



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

**EFFECTO DE LA TOPOGRAFIA DE MALLAS ELECTROHILADAS DE
POLICAPROLACTONA (PCL) COMO MATRIZ PARA LA CRISTALIZACIÓN *IN VITRO*
DE CARBONATO DE CALCIO (CaCO₃) MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE
DIFUSIÓN DE GASES**

Felipe Esteban Sepúlveda Cerda

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: ANDRÓNICO NEIRA CARRILLO
UNIVERSIDAD DE CHILE
FINANCIAMIENTO FONDECYT REGULAR N° 1171520
SANTIAGO, CHILE

2019



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

**EFFECTO DE LA TOPOGRAFIA DE MALLAS ELECTROHILADAS DE
POLICAPROLACTONA (PCL) COMO MATRIZ PARA LA CRISTALIZACIÓN *IN VITRO*
DE CARBONATO DE CALCIO (CaCO₃) MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE
DIFUSIÓN DE GASES**

Felipe Esteban Sepúlveda Cerda

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

Nota Final

Profesor Guía:	Dr. Andrónico Neira Carrillo
Profesor Corrector:	Dr. José Luis Arias
Profesor Corrector	Dr. Mehrdad Yazdani-Pedram

SANTIAGO, CHILE

2019

AGRADECIMIENTOS

Otorgo gran parte de este merito a mi compañera de vida, quien siempre ha sabido acompañarme, entenderme y motivarme, una suerte fue el conocerla. A mi familia que siempre me ha dado el espacio de ser una persona libre de tomar mis propias decisiones, gracias a mi padre y mi madre, gracias a mis tíos, tías y a mis abuelas quienes siempre me han apoyado sin importar las inclemencias.

Me gustaría destacar y agradecer la participación de mi profesor guía Dr. Andrónico Neira quien además de ser un excelente docente, es excelente persona, con muchos valores, y que sin pensarlo se convirtió en un gran referente para mi crecimiento personal y para mi desarrollo como futuro profesional.

Mis más sinceros agradecimientos a todos los integrantes del laboratorio Nicole, Felipe, Nacho y Caro, los cuales no solo me enseñaron a trabajar en este espacio, sino que además, fueron una guía permanente en mi estadía en el laboratorio, con mención honrosa a Nicole quien me tuvo una eterna paciencia.

Y por último dedicarle este logro a la persona a quien más le debo en la vida, a quien me enseñó a ser y a vivir... Gracias Abuelo.

INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Preparación de las mallas electrohiladas de PCL	10
Preparación de cristales de carbonato de calcio	12
Determinación de morfología, tamaño y polimorfismo de cristales y mallas	13
RESULTADOS	15
Caracterización de las mallas electrohiladas de PCL	15
Determinación del ángulo de contacto	16
Análisis morfológico y estructural de los cristales de CaCO_3 y mallas electrohiladas de PCL.....	17
Determinación del polimorfismo cristalino de CaCO_3	25
DISCUSIÓN	27
CONCLUSIÓN	31
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

El carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los biominerales más estudiados debido a sus múltiples utilidades. Diversos polímeros naturales y sintéticos han sido utilizados como aditivos y/o sustratos en ensayos de cristalización *in vitro*, modificando la morfología de cristales CaCO_3 . No existe evidencia actualmente de cómo influye la disposición espacial de mallas electrohiladas a base de policaprolactona (PCL).

En el presente estudio se utilizó el método de difusión de gases para la formación de los cristales de CaCO_3 , se evaluó el efecto de la topografía de mallas electrohiladas de PCL con fibras de distribución al azar o alineadas, con presencia y ausencia de poros en la superficie de las fibras en la cristalización *in vitro* de CaCO_3 . Lo anterior permitirá conocer la importancia de la disposición espacial de las fibras y de las características superficiales de éstas sobre la nucleación y crecimiento cristalino del CaCO_3 .

Los resultados fueron obtenidos mediante microscopía óptica, microscopía electrónica asociado a un detector de dispersión de energía (SEM-EDS), espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y difracción de rayos x (XRD), a través de los cuales se logró establecer la presencia de los polimorfos calcita y vaterita de CaCO_3 . Simultáneamente, se observaron alteraciones morfológicas y de tamaño cristalino en ambos polimorfos dependiendo del tipo de malla utilizado, lo cual permitió concluir que la disposición espacial y la superficie de las mallas de PCL influyen directamente en el control morfogénico y en la nucleación cristalina controlando el polimorfismo de los cristales de CaCO_3 obtenidos en las condiciones experimentales estudiadas.

Palabras clave: Cristalización, policaprolactona, difusión de gases, carbonato de calcio, polimorfismo

ABSTRACT

Calcium carbonate (CaCO_3) is one of the most studied biominerals due to its multiple utilities. Various natural and synthetic polymers have been used as additives and / or substrates in vitro crystallization assays, modifying the morphology of CaCO_3 crystals. There is currently no evidence of how the spatial arrangement of polycaprolactone-based electrospun meshes (PCL) influences.

In the present study the gas diffusion method was used for the formation of the crystals, the effect of electrospun meshes of PCL was evaluated, with random distribution or alignment of its fibers, with or without the presence of pores on its surface, in the crystallization of CaCO_3 in vitro, in order to analyze the importance of the spatial arrangement of the fibers and the surface characteristics of these on the nucleation and crystal growth of CaCO_3 .

The results were obtained using optical microscopy, electronic scanning microscopy associated with an energy dispersion detector (SEM-EDS), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) and x-ray diffraction (XRD). There were found two polymorphs of CaCO_3 , called calcite and vaterite. Furthermore, alterations in the characteristics of both polymorphs were observed depending on the type of mesh used, which allowed to conclude that the spatial arrangement and the surface of the PCL meshes used, can not only modify the morphology of the obtained CaCO_3 crystals, but also are able to determine the formation of the different crystalline polymorphs.

Keywords: Crystallization, polycaprolactone, gas diffusion, calcium carbonate, polymorphism

INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, la biomineralización corresponde a un eficiente proceso de cristalización biológica, el cual ha generado amplio interés en varias disciplinas científicas, resultando en su replicación *in vitro* mediante el uso de diversas moléculas como proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos y polisacáridos, con la finalidad de desarrollar y entender la formación de materiales inorgánicos funcionales (Hernández, 2009; Gopi *et al.*, 2013).

Entre los más de 60 biominerales conocidos, el carbonato de calcio (CaCO_3) es uno de los más estudiados en la naturaleza. El CaCO_3 cumple un importante rol a nivel estructural de diversos organismos, formando parte de exoesqueletos de insectos, conchas de protección en moluscos, crustáceos y cáscaras de huevo (Gower, 2008).

Se han descrito diversas superficies orgánicas que sirven de andamio (molde orgánico) para estudiar los fenómenos implicados durante la biomineralización, como películas de Langmuir Blodgett con lípidos (Szcze, 2013), geles con albúmina, con glicina (Gan *et al.*, 2017), matriz de quitosano, entre otras. La cristalización del CaCO_3 y su crecimiento *in vitro*, ha sido estudiado además con distintos polímeros sintéticos, dando lugar a diversas morfologías para estos cristales (Addadi *et al.*, 2006; Bhardwaj *et al.*, 2010).

La policaprolactona (PCL) es un polímero sintético semicristalino, biodegradable y biocompatible. Mallas electrohiladas de este polímero han sido ampliamente estudiadas para la liberación controlada de fármacos y en aplicaciones biomédicas. PCL también ha utilizado en membranas de regeneración ósea, a través del uso de membranas híbridas a base de mallas electrohiladas de PCL en conjunto con CaCO_3 , observándose buena adhesión y proliferación celular (Sinha *et al.*, 2004; Woodruff y Hutmacher, 2010).

En relación al uso de fibras de PCL en ensayos de mineralización de CaCO_3 , no existe evidencia de la influencia de la disposición espacial de fibras de PCL en mallas electrohiladas a base de PCL sobre aspectos morfológicos y en la nucleación de CaCO_3 usando ensayos de cristalización *in vitro* mediante difusión de gases. Por tal razón, en la presente memoria de título se utilizará el método de difusión de gases para estudiar el efecto de la topografía de fibras de PCL con distribución al azar y alineadas y la presencia superficial de poros en ellas sobre la cristalización *in vitro* de cristales de CaCO_3 .

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La biomineralización se define como el proceso mediante el cual los organismos vivos precipitan minerales bajo un estricto control biológico, mediante una extracción selectiva y absorción de iones de un ambiente confinado local, para formar cristales que se incorporan a estructuras funcionales. Dentro de los principales temas de investigación sobre la biomineralización o cristalización biológica, se encuentra el estudio de los mecanismos involucrados en la formación de cristales, incluyendo el ordenamiento que presentan los átomos, el tamaño de los cristales, la nucleación y el crecimiento y morfología de los materiales cristalinos. El producto final de este proceso es un mineral biogénico, o también denominado biomineral, el cual se forma mediante la interacción entre los cristales, iones, moléculas biológicas y macromoléculas que se introduce controladamente en el sitio de cristalización de éstos (Addadi *et al.*, 2006).

La biomineralización da lugar a una gran diversidad de materiales con formas variadas y microestructuras con un alto grado de organización, tales como, conchas de moluscos, cáscaras de huevos, dientes, huesos, otolitos, cocolitos, así como también a formas cristalinas con un carácter patológico como cálculos biliares o renales (Hernández, 2009).

