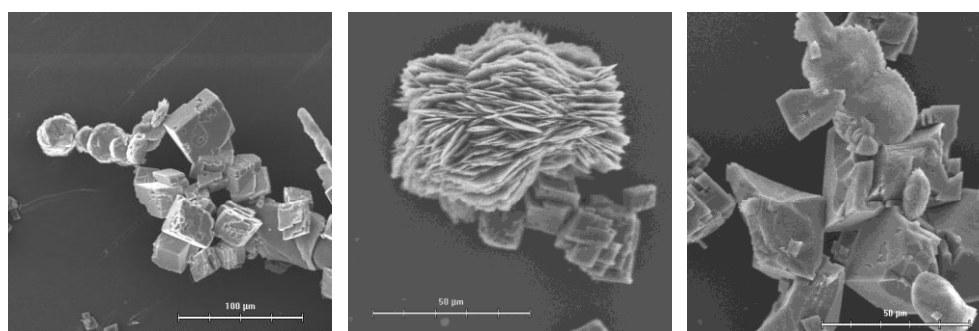


Figura 7. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M1.

En los micropocillos M2, la proporción de cristales de calcita fue disminuyendo en comparación con la de vaterita, y su tamaño se mantuvo relativamente constante en 50 μm aproximadamente. También fue posible observar modificaciones en sus caras, y aglomeraciones entre cristales de calcita o con agregados de vaterita, que alcanzaron incluso los 150 μm . Por otro lado, los cristales de vaterita aumentaron en proporción respecto a los cristales de calcita, y su tamaño aumento prácticamente al doble, alcanzado 100 μm aproximadamente.

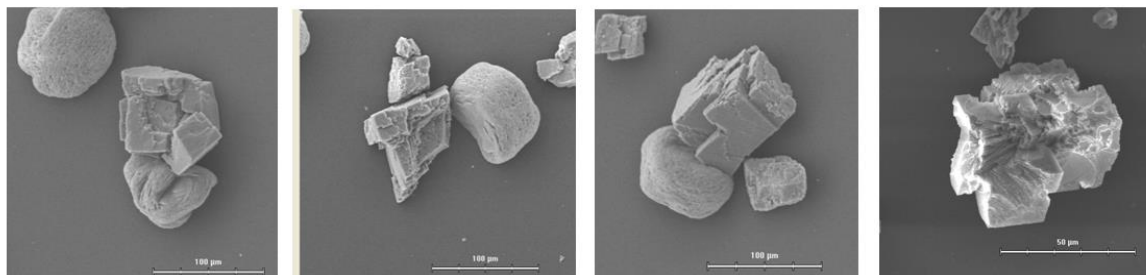


Figura 8. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M2.

En los micropocillos M3, se observaron cristales de calcita de un tamaño promedio de 25 μm aproximadamente, con abundantes modificaciones en su superficie, aislados o asociados a grandes cristales de vaterita. Los cristales de vaterita son predominantes y alcanzan un tamaño promedio de 70 μm aproximadamente. Su superficie es laminar, muy fina, y en ocasiones se observan asociaciones de dos o más cristales.

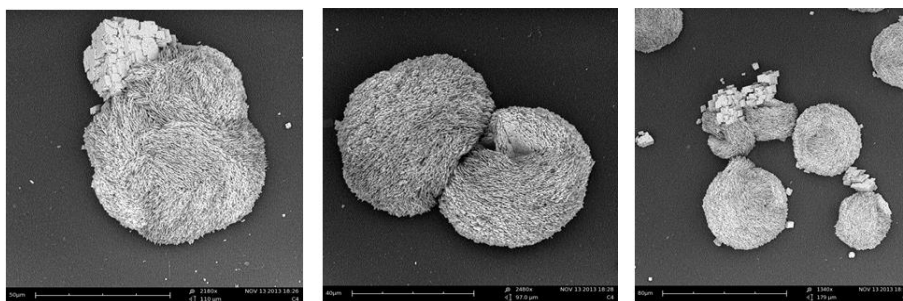


Figura 9. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M3.

En los micropocillos M4 se observan pequeños cristales de calcita, fragmentados, aislados, de un tamaño promedio de 40 μm aproximadamente, con sus caras absolutamente modificadas y de formas irregulares. Con respecto a los cristales de

vaterita, alcanzan un tamaño de hasta 100 μm aproximadamente cuando están aislados, y son muy abundantes.

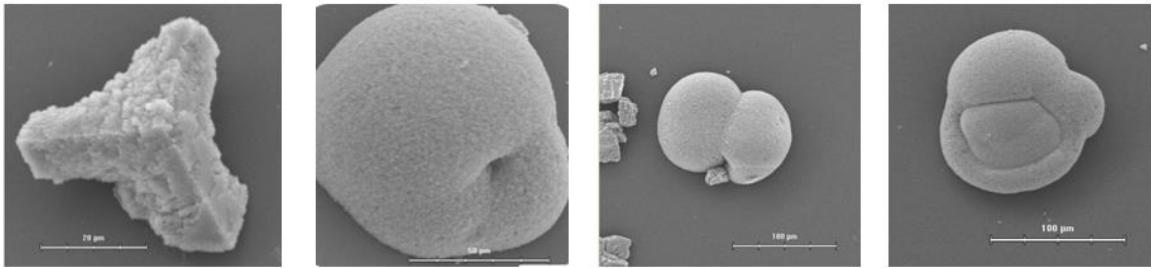


Figura 10. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M4.

En los micropocillos M5 fue posible observar un predominio marcado y sostenido de cristales de vaterita, los cuales alcanzaron un tamaño de hasta 100 μm aproximadamente, en forma aislada, y 200 μm aproximadamente al estar aglomerados o fusionados con otros cristales. Los cristales de calcita miden alrededor de 20 μm aproximadamente cuando están aislados y 40 μm aproximadamente cuando están formando parte de aglomeraciones entre cristales de calcita o como parte de un cristal de vaterita. Sus caras se observaron modificadas de diversas formas.

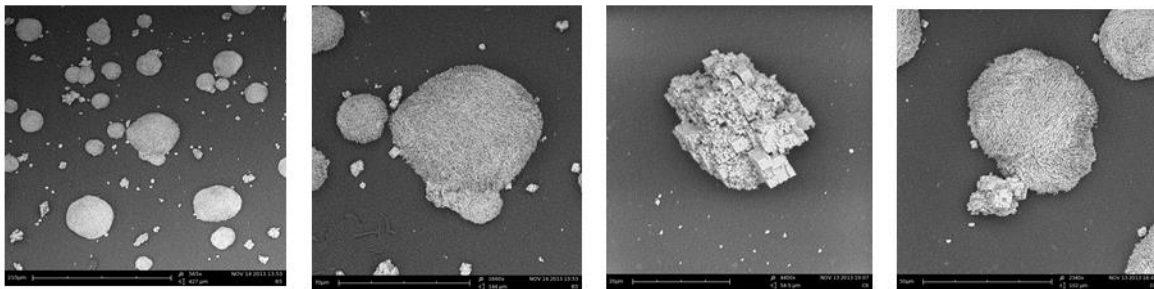


Figura 11. Cristales de calcita y vaterita de un micropocillo M5.

En los micropocillos M6, se observaron enormes cristales de vaterita de 100 μm aproximadamente, de superficie laminar y forma redondeada. También se observaron conglomerados de este tipo de cristales que alcanzan hasta 250 μm de longitud. Los cristales de calcita presentes son muy escasos, se encuentran aislados y miden alrededor de 10 μm aproximadamente.

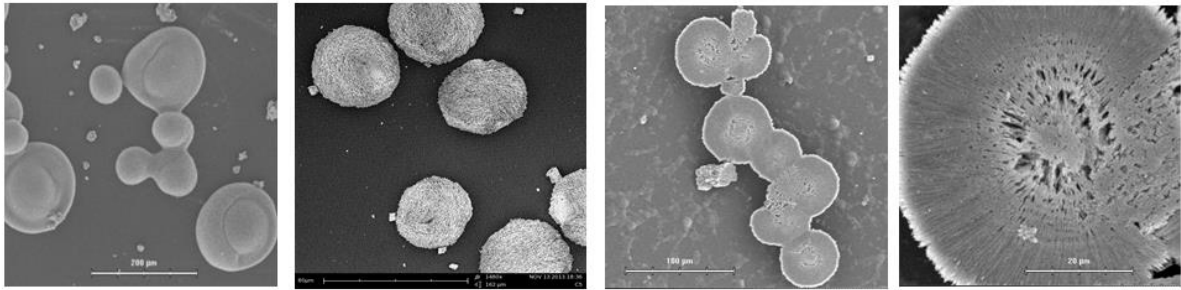


Figura 12. Cristales de vaterita de un micropocillo M6. Las dos imágenes de la derecha corresponden a un corte longitudinal de un conglomerado de cristales y de un cristal aislado respectivamente.

En los micropocillos M7 sólo se observan cristales de vaterita, algunos aislados o agrupados entre dos o tres cristales, con una superficie con leve porosidad, forma redondeada y de un tamaño promedio de 100 µm aproximadamente. En algunas preparaciones también se pudo observar cristales con una superficie muy irregular y distinta al resto de los cristales del campo, muy porosos, en su mayoría aislados, y de un tamaño promedio de 40 µm aproximadamente.

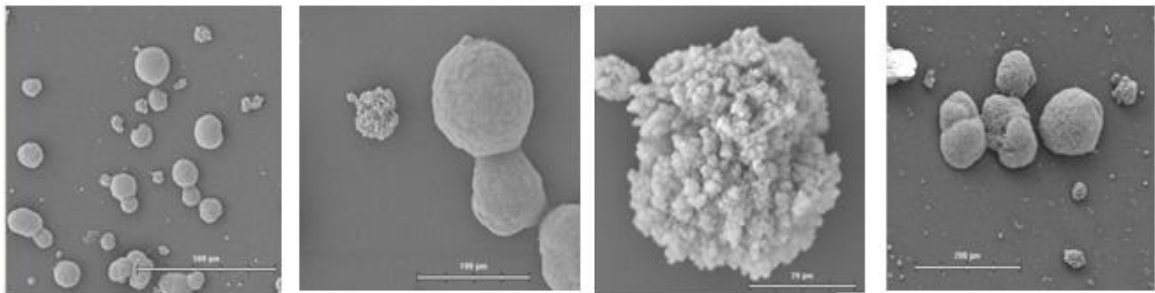


Figura 13. Cristales de vaterita de un micropocillo M7.

En los micropocillos M8 se observan sólo cristales de vaterita, con una superficie muy porosa y de un tamaño promedio de 80 µm aproximadamente. Los cristales se observan en su mayoría aislados, de un tamaño uniforme y redondeados. No obstante se pueden observar algunas asociaciones de dos a tres cristales de vaterita.

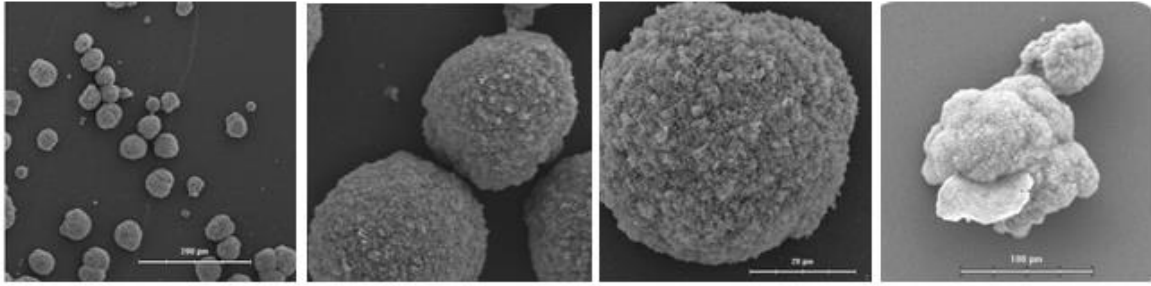


Figura 14. Cristales de vaterita de un micropocillo M8.

En los micropocillos M9 se observan sólo cristales de vaterita de superficie muy porosa y de un tamaño promedio de 70 μm aproximadamente. Los cristales se observan en su mayoría aislados, de un tamaño uniforme y redondeados. No obstante se pueden observar algunas asociaciones de dos a seis cristales de vaterita.