Se reconocen dos etapas principales en el proceso de cristalización biológica: la nucleación y el crecimiento cristalino. Entendiendo por nucleación al proceso por el que una fase sólida ordenada de átomos, iones o moléculas se segregan a partir de un fundido, vapor o de una disolución, formando agrupaciones o “*clusters*” de los cuales sólo algunos alcanzarán un tamaño crítico o estable para el crecimiento cristalino. La segunda etapa, inicia con la aparición de un núcleo estable, el cual proporciona al sistema una superficie para favorecer el crecimiento cristalino por la incorporación de unidades de crecimiento adquiriendo así un tamaño observable. Entendiendo, además, que para posibilitar este proceso se requiere de cierta sobresaturación en la disolución, la cual se puede alcanzar mediante diferentes mecanismos como, por ejemplo, a través de la evaporación del disolvente, control de la temperatura, el pH o por adición de un disolvente en el que el soluto sea menos soluble o bien por reacción química. Según sean las condiciones físico-químicas de un sistema, una misma sustancia química puede cristalizar con diferentes estructuras y dar lugar por tanto a diferentes fases cristalinas (Han *et al.*, 2006; Hernández, 2009; Ma *et al.*, 2010).

El calcio se distribuye ampliamente en la naturaleza y es el principal constituyente de muchas rocas sedimentarias, exoesqueletos, conchas de moluscos y crustáceos, y cáscaras de huevo. Este elemento se puede encontrar combinado con diferentes aniones, tales como carbonato, fosfato, sulfatos, haluros, oxalatos, entre otros. El proceso de cristalización del CaCO_3 es uno de los más estudiados en condiciones de laboratorio y los mecanismos involucrados en el proceso de biomineralización permiten controlar el tamaño, forma, orientación, fase, textura y tipo de cristales (Addadi *et al.*, 2006; Gower, 2008; Devia, 2014).

El mineral de CaCO_3 puede adoptar seis estructuras conocidos como polimorfos cristalinos: calcita, aragonita, vaterita, dos corresponden a fases hidratadas: monohidrato de carbonato de calcio (monohidrocalcita) y hexahidrato de carbonato de calcio (hexahidrocalcita) y finalmente, es posible encontrar CaCO_3 amorfo (CCA) (Gopi *et al.*, 2013). Los cristales de calcita se observan de forma típicamente romboédrica, la aragonita aparece como prismas o agujas, y la vaterita forma esferulitas policristalinas (Cizer *et al.*, 2012). Siendo calcita y aragonita los dos polimorfos termodinámicamente más estables y los más ampliamente encontrados en estructuras biominerales (Hernández, 2009; Sekkal y Zaoui, 2013; Du *et al.*, 2016).

En cuanto a la obtención de formas cristalinas, en laboratorio, se realiza esta cristalización a través de diversas técnicas, siendo las más frecuentes la difusión de gases y recientemente la electrocristalización, debido a que se busca lograr una simplificación y mayor control de la nucleación en los procesos de cristalización *in vitro*. En la difusión de gases la solución llega gradualmente a la sobresaturación a través de la descomposición de bicarbonato de amonio, sin aditivos adicionales. El CaCO_3 precipita en cualquiera de los tres polimorfos cristalinos (Dickinson *et al.*, 2002; Gehrke *et al.*, 2005).

Por otro lado, la técnica de electrospinning o electro hilado, consiste en la generación de micro y/o nano fibras mediante el uso de un campo eléctrico aplicado sobre una solución polimérica. La técnica de electrospinning se basa en el principio de que potentes fuerzas de repulsión eléctricas generadas en la solución polimérica superan fuerzas más débiles de tensión superficial en el líquido de polímero cargado, permitiendo generar fibras poliméricas tridimensionales similares a la matriz extra celular comparado con las técnicas

convencionales, lo anterior permite generar una malla electrohilada compuesta de múltiples fibras que fluctúan desde 5 nanómetros (nm) a varios micrómetros (μm).

Esta técnica ofrece varias ventajas, tales como, alta relación superficie-volumen, porosidad adaptable, tamaño del diámetro de fibras, topología superficial de mallas electrohiladas, composición de las fibras, lo que permite conseguir distintas propiedades y funcionalidad desde las mallas electrohiladas (Bhardwaj *et al*, 2010).

La técnica de electrospinning fue observado por primera vez en 1897 por Rayleigh, y perfeccionada por Formhals, quien entre 1934 y 1944 publicó una serie de patentes que describen una configuración experimental para la producción de filamentos de polímeros utilizando una fuerza electrostática (Bhardwaj *et al*, 2010; Pant, *et al*. 2011). Posteriormente, los trabajos realizados por Taylor (1969) sobre chorros impulsados eléctricamente sentaron las bases para el electrospinning. Esta técnica presenta cada vez mayor atención e interés debido a su gran versatilidad y fácil aplicación como también su capacidad para generar fibras con porosidad, las cuales puede ser ajustadas de acuerdo a los múltiples propósitos de las mallas electrohiladas. Debido a lo anterior, este proceso puede ser utilizado en diversas aplicaciones, tales como, la formación de andamios para su uso en ingeniería de tejidos, como membrana en biosensores, indumentaria protectora, cosméticos, membranas de afinidad, aplicaciones de filtración, apósitos para heridas, administración de fármacos e inmovilización enzimática, biotecnología, seguridad y defensa e ingeniería ambiental entre otras (Bhardwaj *et al*, 2010).

Las fibras poliméricas obtenidas mediante electrospinning dependen de múltiples parámetros. Dentro de las características de la solución polimérica se pueden mencionar la concentración, peso molecular, conductividad, viscosidad, tensión superficial y disolventes utilizados. Respecto de los parámetros experimentales, éstos incluyen el campo eléctrico aplicado, distancias entre la punta y el colector, tipos de colectores y la tasa de flujo o velocidad de alimentación. Dentro de las características ambientales se consideran la temperatura y humedad. Cada uno de estos parámetros afectan significativamente la morfología de las fibras obtenidas y mediante la manipulación adecuada de los mismos, se pueden obtener las propiedades deseadas para las aplicaciones específicas (Bhardwaj *et al*, 2010).

Existe una amplia gama de polímeros que se utilizan en electrospinning ya sean naturales o sintéticos, uno de estos corresponde a la policaprolactona (PCL). PCL es un polímero

biodegradable, biocompatible y semicristalino que tiene una temperatura de transición vítrea muy baja, posee la capacidad de formar mezclas compatibles con otros polímeros y presenta una biodegradación lenta en comparación con otros polímeros. Todas estas características, lo convierten en un excelente biomaterial en diversas aplicaciones, tales como en sistemas de entrega de fármacos, fabricación de insumos médicos, ingeniería de tejidos, etc. (Sinha *et al.*, 2004; Woodruff y Hutmacher, 2010).

En general, para la caracterización de las fibras electrohiladas obtenidas mediante electrospinning, se consideran aspectos físico-químico y mecánicos. En primer lugar, se considera la caracterización física, la cual se asocia a la morfología y estructuras internas de las nanofibras, incluyendo el diámetro, la distribución del diámetro, la orientación de la fibra, porosidad, tamaño del poro y la morfología de la fibra. Para este tipo de caracterización se utilizan técnicas como la microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica. Otra categoría es la caracterización química de las fibras obtenidas, la que se puede realizar mediante el uso de una resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Por último, se considera la caracterización mecánica, verificando características como resistencia del material, pruebas de flexión, de tensión a micro escala, lo cual es crucial, especialmente para aplicaciones biomédicas. Un ejemplo de esto sería la utilización de andamios en ingeniería de tejidos, donde éste debe ser capaz de resistir las fuerzas ejercidas por el crecimiento de tejido o durante actividades fisiológicas y biomecánicas relacionadas (Bhardwaj *et al*, 2010).

En el contexto del desarrollo de esta memoria de título, actualmente, no existen evidencias respecto de la influencia de la disposición espacial de las fibras de PCL, en cuanto a conocer el efecto de la distribución alineada o al azar de fibras dispuestas en la malla de PCL como también la influencia de la presencia de poros en ellas, usadas como andamio orgánico sobre la cristalización *in vitro* de CaCO_3 . En el presente estudio se utilizó el método de difusión de gases para determinar el efecto que tienen cuatro tipos de mallas de PCL en el proceso de cristalización, con el fin de determinar la importancia del control topográfico de fibras con distribución al azar y alineadas, con y sin presencia de poros de las mallas electrohiladas de PCL al ser estas utilizadas como matriz orgánica en ensayos de cristalización de CaCO_3 *in vitro*.

HIPÓTESIS

La distribución al azar y/o alineadas de fibras electrohiladas y la presencia superficial de poros en las fibras de PCL utilizadas como sustrato en ensayos de cristalización *in vitro* de CaCO_3 mediante la técnica de difusión de gases afecta la nucleación y el crecimiento cristalino de CaCO_3 .

OBJETIVO GENERAL

Conocer el efecto de la distribución de fibras de PCL y su presencia de poros en mallas electrohiladas de PCL usadas como sustrato en ensayos de cristalización de CaCO_3 mediante la técnica de difusión de gases.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar y caracterizar mallas electrohiladas de PCL que presenten distribución al azar y alineadas de sus fibras con y sin presencia de poros mediante la técnica de electrospinning.
2. Determinar y comparar la morfología, tamaño y polimorfismo de los cristales de CaCO_3 obtenidos mediante difusión de gases en las mallas electrohiladas de PCL mediante el uso de microscopía electrónica de barrido, espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier y difracción de rayos X, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las mallas electrohiladas de PCL

Para la preparación de fibras de PCL se utilizó el equipo de electrospinning FLUIDNATEK® modelo LE-10, perteneciente al Laboratorio de Polyforms, del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Pecuarias y Veterinarias (FAVET), de la Universidad de Chile.

La elaboración de las mallas electrohiladas compuestas de fibras de PCL con distribución al azar y alineadas sin presencia de poros en las fibras de PCL se realizó en una sala temperada a 33 °C. Se preparó una solución polimérica de PCL al 18% que se cargó en una jeringa desechable de 5 mL. Para esto, se utilizó 9 g de PCL y 50 mL de una mezcla de solventes de acetato de etilo y acetona. La solución polimérica fue colocada en un agitador magnético con placa térmica a 40 °C hasta la formación de burbujas, para luego ser retirado y dejarla reposar durante una noche a temperatura ambiente.

Para la obtención de mallas electrohiladas de PCL con distribución al azar y alineada con presencia de poros en las fibras se utilizó el mismo procedimiento descrito, considerando un cambio en el solvente, así las mallas de PCL al 18% se obtuvieron en una mezcla de solvente de acetato de etilo y dimetilsulfóxido (DMSO) 1:9. Además, se prepararon mallas de PCL con distribución al azar y alineadas en ausencia de disolventes mediante la preparación de una película fundida de PCL, con la finalidad de ser utilizadas como el grupo control.

Para la fabricación de las mallas de PCL con distribución al azar y alineadas sin poros en las fibras, el equipo de electrospinning se utilizó con los siguientes parámetros de calibración: 20 centímetros de distancia con el colector, 12,5 kv de voltaje y 1200 μ L/h de presión, para la obtención de mallas de PCL con fibras de distribución al azar y distribución alineadas, se utilizó un colector plano y un colector rotatorio, respectivamente.

Para la fabricación de las mallas de PCL con distribución al azar y alineadas con poros en las fibras se utilizaron los siguientes parámetros de calibración: 20 centímetros de

distancia con el colector, 15 kv de voltaje y 1500 $\mu\text{L/h}$ de presión, utilizando un colector plano y un colector rotatorio.

Una vez obtenidas las mallas electrohiladas de PCL, éstas fueron cortadas y almacenadas en un desecador a temperatura ambiente hasta su uso.

Preparación de cristales de carbonato de calcio

La cristalización de CaCO_3 se realizó mediante el método de difusión de gases descrito inicialmente por Domínguez *et al.*, 2000, para esto se utilizaron las soluciones de bicarbonato de amonio $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25 mM, TRIS 200 mM a pH 9,0 y cloruro de calcio dihidratado $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mM.

El ensayo de cristalización del CaCO_3 se llevó a cabo en una cámara de cristalización de 85 mm de diámetro como se muestra en la Figura 1. Esta cámara de cristalización posee un orificio central de 8 mm en su base que la comunica con un recipiente cilíndrico de vidrio de 50 mm de diámetro y 30 mm de altura donde se depositaron 3 ml de la solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$, que sirve como un reactivo volátil y permite generar un ambiente de vapor de dióxido de carbono (CO_2). En esta cámara de cristalización se utilizaron micropocillos de vidrio adheridos con cinta adhesiva, los cuales contienen en su interior las mallas electrohiladas de PCL como andamio (substrato sólido) para los ensayos de cristalización de CaCO_3 por difusión de gases. Se utilizaron mallas de PCL con fibras de distribución al azar y alineadas, con y sin poros en la superficie de sus fibras, además mallas no electrohiladas de PCL fueron obtenidas por medio de PCL fundido, en ausencia de disolventes, el cual fue utilizado como un ensayo control en los ensayos de cristalización de CaCO_3 . Todas las mallas de PCL fueron puestas en el interior de los micropocillos, los cuales contenían 35 μL de la solución de $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ tamponado con solución Tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) a pH 9,0. Los ensayos de cristalización se realizaron a temperatura ambiente por 24 horas. Todos los ensayos de cristalización fueron realizados en duplicado.

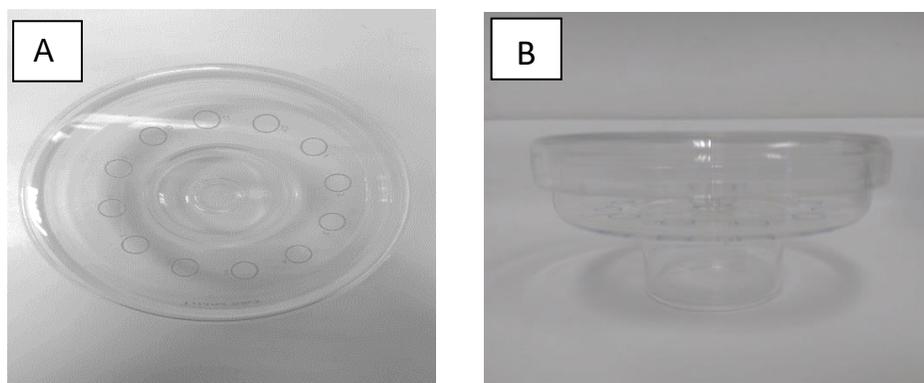


Figura 1. Vista superior (A) y lateral (B) de una cámara de cristalización de difusión de gases.

La cámara de cristalización se subdividió en 12 compartimientos, donde cada compartimiento ubicó un micropocillo y se depositaron las mallas de PCL como sustrato para los ensayos de cristalización. Para esto, se ubicaron 2 para mallas electrohiladas de PCL con distribución al azar y sin presencia de poros en su superficie, 2 para mallas electrohiladas de PCL con distribución alineada y sin presencia de poros en su superficie, 2 para mallas electrohiladas de PCL con distribución al azar con presencia de poros en su superficie, 2 para mallas electrohiladas de PCL con distribución alineada con presencia de poros en su superficie, 2 mallas de PCL fundidas no electrohiladas y 2 compartimientos con micropocillos controles (Figura 2).



Figura 2: Vista superior de la cámara de cristalización de CaCO_3 utilizada en el método de difusión de gases.

Determinación de morfología, tamaño y polimorfismo de cristales y mallas de PCL

Una vez obtenido los cristales de CaCO_3 sobre las mallas de PCL en los micropocillos, estos fueron lavados usando agua nanopura y posteriormente deshidratados usando soluciones de alcohol de crecientes concentraciones desde 50% hasta 100%.

A) Análisis morfológico mediante microscopía óptica y electrónica

Los aspectos morfológicos y tamaño de los cristales de CaCO_3 obtenidos sobre las mallas de PCL fueron analizados inicialmente mediante microscopía óptica utilizando el programa LAS EZ (Leica ICC50®) con aumentos de 4x, 10x y 40x, perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas Animales de FAVET de la Universidad de Chile. Además, se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio Jeol JSM-ITM300LV (JEOL USA Inc., USA) perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

B) Análisis estructural de las mallas de PCL y cristales de CaCO_3

Los aspectos estructurales y de análisis químico elemental, tanto de las mallas de PCL, como de los cristales de CaCO_3 obtenidos, fueron analizados mediante microscopía electrónica SEM asociada a un detector de dispersión de energía (SEM-EDS). Para esto, el microscopio SEM está conectado a un detector EDS Aztec EDX system (Oxford Instruments, Abingdon, UK), lo cual permite obtener la composición de los distintos elementos químicos constitutivos de ambos materiales. Complementariamente se utilizaron las técnicas de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) en las mallas de PCL como también en las mallas de PCL que contienen material inorgánico y la técnica de ángulo de contacto para conocer las propiedades de superficie de las mallas de PCL. Para el análisis de FTIR se utilizó un instrumento "INTERSPECTRUM, Interspec 200-X®" y para las medidas de ángulo de contacto se utilizó el equipo Dataphysics modelo OCA 15EC. Ambos instrumentos pertenecientes al laboratorio Polyforms de FAVET de la Universidad de Chile.

C) Análisis de identificación del polimorfismo cristalino

Los análisis de la identificación de los tipos de cristales de CaCO_3 depositados sobre las mallas de PCL se realizaron mediante la técnica de difracción de rayos X (XRD). Esta técnica permite identificar cualitativamente el polimorfismo de calcita, aragonita o vaterita de los cristales obtenidos. Para los análisis de XRD se utilizó un difractómetro XRD marca Siemens D-5000 con radiación $\text{CuK}\alpha$, perteneciente a la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile.

RESULTADOS

Caracterización de las mallas electrohiladas de PCL

A través de la utilización de la técnica espectroscópica FTIR se logró caracterizar las distintas mallas de PCL, donde se determinó que todas las mallas presentan el patrón espectroscópico característico del PCL. Además, como método de control se analizó una película PCL que fue fundida, esta malla de PCL se utilizó para corroborar la naturaleza química de PCL en la preparación de las diferentes mallas electrohiladas independientemente de los disolventes utilizados en la técnica de electrospinning. Nuestros resultados muestran el mismo patrón espectroscópico característico de este polímero semi-cristalino acorde a lo descrito por Shoja *et al.* (2015) (Figura 3 A-D).