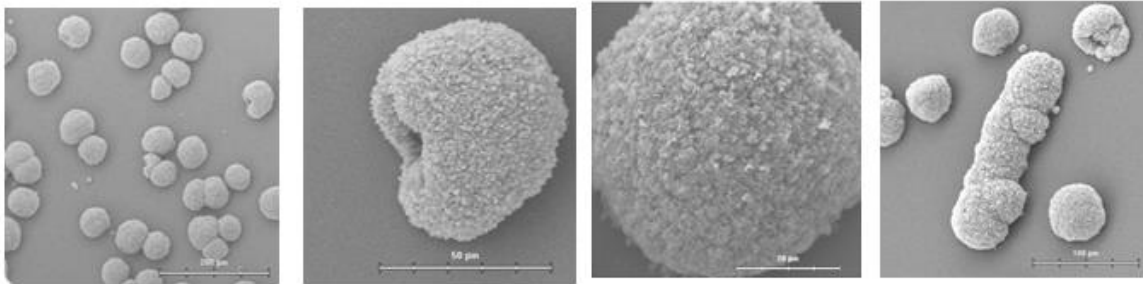


Figura 15. Cristales de vaterita de un micropocillo M9.

En los micropocillos M10 se observan sólo cristales de vaterita, aislados, muy porosos, su superficie es muy irregular y presentan variados tamaños, que en general, no sobrepasan los 70 μm aproximadamente.

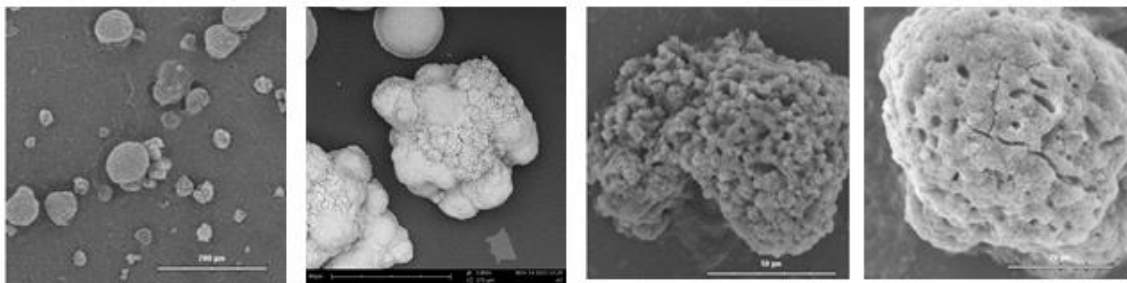


Figura 16. Cristales de vaterite de un micropocillo M10.

En los micropocillos M11 se observan sólo cristales de vaterita, aislados o en conglomerados de diversa cantidad de cristales. La superficie de los cristales es muy porosa, su forma es irregular y su tamaño es variable. En promedio es de 70 μm , no obstante es posible observar escasos cristales de alrededor de 100 μm , y otros de 30 μm .

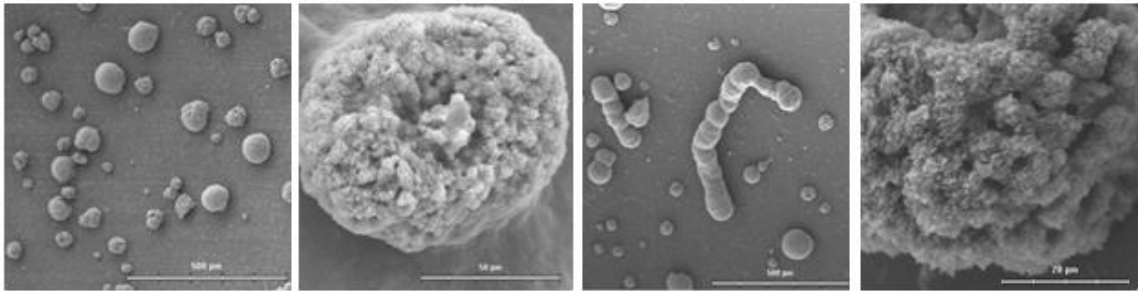
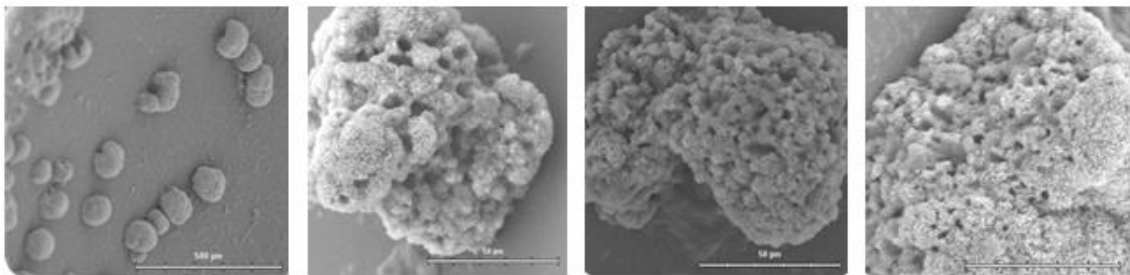


Figura 17. Cristales de vaterita de un micropocillo M11.

En los micropocillos M12 se observan sólo cristales de vaterita, en su mayoría aislados. La superficie de los cristales es muy porosa, su tamaño es de 60 μm en promedio, no obstante existe una gran variabilidad tanto en tamaño como en la forma de los cristales obtenidos.



. Figura 18. Cristales de vaterita de un micropocillo M12.

Con respecto específicamente al tamaño de los cristales de calcita y vaterita se observó un aumento en el tamaño de los cristales de vaterita y una disminución en el tamaño de los cristales de calcita, conforme aumentaba la concentración de la solución de CaCl_2 +lecitina. No obstante, esta dinámica se mantuvo sólo hasta cierta concentración de lecitina, puesto que en concentraciones extremas, la tendencia se inclinó hacia una disminución en el tamaño de los cristales de vaterita.

A continuación se muestran los gráficos que representan el tamaño de los cristales de calcita y vaterita, según la concentración de la solución de CaCl_2 +lecitina, de acuerdo a cada solución madre utilizada.

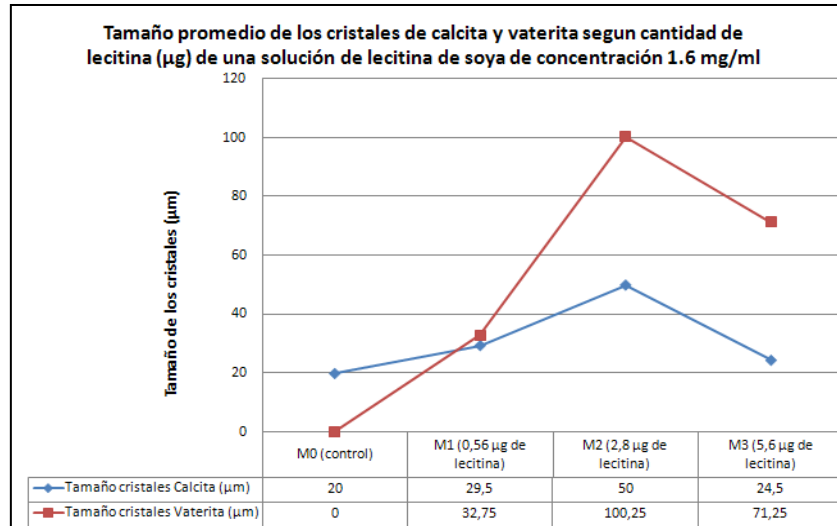


Figura 19. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 1,6 mg/ml. El gráfico muestra el tipo y tamaño de los cristales obtenidos en los micropocillos M1, M2 y M3, según la concentración de la solución de CaCl_2 +lecitina, al utilizar la solución madre de lecitina de 1,6 mg/ml. Las desviaciones estándar de los tamaños de los cristales de calcita de los micropocillos M0, M1, M2 y M3 son 4,08, 8,87, 7,43 y 6,05 respectivamente. Las desviaciones de los cristales de vaterita de los micropocillos M1, M2 y M3 son 12,62, 8,9 y 7,41 respectivamente.

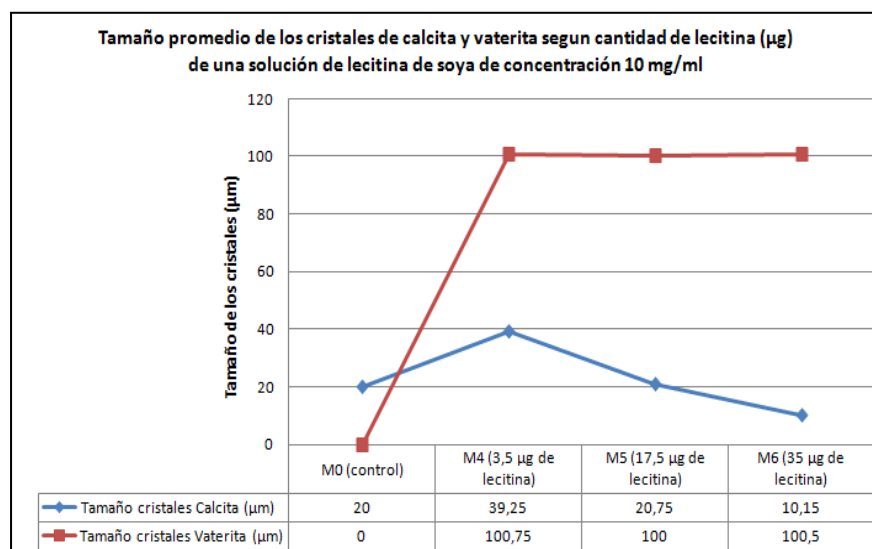


Figura 20. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 10 mg/ml. El gráfico muestra el tipo y tamaño de los cristales obtenidos en los micropocillos M4, M5 y M6, según la concentración de la solución de

CaCl₂+lecitina, al utilizar la solución madre de lecitina de 10 mg/ml. Las desviaciones estándar de los tamaños de los cristales de calcita de los micropocillos M4, M5 y M6 son 7,12, 10,31 y 3,47 respectivamente. Las desviaciones de los cristales de vaterita de los micropocillos M4, M5 y M6 son 9,36, 15,73 y 6,67 respectivamente.

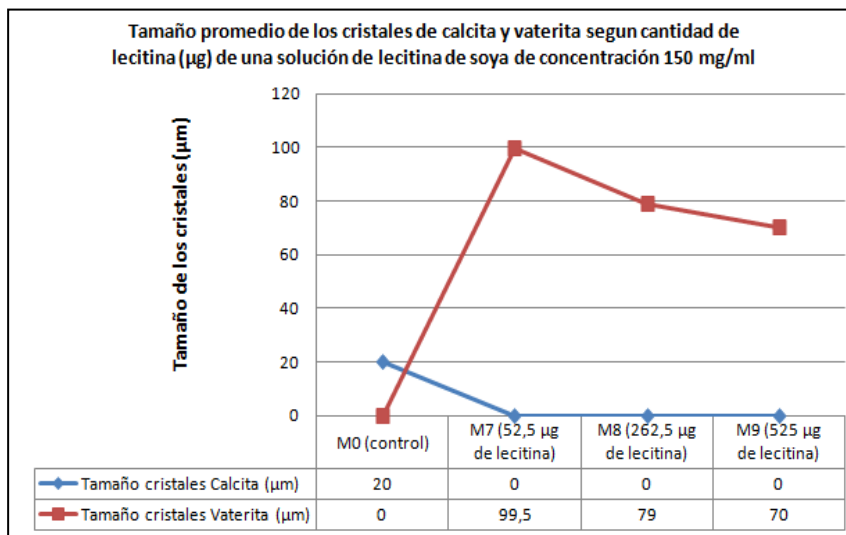


Figura 21. Tamaño de los cristales al usar la solución de lecitina 150 mg/ml. El gráfico muestra el tipo y tamaño de los cristales obtenidos en los micropocillos M7, M8 y M9, según la concentración de la solución de CaCl₂+lecitina, al utilizar la solución madre de lecitina de 150 mg/ml. Las desviaciones estándar de los tamaños de los cristales de vaterita de los micropocillos M7, M8 y M9 son 15,04, 7,71 y 7.25 respectivamente.