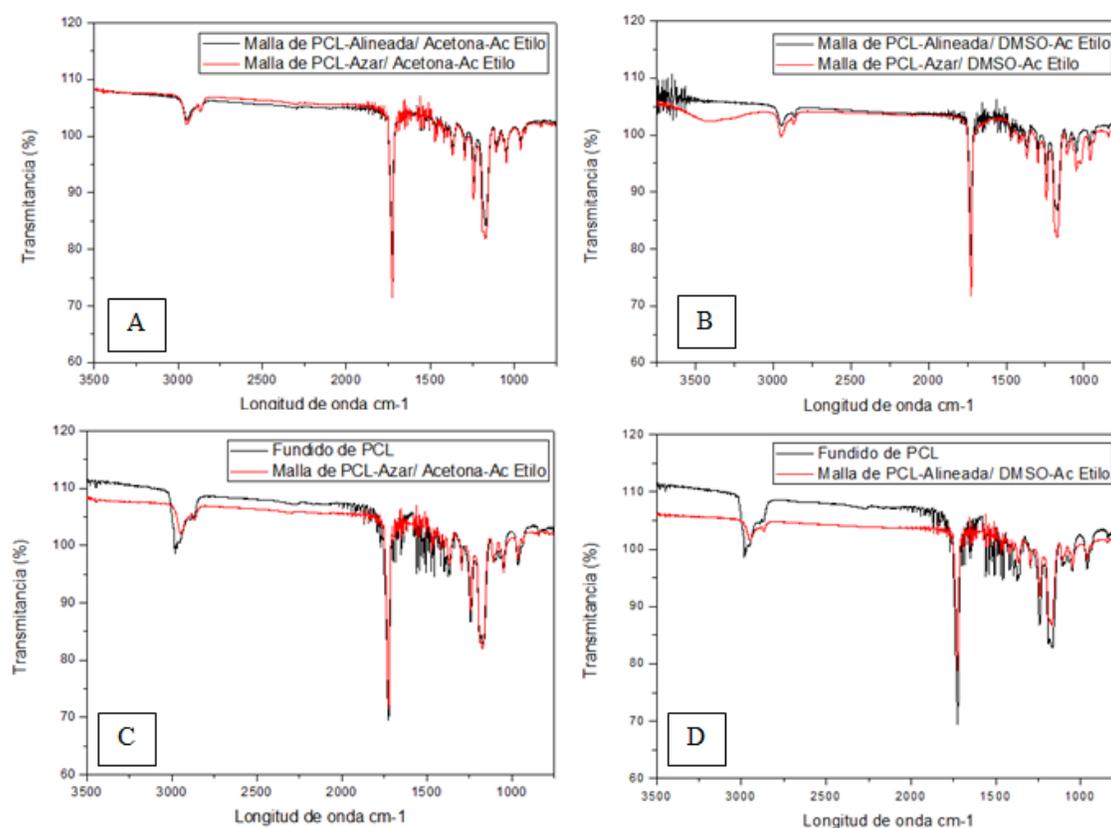


Figura 3: FTIR de las mallas electrohiladas de PCL **A)** Malla de PCL/Azar- Alineada/ Acetato de Etilo- Acetona: C-H 2945, 2865 cm^{-1} , C=O 1727 cm^{-1} y CH_2 1471- 1172 cm^{-1} , **B)** Malla de PCL/Azar- Alineada/ DMSO- Acetona: C-H 2942, 2865 cm^{-1} , C=O 1723 cm^{-1} y CH_2 1459-1171 cm^{-1} , **C)** PCL Fundido/PCL sin poros en las fibras: C-H 2946, 2868 cm^{-1} , C=O 1727 cm^{-1} y CH_2 1464 - 1172 cm^{-1} , **D)** PCL Fundido/PCL con poros en las fibras: C-H 2946, 2868 cm^{-1} , C=O 1727 cm^{-1} y CH_2 1464-1172 cm^{-1} .

Determinación del ángulo de contacto

Para complementar la caracterización espectroscópica de las mallas electrohiladas de PCL, se utilizó el equipo Dataphysics modelo OCA 15EC, con el fin de determinar el ángulo de contacto de cada muestra a distintos solventes y conocer su carácter hidrofóbico y/o hidrofílico. Para esto, se utilizaron dos solventes: Agua nano pura y la solución de CaCl_2 en una solución tampona TRIS, las cuales fueron depositadas en las distintas superficies de las mallas de PCL utilizadas en los ensayos de cristalización (Tabla1).

Tabla 1: Resumen de mediciones de ángulo de contacto

Ángulo de contacto	H ₂ O	CaCl ₂ / TRIS
Control: Vidrio	36,9°	52,3°
Control: PCL fundido	67°	78,7°
Malla PCL/Azar	107°	102°
Malla PCL/Alineada	117°	115°
Malla PCL/Azar/poros	120°	118°
Malla PCL/Alineada/poros	111°	111°

Análisis morfológico y estructural de los cristales de CaCO_3 y mallas electrohiladas de PCL

Mediante la utilización de la microscopía óptica se logró comprobar la formación de cristales. Para este análisis se utilizó un control, que consta de un micropocillo sin una malla en su interior donde se observó formación de cristales en el fondo de éstos, además del control liso de la película de PCL fundido donde se observan cristales sobre ésta. Se pudo demostrar la formación de cristales adheridos a la superficie de las fibras en los micropocillos con mallas de PCL con las 4 variantes de mallas (Figura 4).

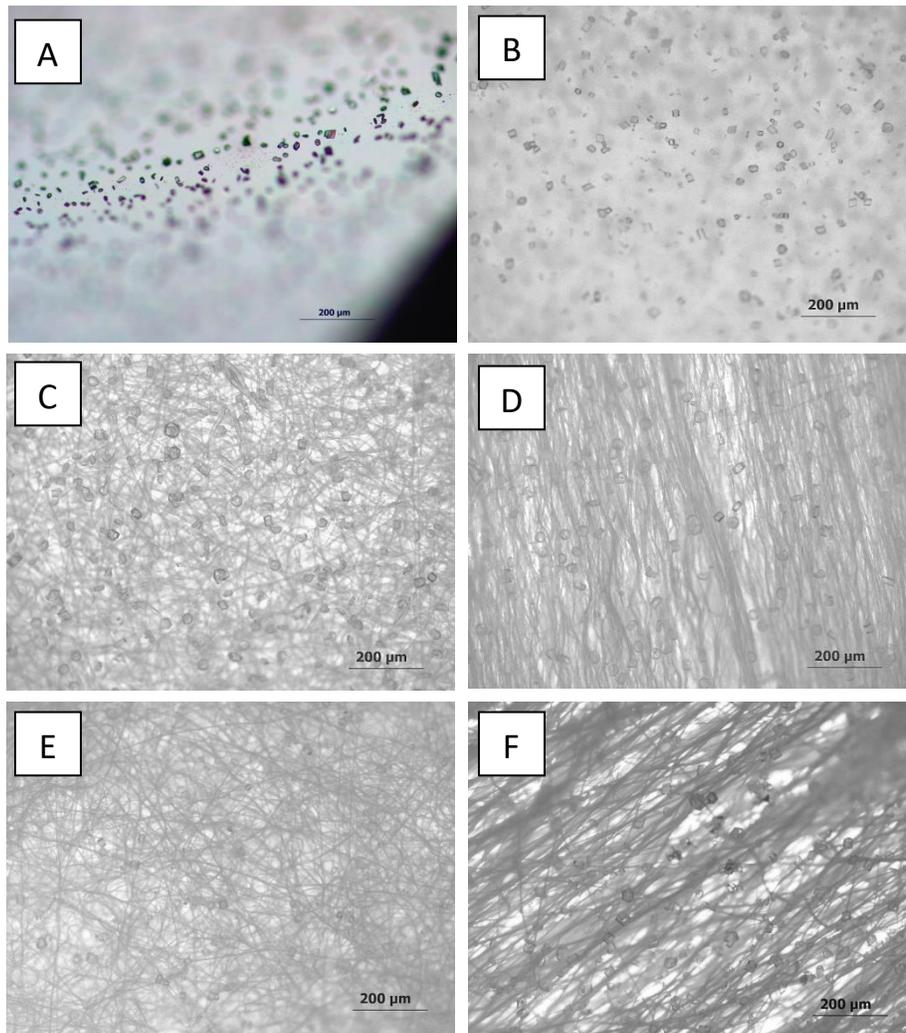


Figura 4: Imágenes óptica de cristales de CaCO_3 formados mediante la técnica de difusión de gases **A)** Micro pocillo control sin malla zoom10x, **B)** Micro pocillo control liso de PCL derretido zoom 10x. **C)** Malla de PCL con distribución al azar Zoom 10x, **D)** Malla de PCL con distribución alineada Zoom 10x, **E)** Malla de PCL con distribución al azar con presencia de poros en la superficie de sus fibras Zoom 10x, **F)** Malla de PCL con distribución alineada con presencia de poros en la superficie de sus fibras zoom10x.

Mediante la utilización de microscopía electrónica (SEM) se determinaron los aspectos morfológicos de los cristales de CaCO_3 formados, donde se observó que en todas variantes las mallas de PCL tanto el control de PCL fundido, se formó material cristalino con distintos tamaños y morfologías, en distintas proporciones dependiendo de la superficie y cristales con características típicas del polimorfo calcita. Estos cristales presentaron forma romboédrica de bordes lisos, sin escalones, aislados o aglomeraciones, de caras lisas, simétricas, adheridos a la superficie de las fibras de PCL. Además, se observó la formación de cristales con características típicas del polimorfismo vaterita de forma ovalada o discoidal, aislados o aglomerados. (Figuras 5,6,7 y 8).