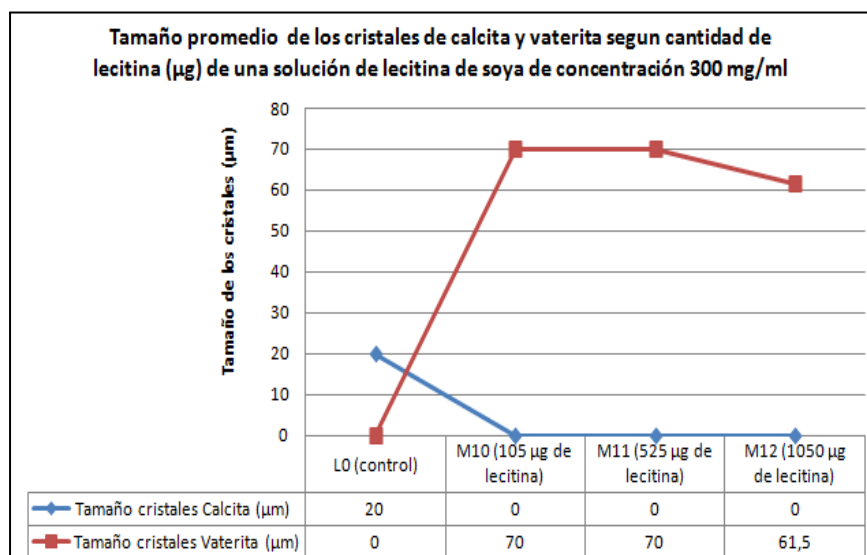


Figura 22. Gráfico solución de lecitina 300 mg/ml. El gráfico muestra el tipo y tamaño de los cristales obtenidos en los micropocillos M10, M11 y M12, según la concentración de la solución de CaCl₂+lecitina, al

utilizar la solución madre de lecitina de 300 mg/ml. Las desviaciones estándar de los tamaños de los cristales de vaterita de los micropocillos M10, M11 y M12 son 15,98, 22,0 y 15,31 respectivamente.

Cabe destacar que en los micropocillos con cristales formados en contacto con la solución de lecitina en concentración de 150 mg/ml (M7, M8, M9), se observó una drástica disminución en la cantidad y tamaño de los cristales de calcita, así como también un predominio de cristales de vaterita. Asimismo, en las muestras de cristales formados en contacto con la solución de lecitina de 300 mg/ml (M10, M11 y M12), se observó una clara tendencia de los cristales de vaterita a disminuir su tamaño conforme se incrementó la concentración de la solución. Concentraciones superiores a 52,5 µg de lecitina (M7) parecieran influir negativamente en el tamaño de los cristales. En relación a lo anterior, se pudo observar que en las concentraciones más altas, su tamaño promedio fue de 60 µm, pero con presencia de cristales de incluso 30 µm.

A continuación se muestra el gráfico que representa los tamaños de los cristales de calcita y vaterita según la concentración neta de lecitina.

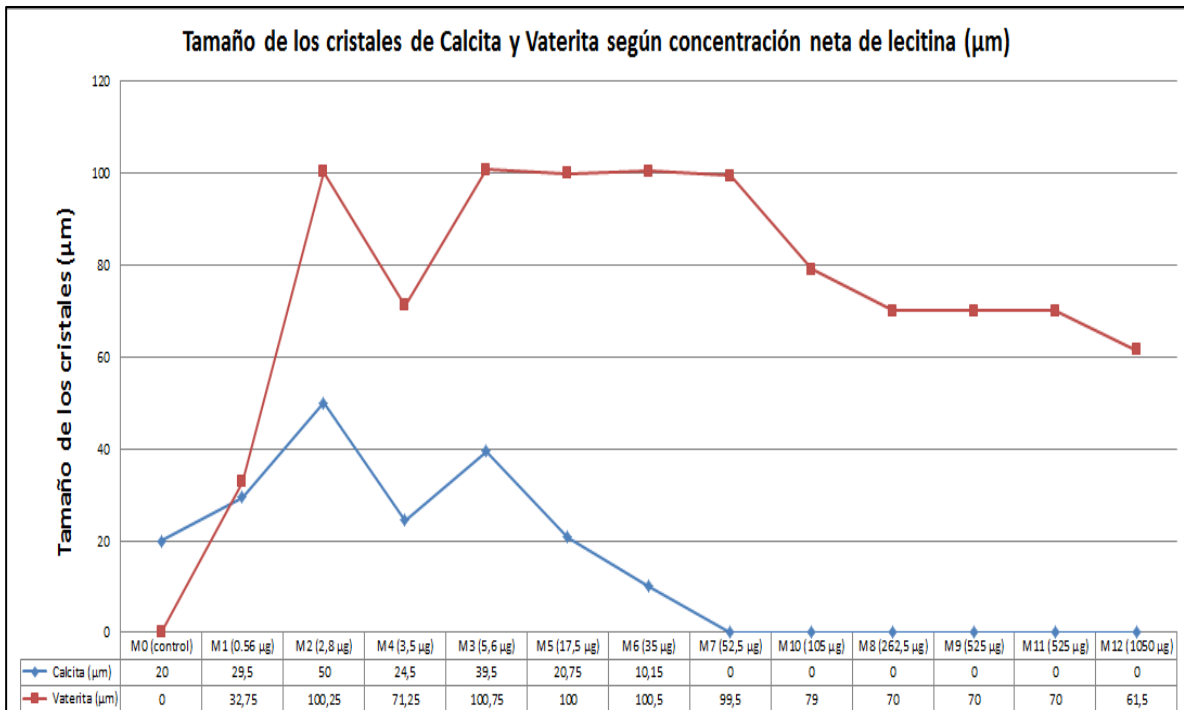


Figura 23. Tamaño de los cristales según concentración neta de lecitina. El gráfico muestra el tipo y tamaño de los cristales obtenidos, según la concentración neta de lecitina presente en cada micropocillo.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Para el análisis cualitativo de los cristales obtenidos de cada solución preparada, se consideraron cinco mediciones de tamaño de cristal por campo, y cuatro campos por cada micropocillo. Estos valores fueron analizados con el programa R Studio obteniéndose la media y desviación estándar para cada grupo.

Tabla 2. Tamaño promedio y desviación estándar de los cristales de vaterita y calcita obtenidos en cada micropocillo.