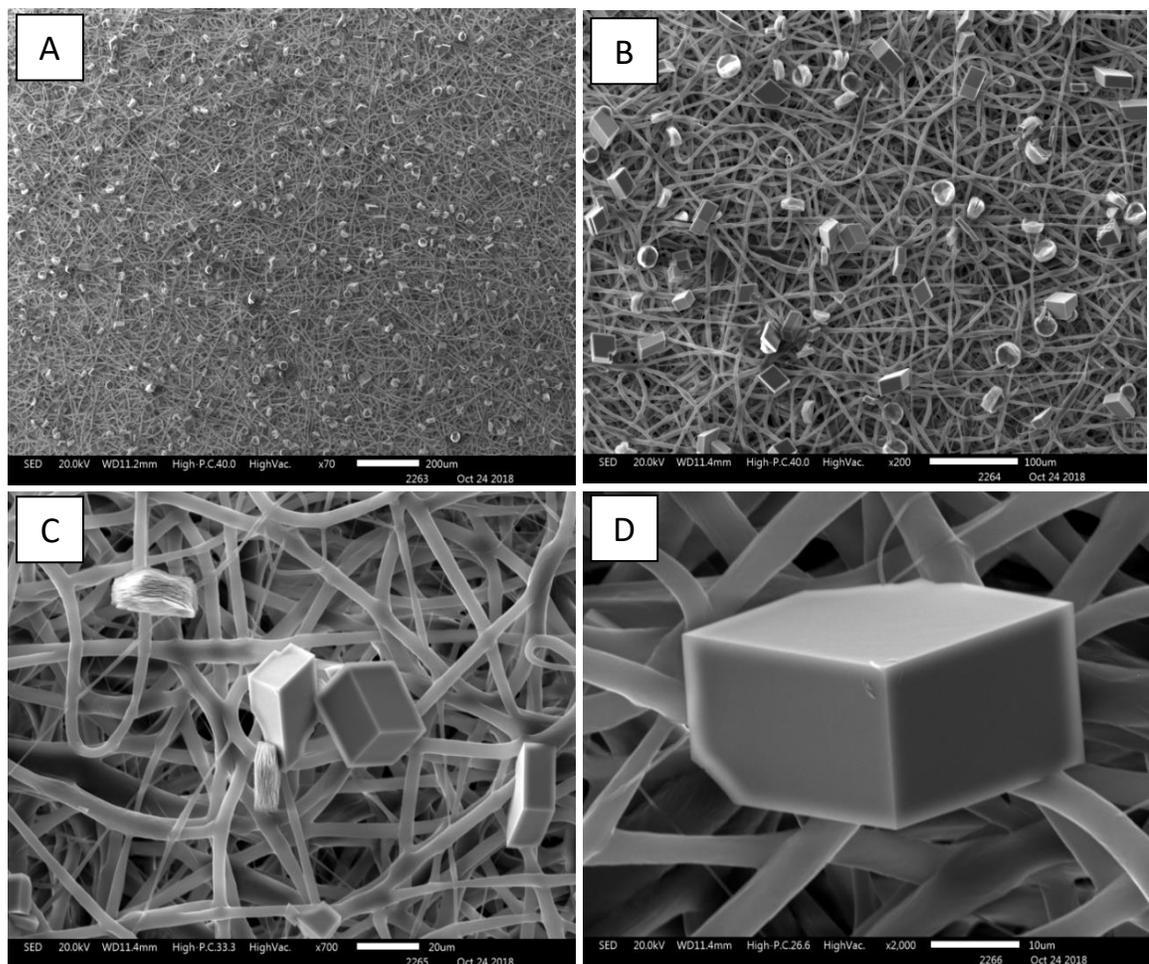


Figura 5: SEM de CaCO_3 y mallas electrohiladas de PCL/distribución al azar/sin poros en sus fibras, se observa presencia de dos morfologías en proporción 1:1, donde el tamaño para los cristales romboédricos oscila entre los 22,5 μm hasta los 25 μm y para los cristales con forma discoidal los tamaños varían entre los 21 μm hasta los 28 μm , el diámetro de las fibras se estimó un promedio de de 4,3 μm , además no se observaron aglomeraciones de cristales. **A)** Zoom x70, **B)** Zoom x200, **C)** Zoom x700, **D)** Zoom x2000

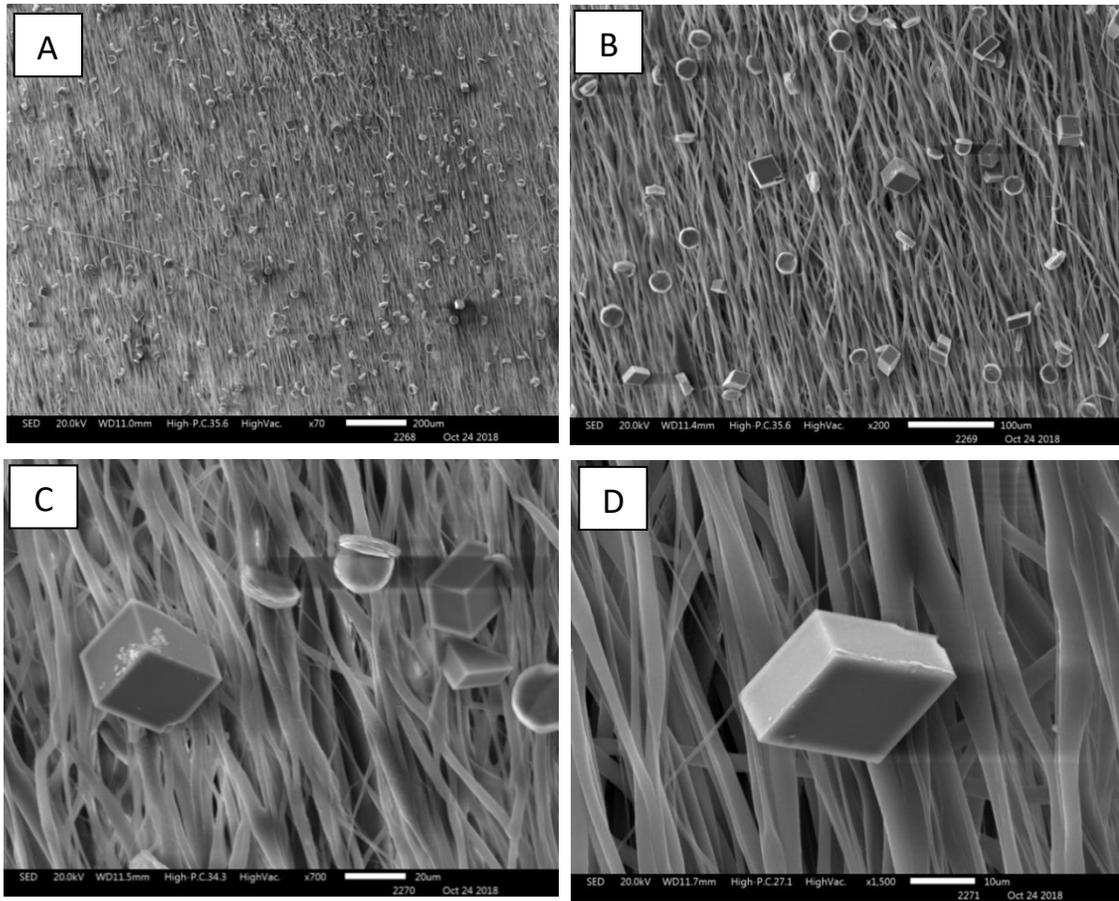


Figura 6: SEM de CaCO_3 y mallas electrohiladas de PCL/distribución alineada/sin poros en sus fibras, se observa presencia de dos morfologías con predominancia de 2:1 para los cristales de morfología discoidal, donde el tamaño promedio fue de $20\ \mu\text{m}$ y para los cristales con forma romboédrica de caras lisas el tamaño promedio es de $20,3\ \mu\text{m}$, el diámetro de las fibras se estimó un promedio de $3,35\ \mu\text{m}$, además no se observaron aglomeraciones de cristales. **A)** Zoom x70, **B)** Zoom x200, **C)** Zoom x700, **D)** Zoom x1500

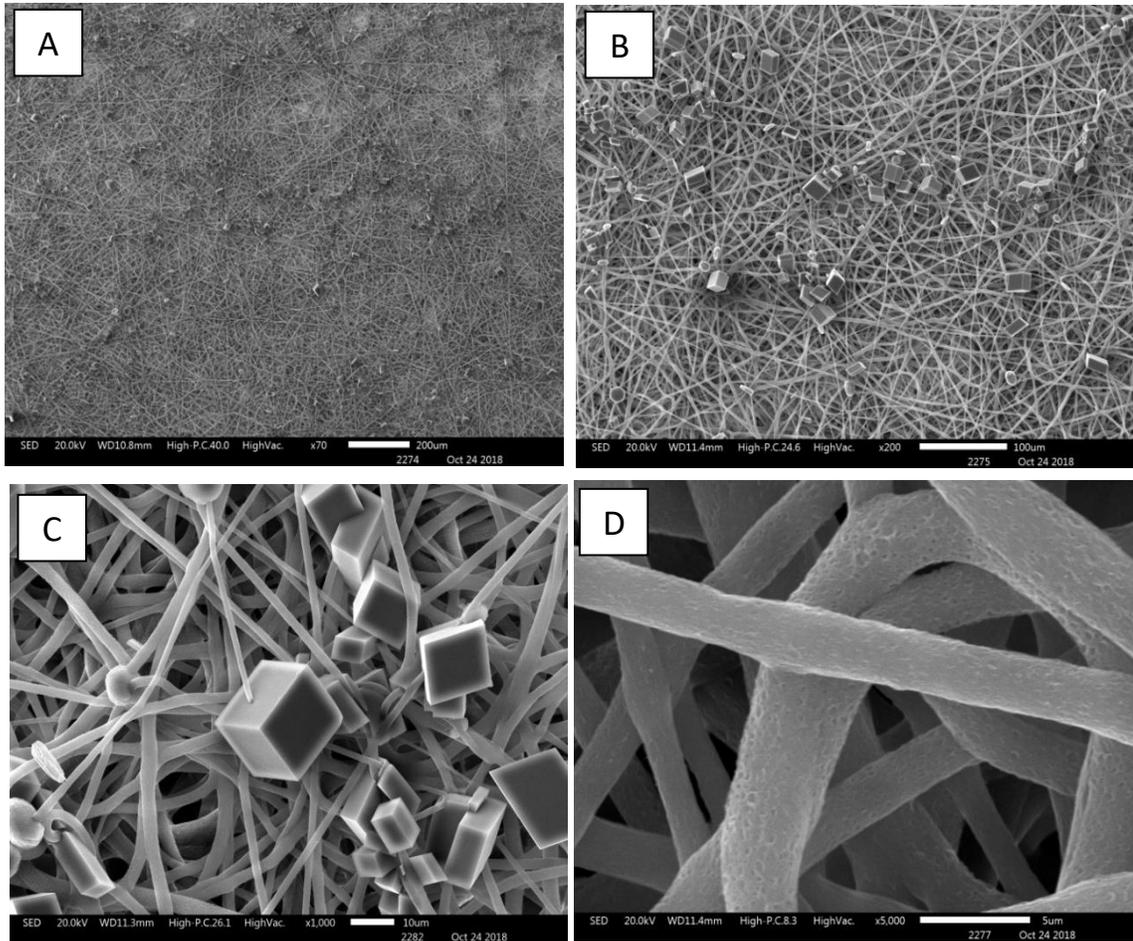


Figura 7: SEM de CaCO₃ y mallas electrohiladas de PCL/distribución al azar/con poros en sus fibras, se observa presencia de dos morfologías con predominancia de 2:1 para los cristales de morfología romboédrica, donde el tamaño promedio observado es de 13,54 μm y para los cristales con forma discoidal el tamaño promedio es de 11,75 μm , en cuanto al diámetro de las fibras se estimó un promedio de 2,4 μm y un tamaño promedio de los poros en las fibras de 203,3 nm, donde además, se observaron aglomeraciones de cristales romboédricos insertos en las fibras. **A)** Zoom x70, **B)** Zoom x200, **C)** Zoom x1000, **D)** Zoom x5000

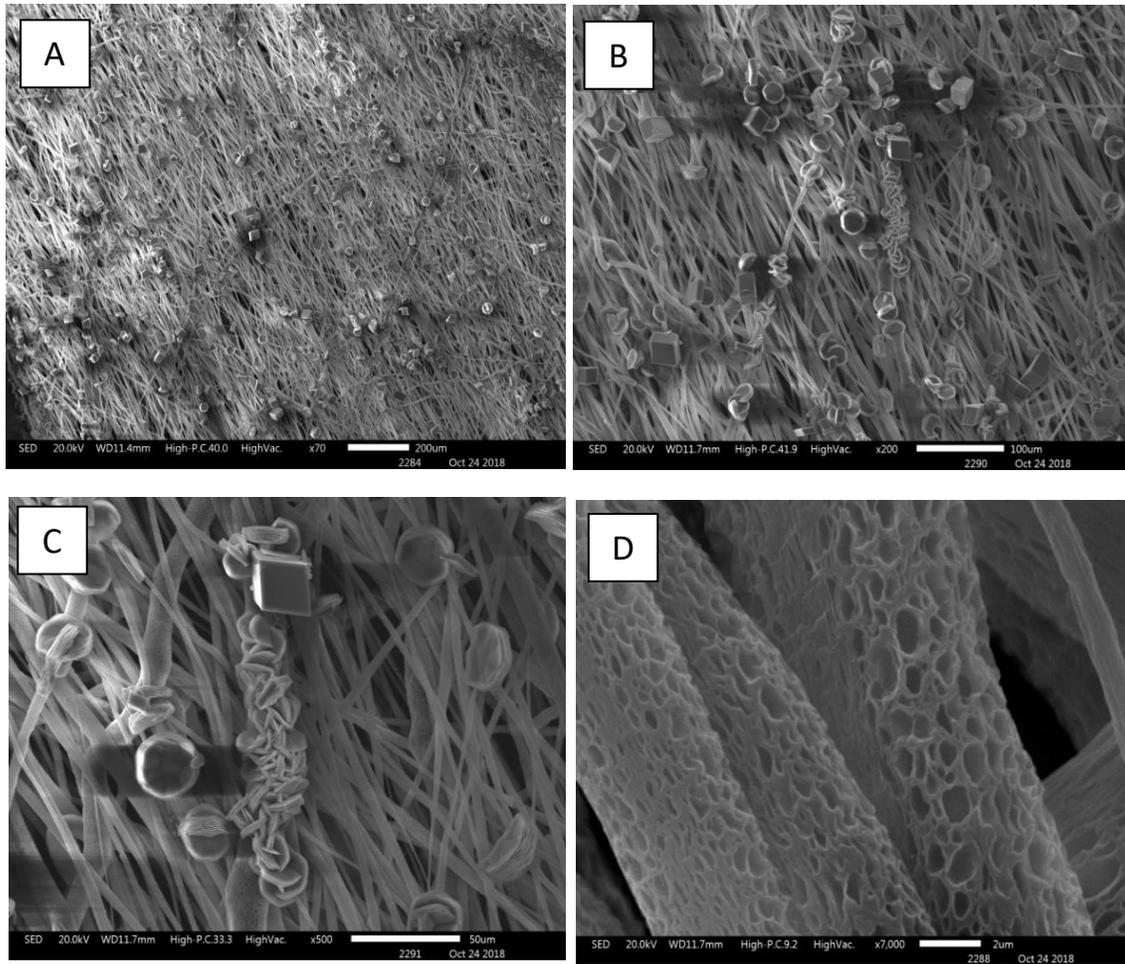


Figura 8: SEM de CaCO_3 y mallas electrohiladas de PCL/distribución alineada/con poros en sus fibras, se observa presencia de dos morfologías con predominancia de 2:1 para los cristales de morfología discoidal, donde el tamaño promedio fue de $18,5 \mu\text{m}$ y para los cristales con forma romboédrica el tamaño promedio es de $23 \mu\text{m}$, en cuanto al diámetro de las fibras se estimó un promedio de $4,5 \mu\text{m}$ y un tamaño promedio de los poros en las fibras de $1,05 \mu\text{m}$, donde además, se observaron aglomeraciones de cristales ovalados insertos en las fibras **A)** Zoom $\times 70$, **B)** Zoom $\times 200$, **C)** Zoom $\times 500$, **D)** Zoom $\times 7000$

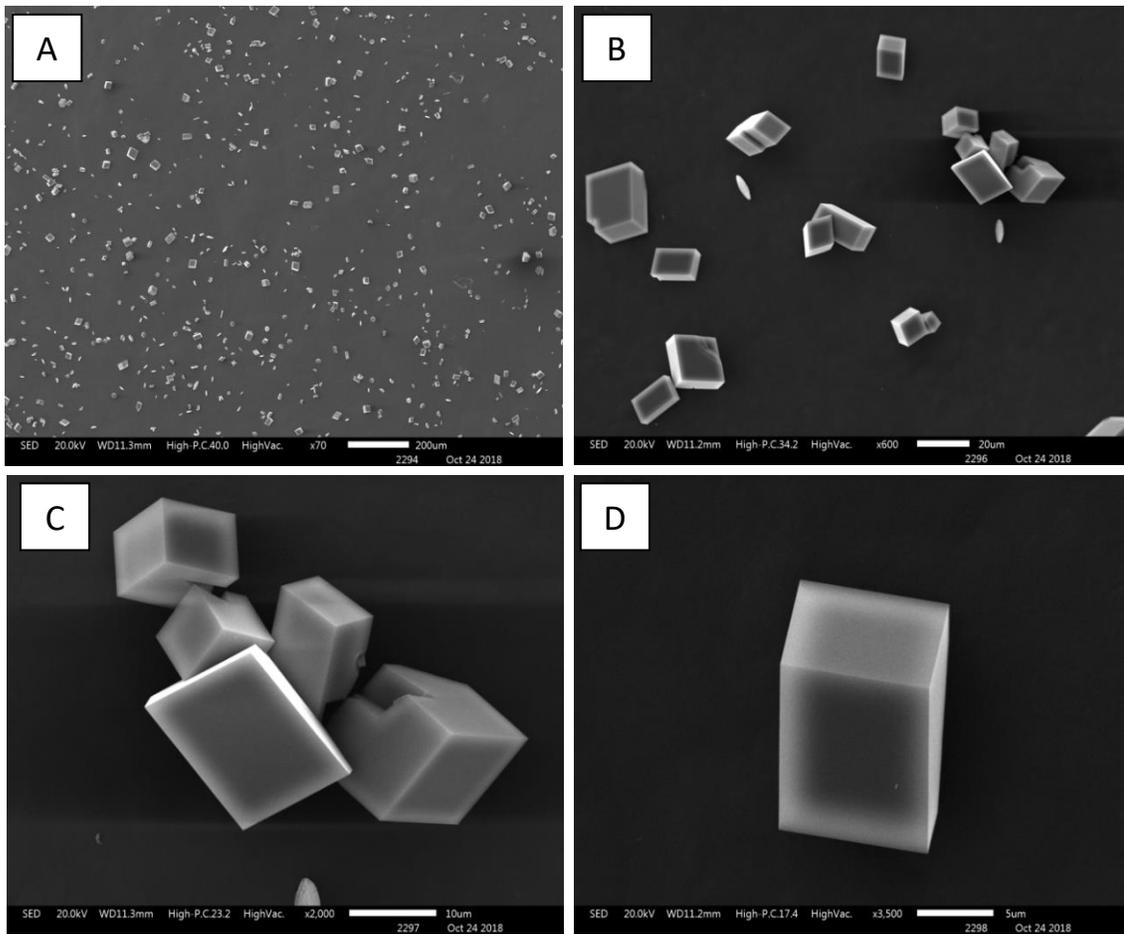


Figura 9: SEM de CaCO₃ y películas de PCL fundido, se observa presencia de dos morfologías con predominancia de 3:1 para los cristales de morfología romboédrica, donde el tamaño promedio fue de 16,8 μm y para los cristales con forma discoidal el tamaño promedio es de 12 μm , no se presentaron aglomeraciones de cristales **A)** Zoom x70, **B)** Zoom x600, **C)** Zoom x500, **D)** Zoom x3500