MICROPOCILLO	TAMAÑO PROMEDIO CRISTALES CALCITA	DESVIACION ESTANDAR CRISTALES CALCITA	TAMAÑO PROMEDIO CRISTALES DE VATERITA	DESVIACION ESTANDAR CRISTALES DE VATERITA
M0	20	4,08	0	0
M1	29,5	8,87	32,75	12,62
M2	50	7,43	100,25	8,96
M3	24,5	6,04	71,25	7,41
M4	39,5	7,12	100,75	9,36
M5	20,75	10,31	100	15,73
M6	10,15	3,47	100,5	6,67
M7	0	0	99,5	15,04
M8	0	0	79	7,71
M9	0	0	70	7,25
M10	0	0	70	15,98
M11	0	0	70	22
M12	0	0	61,5	15,31

Los resultados mostraron una brusca disminución en el tamaño y presencia de los cristales de calcita en concentraciones superiores a 35 μ l de lecitina (micropocillo M6). En concentraciones inferiores a este valor los tamaños varían de acuerdo a cada solución, no obstante, la tendencia es a la disminución tanto en tamaño como en proporción respecto a los cristales de vaterita. Dentro de cada solución, los tamaños de los cristales de calcita son bastante uniformes, con excepción de la solución de 17,5 μ l de lecitina (micropocillo M5), en donde existe una variabilidad mucho mayor respecto al promedio de los cristales de ese grupo.

Con respecto a los cristales de vaterita se observó una tendencia a aumentar el tamaño de los cristales conforme se va aumentando la concentración de lecitina hasta un máximo de 35 μl de lecitina (micropocillo M6). Concentraciones superiores parecieran influir negativamente en el tamaño de los cristales. Con respecto a la homogeneidad de los cristales dentro de cada grupo, se observó que en concentraciones intermedias los cristales son mucho más homogéneos que en concentraciones extremas. Al utilizar concentraciones más altas, la variabilidad aumenta considerablemente, sobre todo en los cristales obtenidos a partir de la solución madre de 300 mg/ml.

Al analizar los dos grupos de cristales, calcita y vaterita, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación del total de cristales de calcita y vaterita obtenidos.

	CRISTALES DE CALCITA	CRISTALES DE VATERITA
PROMEDIO	14,95	73,69
DESVIACION ESTANDAR	17,22	31,39
COEFICIENTE DE VARIACION	115,14	42,6

Para los tamaños de los cristales de calcita, se obtuvo una media de 14,95 siendo el valor mínimo 0, y el valor máximo 60 μm . Para los cristales de vaterita, la media fue de 73,69 considerando un valor mínimo de 0 y un máximo de 120 μm . La desviación estándar para el total de los cristales de calcita fue de 17,22 mientras que para los cristales de vaterita fue de 31,39. Considerando la gran diferencia existente entre las medias de ambos grupos, se calculó además el coeficiente de variación, con el objetivo de analizar la variabilidad entre los cristales de calcita y vaterita. Los valores obtenidos fueron 115,14% para los cristales de calcita y 42,6% para los cristales de vaterita, lo que da cuenta de que existe mayor variabilidad en los tamaños de los cristales de calcita, en comparación a la variación de los cristales de vaterita. Cabe destacar que los dos coeficientes de variación tan altos, reflejan la enorme variabilidad que tienen los tamaños de los cristales obtenidos.

DISCUSION

De acuerdo a las distintas soluciones utilizadas en cada micropocillo, se obtuvieron numerosos cristales de diferentes características. Como se mencionó, dependiendo de las condiciones de cristalización, el CaCO_3 puede formar polimorfos cristalinos de calcita, vaterita o aragonita. Sabiendo que los polimorfos de vaterita y aragonita pueden ser precursores de cristales de calcita, es que se hizo necesario determinar el tipo exacto de cristal presente en las preparaciones obtenidas en este estudio. Para esta determinación, se han descrito diferentes métodos de análisis tales como la espectroscopia infrarroja (IR), espectroscopía Raman, calorimetría diferencial de barrido (DSC), SEM y difracción de rayos X (DRX), no obstante, los únicos adecuados son la IR y espectroscopía Raman (Agarwal y Berglund, 2003). En este caso, se utilizó espectroscopía Raman, considerando el estándar de Raman para calcita, vaterita y aragonita descrito por Wehrmeister *et al.*, el 2009. Gracias a este análisis, se llegó a la conclusión de que los cristales obtenidos correspondían a polimorfos de calcita y vaterita. Cabe destacar, que una de las observaciones de este análisis tuvo relación con la intensidad de espectro observado, y su relación con la cantidad de cristal presente en el micropocillo. En este sentido, el aumento de intensidad en el espectro de Raman para el CaCO_3 comercial después de agregar una mayor cantidad al micropocillo, da cuenta de la influencia que tiene la cantidad de cristal analizado. Gracias a esto, se pudo concluir que las bajas intensidades observadas en las preparaciones de este estudio, se pueden deber a que éstas contienen una muy baja cantidad de cristal, factor que sin duda dificulta su análisis a través de este método.

Por otro lado, los distintos polimorfos presentaron variaciones morfológicas conforme se fue adicionando la solución de lecitina de soya, resultado que reafirma lo descrito por Kim *et al.*, 2011, donde se mencionó la fuerte interacción que existiría entre los cristales de CaCO_3 y la matriz orgánica de lecitina. De la misma forma, se comprobó que la molécula de lecitina, no sólo actúa como matriz orgánica para la nucleación de los cristales, sino también tiene gran influencia en el proceso de cristalización, pudiendo determinar el tipo de polimorfo formado, y su vez, generar importantes cambios morfológicos en los cristales obtenidos.

El crecimiento de cristales de calcita guiado por matrices lipídicas, ha sido descrito como un crecimiento intermicelar (Wan *et al.*, 2009), en donde la superficie de las micelas o

liposomas tendría una fuerte interacción con los iones de calcio, generando núcleos de cristalización entre las micelas. Evidencia de esto corresponde a los cristales obtenidos en presencia de una cantidad de lecitina de hasta 5,6 μg (micropocillo M3), en donde fue posible observar cristales de calcita de tamaños uniformes, pero con diferentes grados de modificación en su superficie. Interesantemente, en el presente estudio además se obtuvo cristales de vaterita, lo cual no es compatible con un crecimiento netamente intermicelar.