Además, se realizó un análisis SEM-EDS, el cual demuestra que la composición elemental química de los cristales observados tanto en las mallas de PCL como en el control de PCL derretido corresponden a cristales de CaCO_3 . Estos resultados mostraron una variación en la composición química elemental de los átomos de carbono (C), oxígeno (O) y calcio (Ca) de los cristales de CaCO_3 depositados sobre las mallas de PCL y el PCL fundido (Figuras 10 y 11).

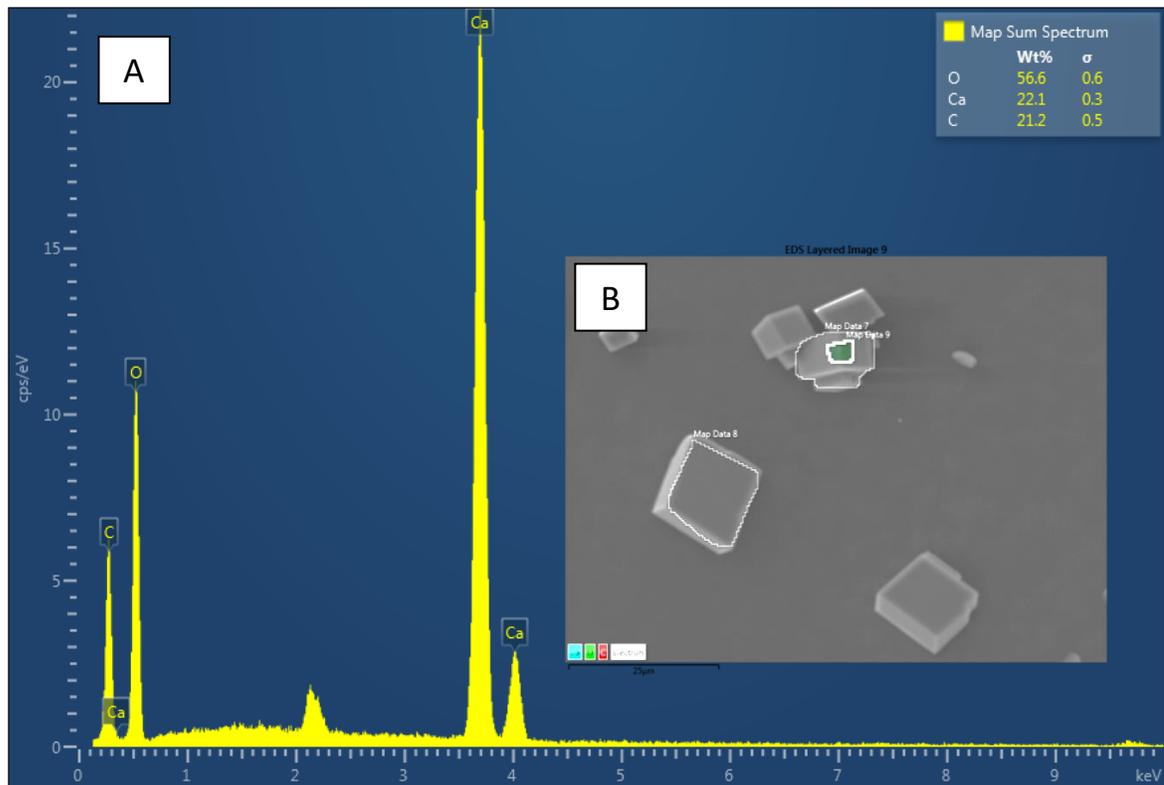


Figura 10: SEM-EDS **A)** Cristales de CaCO_3 en pocillo control de PCL fundido, **B)** Cristales de CaCO_3 en pocillo control de PCL, composición química elemental fue de 21,2% de C, 56,6% de O 21,2% de Ca.

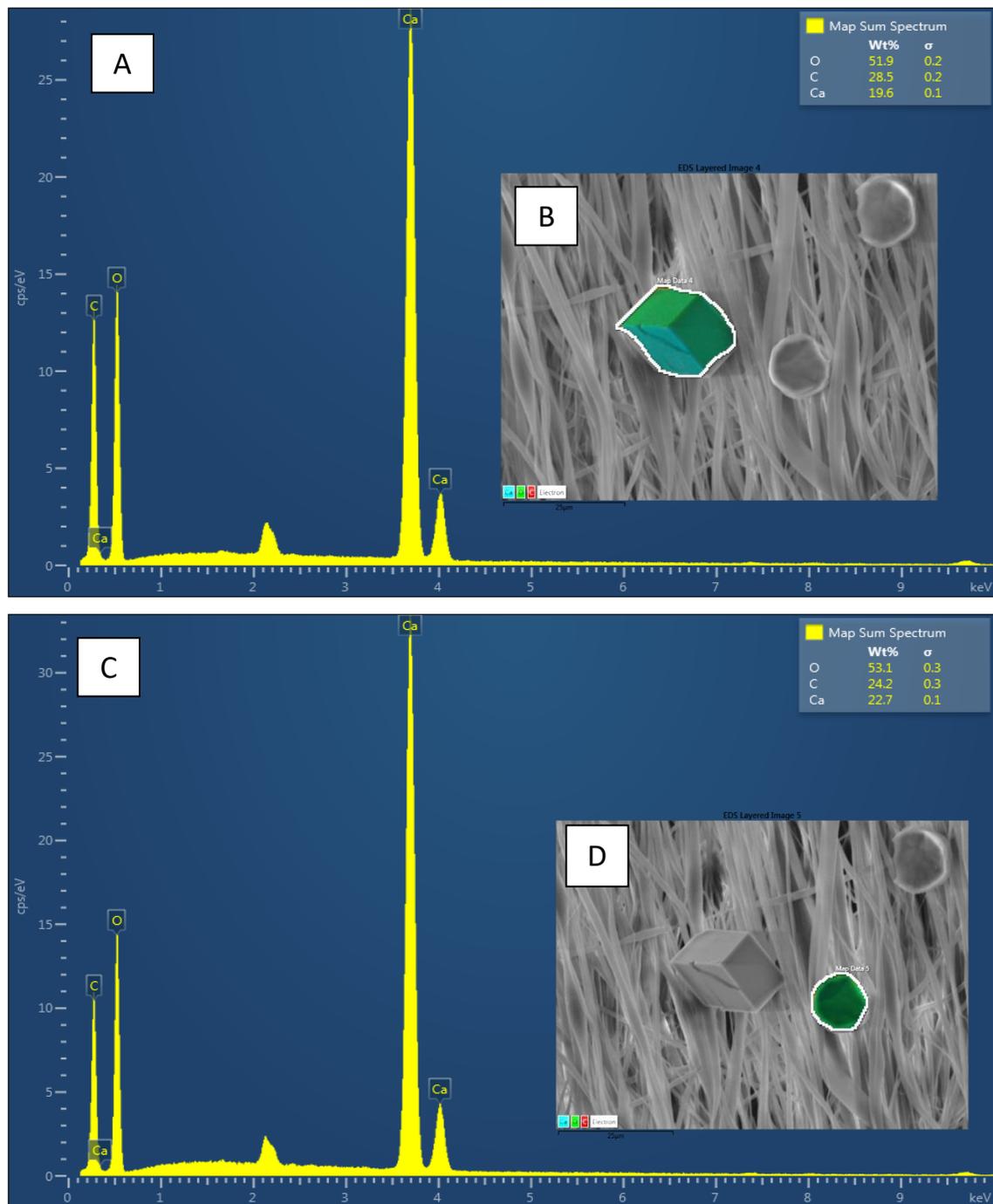


Figura 11: SEM-EDS **A)** Cristal de CaCO_3 en pocillo con malla electrohilada de PCL con distribución alineada sin presencia de poros superficiales, **B)** Cristal en pocillo con malla electrohilada de PCL con distribución alineada sin presencia de poros superficiales, composición química elemental fue de 28,5% de C, 51,9% de O 19,6% de Ca, **C)** Cristales de CaCO_3 en pocillo con malla electrohilada de PCL con distribución alineada sin presencia de poros superficiales, **D)** Cristales de CaCO_3 en pocillo con malla electrohilada de PCL con distribución alineada sin presencia de poros superficiales, composición química elemental fue de 24,2% de C, 53,1% de O 22,7% de Ca.