Estudios anteriores han demostrado que el crecimiento de nanopartículas en soluciones lipídicas, está fuertemente influenciado por las micelas que constituyen la matriz orgánica para la cristalización (Metzler *et al.*, 2010). Además, las características de estas micelas dependen de la emulsión en donde estas se formen, y es así como se ha observado que en emulsiones con un mayor componente acuoso que lipídico existe formación de micelas tradicionales, es decir, con cabezas polares hacia el exterior y colas hidrofóbicas hacia el interior. No obstante, cuando la emulsión posee un mayor componente lipídico que acuoso, existe formación de las denominadas micelas inversas cuyas cabezas polares se disponen hacia el interior y las colas hidrofóbicas hacia el exterior. Este tipo de micelas se formarían para lograr un equilibrio termodinámico, y se ha observado que también constituirían compartimentos estables que sirven de matriz para la cristalización (Eastoe *et al.*, 2007). Aunado a lo anterior, en un estudio de cristalización de CaCO_3 realizado por Hoon Kang *et al.*, el 2005, se determinó que en soluciones acuosas hay formación de micelas tradicionales y por consiguiente, hay formación de cristales de calcita. Sin embargo, al incrementar la cantidad del componente lipídico en la emulsión, tiende a haber formación de micelas inversas y con ello, nucleación de cristales de vaterita dentro de estas micelas. En el presente estudio, se obtuvo evidencia respecto a este punto, y además se observó que uno de los factores determinantes en la formación de los distintos tipos de micelas es la concentración de la solución, ya que al utilizar soluciones madres de lecitina menos concentradas (1,6 mg/ml o 10 mg/ml) hubo formación de calcita y de vaterita, mientras que al utilizar soluciones madres de alta concentración (150 mg/ml o 300 mg/ml) sólo hubo formación de vaterita. Cabe destacar que en los resultados obtenidos, la formación de micelas inversas y consiguiente nucleación de vaterita, pareciera verse favorecida a partir de las soluciones con apenas 0,56 μg de lecitina (micropocillo M1).

Lo anterior es de gran importancia, puesto que refleja la capacidad de la emulsión de lecitina de estabilizar la nucleación de cristales de vaterita, los cuales son intrínsecamente

inestables en solución acuosa. Adicionalmente, se observó agregados de dos y hasta ocho cristales de vaterita, lo cual coincide con lo mencionado por Eastoe *et al.*, el 2007, en donde se plantea que las micelas inversas sostienen movimientos aleatorios que pueden facilitar el contacto entre dos o más micelas, y que permiten la formación de agregados de cristales que pueden o no separarse durante el proceso de cristalización.

Con respecto a la proporción de los cristales, se observó que tiende a haber una disminución en la cantidad de cristales de calcita y un aumento en la cantidad de cristales de vaterita, conforme se va incrementando la concentración de lecitina. Lo anterior concuerda con estudios anteriores, en donde se plantea que la molécula de lecitina, al aumentar la concentración de la solución, produciría una desaceleración en el proceso de formación de cristales de calcita (Wan *et al.*, 2009). La formación sostenida de cristales de vaterita obtenida en este estudio, y su aparente estabilidad, no sólo demuestra que la lecitina puede desacelerar la formación de cristales de calcita, sino también refleja que el aumento en la concentración de la solución de CaCl_2 -lecitina, estaría favoreciendo la formación de micelas inversas, que actuarían como una matriz estable para la cristalización de vaterita a nivel intramicelar.

En relación a la morfología, pareciera haber una correlación entre las alteraciones morfológicas de los cristales y la concentración de la solución de CaCl_2 -lecitina. En relación a este punto, conforme se aumenta la concentración de la solución aparecen alteraciones en la superficie de los cristales de calcita, y a su vez, comienzan a aparecer cristales de vaterita, que también empiezan a mostrar alteraciones en su superficie con zonas muy irregulares, porosas y formas atípicas. No obstante, la concentración neta de la solución al parecer no sería el único factor determinante en la aparición de alteraciones morfológicas en los cristales de CaCO_3 , ya que al analizar los resultados en base a la solución madre utilizada, se observaron grandes diferencias morfológicas entre cristales preparados con diferentes soluciones madres, aun cuando presentaran la misma cantidad neta de lecitina. Un ejemplo de esto, son los cristales de los micropocillos M9 y M11, ya que ambos tienen una concentración neta de 525 μg , sin embargo el micropocillo M9 fue preparado utilizando la solución madre de 150 mg/ml, mientras que el micropocillo M11 se preparó con la solución madre de 300 mg/ml. Al analizar los dos tipos de cristales formados, si bien ambos tienen el mismo tamaño promedio de 70 μm , los cristales del micropocillo M9 presentan una desviación de 7,25 y son considerablemente más homogéneos tanto en tamaño como en su morfología. Por otro lado, los cristales del

micropocillo M11 presentan una desviación de 22 y presentan una alta variabilidad tanto en tamaño como en su morfología. Esto es un punto importante a considerar, ya que da cuenta de que independientemente de la concentración, el tipo de solución madre utilizada también pareciera influir en la morfología de los cristales obtenidos, lo cual podría relacionarse con el tipo y tamaño de las micelas que se forman en cada una de las soluciones madres.

Lo anterior demuestra la importancia que tiene la disposición espacial de las micelas de lecitina, puesto que dependiendo de este factor, se generan distintos polimorfos con características morfológicas específicas.

CONCLUSION

El método de difusión de gases constituyó una excelente forma de generar cristales de CaCO_3 . Gracias a esto, se obtuvieron numerosos cristales que sirvieron para analizar el efecto de la lecitina sobre el proceso de cristalización. Para este estudio, se consideró un análisis de espectro de Raman y un análisis morfológico mediante SEM. En relación a los métodos utilizados, es importante mencionar que el análisis de espectro de Raman, si bien permitió determinar el tipo de polimorfo presente en las preparaciones, demostró ser un método altamente sensible a la cantidad de muestra analizada, factor que dificultó el análisis de las preparaciones de este estudio. Por otro lado, el análisis de los cristales mediante SEM constituyó un buen método para el análisis morfológico de los distintos polimorfos, mostrando ampliamente los efectos de la lecitina en los cristales obtenidos.

La aparición de cristales de calcita con modificaciones en su superficie, y la presencia de cristales de vaterita, reflejaron la gran influencia que tiene la molécula de lecitina en el proceso de cristalización de CaCO_3 . Asimismo, las características de las micelas tanto en tamaño como en disposición espacial (micelas inversas o tradicionales), demostró ser un factor capaz de influir fuertemente en los polimorfos obtenidos.

Si bien en un comienzo se esperaba obtener sólo cristales de calcita mediante cristalización a nivel intermicelar, la presencia de abundantes cristales de vaterita da cuenta de que en emulsiones de estas características, habría también nucleación de cristales a nivel intramicelar. En este sentido, se observó que al parecer existiría una fuerte relación entre la concentración de la solución de lecitina y la formación de micelas de tipo inversas, que permitirían la nucleación y estabilización de cristales de vaterita en el espacio intramicelar.

Faltan más estudios para determinar exactamente el tipo y características de las micelas formadas en cada una de las soluciones a utilizar, no obstante, la presencia de los distintos polimorfos observados en este estudio, permiten plantear la teoría de la presencia de micelas de tipo tradicional y micelas de tipo inversas.

Por otro lado, la lecitina demostró actuar como plantilla para la nucleación de cristales de CaCO_3 , así como también, ser una molécula capaz de influir en las características de los cristales obtenidos. Reflejo de esto corresponden a los cristales observados desde el micropocillo M1 al M12, si se comparan con el micropocillo control (M0).

Los resultados del presente estudio demuestran la enorme influencia que tiene la molécula de lecitina en el proceso de biomineralización, y considerando que esta molécula se encuentra presente comúnmente en la membrana celular, sin duda abre paso a nuevos estudios que permitan analizar el efecto *in vitro* de la membrana celular, en el proceso de biomineralización de CaCO_3 .

BIBLIOGRAFÍA

- **AGARWAL, P., BERGLUND, K.** 2003. In Situ Monitoring of Calcium Carbonate Polymorphs during Batch Crystallization in the Presence of Polymeric Additives Using Raman Spectroscopy. *Cryst Growth Des.* 3(6): 941-946.
- **AL-RAWAJFEH, A.** 2008. Simultaneous desorption–crystallization of CO₂–CaCO₃ in multi stage flash (MSF) distillers. *Chem Eng and Process.* (47): 2262–2269.
- **ARIAS, JL.; ARIAS, JI.; FERNANDEZ, MS.** 2007. Chapter 6. Avian Eggshell as a Template for Biomimetic Synthesis of New Materials. **In:** Bäuerlein, E.; Behrens, P. *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation.* Wiley-VCH. Alemania. 423 pp.
- **BÄUERLEIN, E.** 2003. Biomineralization of unicellular organisms: an unusual membranebiochemistry for the production of inorganic nano and microstructures. *Angew Chem Int Ed.*(42): 614–641.
- **EASTOE, J.; HOLLAMBY, M.; HUDSON, L.** 2007. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 128(130): 5-15.
- **GOWER, L.** 2008. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization. *Chem Rev.* (108): 4551–4627.
- **HOON KANG, S.; HIRASAWA, I.; KIM, W.; KYUN CHOI, C.** 2005. Morphological control of calcium carbonate crystallized in reverse micelle system with anionic surfactants SDS and AOT. *J Colloid Interf Sci.* (288): 496–502.
- **HUTCHENS, S.; BENSON, R.; EVANS, B.; O'NEILL, H.; RAWN, C.** 2006. Biomimetic synthesis of calcium deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel. *Biomaterials.* (26):4661-4670.
- **KIM, Y.; GANESAN, K.; YANG, P.; KULAKI, A.; BORUKHIN, S.; PECHOOK, S.; RIBEIRO, L.; KRÖGER, R.; EICHHORN, S.; ARMES, S.; POKROY, B.; MELDRUM, F.** 2011. An artificial biomineral formed by incorporation of copolymer micelles in calcite crystals. *Nat Mater.* (10): 890 – 896.
- **LEE, T.; GUO CHEN, J.** 2009. Biomimetic Gallstone Formation: Crystallization of Calcium Carbonate by the Evolving Taurocholate-Lecithin-Cholesterol Complex Lipid System. *Cryst Growth Des.* 9(8): 3737–3748.
- **LI, H.; ESTROFF, L.** 2009. Calcite Growth in Hydrogels: Assessing the Mechanism of Polymer-Network Incorporation into Single Crystals. *Adv Mater.* (21): 470–473.

- **LOSTE, E.; WILSON, R.; SESHADRI, R.; MELDRUM F.** 2003. The role of magnesium in stabilising amorphous calcium carbonate and controlling calcite morphologies. *J Cryst Growth.* (254): 206-218.
- **METZLER, R.; TRIBELLO, G.; PARRINELLO, M.; GILBERT, P.** 2010. Asprich peptides are occluded in calcite and permanently disorder biomineral crystals. *J Am Chem Soc.* (132): 11585-11591.
- **PAL, P.; KAMILYA, T.; ACHARYA, S.; TALAPATRA, G.** 2010. Formation of Calcium Carbonate Crystal Using Phospholipid Monolayer Template Under Ambient Condition. *J PhysChem C.* (114): 8348–8352.
- **STEPHENS, C.; KIM, Y.; MELDRUM, F.; CHRISTENSON, H.** 2011. Early stages of crystallization of calcium carbonate revealed in picoliter droplets. *J Am Chem Soc.* (133): 133(14): 5210-5213.
- **SZCZEŃS, A.** 2013. Effects of DPPC Cholesterol liposomes on the properties of freshly precipitated calcium carbonate. *Colloids Surf B.* (101): 44– 48.
- **WAN, P.; ZHAO, Y.; TONG, H.; YANG, Z.; ZHU, Z.; SHEN, X.; HU, J.** 2009. The inducing effect of lecithin liposome organic template on the nucleation and crystal growth of calcium carbonate. *Mater Sci Eng C.* (29): 222–227.
- **WANG, Y.; KIM, Y.; STEPHENS, C.; MELDRUM, F.; CHRISTENSON, H.** 2012. In Situ Study of the Precipitation and Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate (ACC). *Cryst Growth Des.* (12): 1212–1217.
- **WEHRMEISTER, U.; SOLDATI, L.; JACOB, E.; HÄGERA, T.; HOFMEISTERA, W.** 2009. Raman spectroscopy of synthetic, geological and biological vaterite: a Raman spectroscopic study. *J. Raman Spectrosc.* (41): 193–201.
- **YAODONG, W.; CHENG, CH.; JINRONG, Y.; XIN, CH.; ZHENGZHONG, SH.** 2011. Crystallization of Calcium Carbonate on Chitosan Substrates in the Presence of Regenerated Silk Fibroin. *Langmuir.* (27): 2804–2810.
- **ZHOU, G.; GUAN, Y.; YAO, Q.; FU, S.** 2010. Biomimetic mineralization of prismatic calcite mesocrystals: Relevance to biomineralization. *Chem Geol.* (279): 63–72.