Determinación del polimorfismo cristalino de CaCO_3

La figura 12 muestra los distintos difractogramas obtenidos de las distintas mallas de PCL utilizadas en los ensayos de cristalización, donde se determinó para la muestra control la presencia solo de calcita como polimorfo cristalino (Figura 12-A), en el control de PCL fundido se pudo observar la coexistencia de dos polimorfos cristalinos calcita y vaterita y simultáneamente de la presencia de una nueva fase cristalina para la calcita (Figura 12-B), En cuanto a las mallas electrohiladas de PCL con distribución alineada y al azar sin presencia de poros se observa la presencia de calcita y vaterita, y de 3 fases cristalinas para el polimorfo calcita y 2 fase cristalinas para el polimorfo vaterita (Figura 12 C-D), por otro lado, para las mallas electrohiladas de PCL con distribución al azar y alineadas con presencia superficial de poros se puede observar la coexistencia de ambos polimorfos vaterita y calcita con distintas fases cristalinas, 3 para la calcita y 2 para la vaterita (Figura 12 E-F) las cuales solo variaron en intensidades relativas respecto de las descritas.

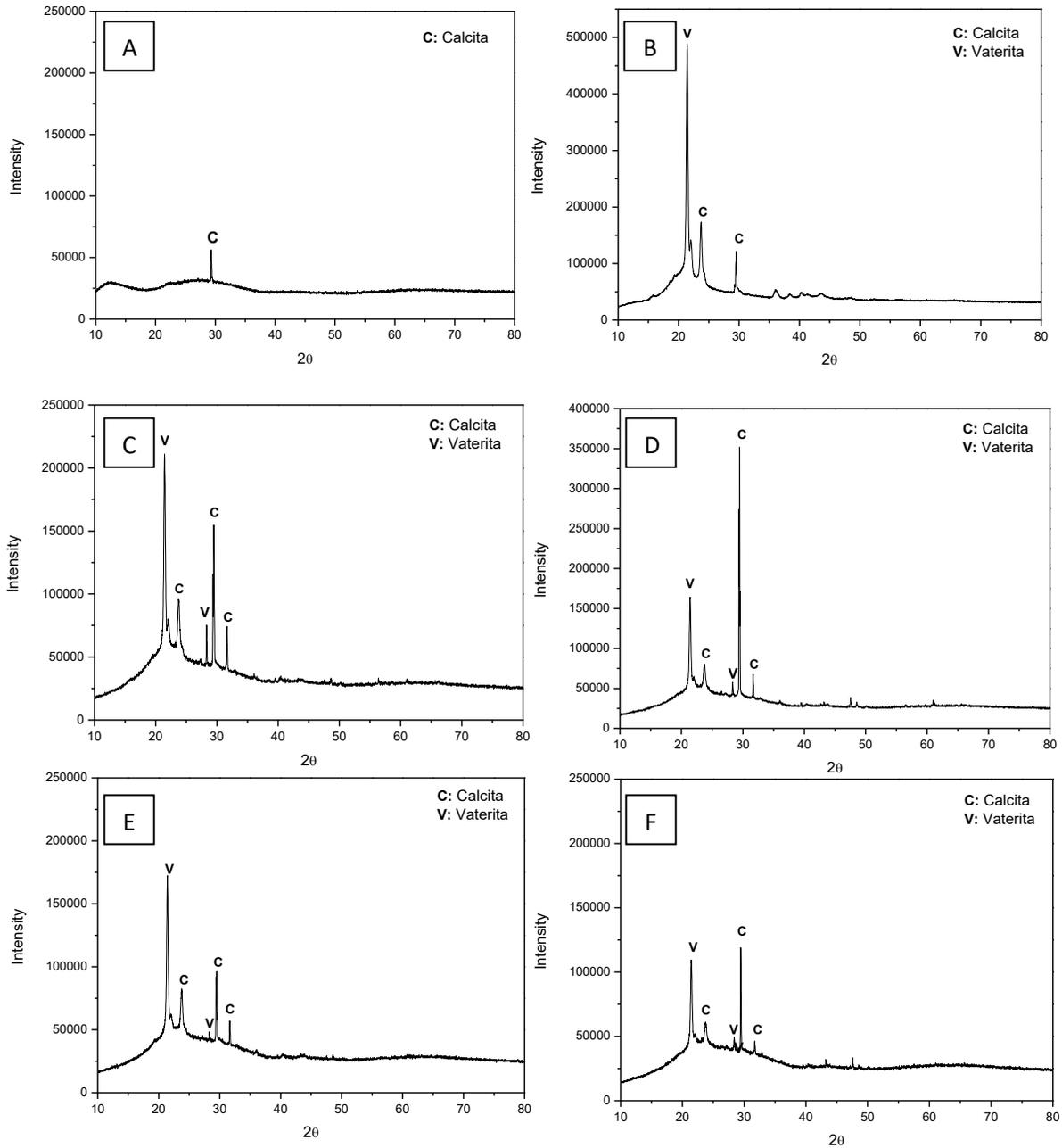


Figura 12: Difractogramas de CaCO_3 obtenidas sobre mallas de PCL, **A)** Control vidrio, **B)** Control con película fundida de PCL, **C)** Malla electrohilada de PCL con distribución al azar sin presencia de poros en la superficie de las fibras, **D)** malla electrohilada de PCL con distribución alineada sin presencia de poros en la superficie de las fibras, **E)** malla electrohilada de PCL con distribución al azar con presencia de poros en la superficie de las fibras, **F)** malla electrohilada de PCL con distribución alineada con presencia de poros en la superficie de las fibras.

DISCUSIÓN

La técnica de electrospinning ha sido ampliamente utilizada en diversos estudios para la síntesis de andamios y/o sustratos de polímeros, con el objetivo de evaluar su uso en distintas áreas de interés tales como ingeniería de tejidos, biomedicina, usos industriales, transporte de fármacos, entre otros (Bhardwaj *et al.*, 2010). Dentro de las ventajas descritas que presenta esta técnica, se encuentran, su alta relación superficie/volumen, tamaño de fibras desde nano a micro fibras, topografía controlada de las mallas obtenidas, y permite además la generación de poros en la superficie de las fibras electrohiladas (Woodruff y Hutmacher, 2010).

La utilización de distintos solventes para preparar mallas con poros y sin poros superficiales, con DMSO-acetona y acetato de etilo-acetona respectivamente, fue realizada de acuerdo a lo descrito por Katsogiannis *et al.* (2015). El posterior uso de la técnica complementaria FTIR, permitió dilucidar la presencia de los grupos químicos contenidos en las mallas de PCL, lo cual permitió descartar la presencia de los aditivos utilizados durante la formación de las distintas mallas electrohiladas de PCL. De esta forma, se logró determinar que todas las mallas electrohiladas de PCL presentan el patrón espectroscópico característico para la PCL según lo descrito por Shoja *et al.* (2015). Los resultados del análisis de FTIR mostraron los picos de absorción característicos de las bandas de absorción para los distintos grupos y enlaces químicos como C-H 2942 - 2865 cm^{-1} , C=O 1721 cm^{-1} y CH₂ 1468 - 1165 cm^{-1} , descartando así la posible influencia de los solventes durante la cristalización de CaCO₃ en la presente investigación.

Como andamio orgánico para la cristalización se utilizaron mallas de PCL, biopolímero altamente compatible con organismos vivos, utilizado en biomedicina como material de soporte (Reyes *et al.*, 2016, Park *et al.*, 2014, Causa *et al.*, 2010), presentando distintas variantes en cuanto a su disposición espacial. Estas variantes pueden presentar una distribución alineada o al azar de fibras de PCL, con o sin presencia de poros en las superficies de las fibras, lo cual permite comparar el efecto de la distribución topográfica de las mismas sobre el proceso de cristalización. Park *et al.* (2017) observaron que la PCL y el CaCO₃, son perfectamente compatibles, al combinar ambos materiales para electrohilarse en mallas. En adición, acorde a lo demostrado en el presente estudio, la PCL puede ser utilizada como sustrato orgánico sólido para la cristalización de CaCO₃.

Mediante la técnica de ángulo de contacto, se logró determinar que las mallas electrohiladas de PCL presentaron distintos ángulos de contacto según las diversas distribuciones espaciales. Al comparar las mallas alineadas de PCL, con y sin presencia de poros, se evidenció que las primeras obtuvieron un mayor ángulo de contacto, y por ende, un mayor carácter hidrófobo que las mallas alineadas sin presencia de poros. En cuanto a las mallas con distribución al azar, se obtuvo la relación inversa, ya que aquellas mallas con poros presentaron un menor ángulo de contacto, y por consecuencia, un menor carácter hidrófobo. El grado de humectabilidad de una superficie es de gran relevancia, ya que éste determina el grado de infiltración de los cristales de CaCO_3 en las mallas, en donde, un mayor carácter hidrófilo en las mallas, presenta una mayor infiltración de cristales (Ivanova *et al.*, 2018).

La técnica de difusión de gases utilizada en el presente estudio, descrita por Domínguez *et al.* (2000) ha sido ampliamente utilizada para los estudios de biomineralización (Neira-Carrillo *et al.*, 2008; Hernández, 2009; Ma *et al.*, 2010). A través de esta técnica se obtuvieron cristales de CaCO_3 , y su relativa simplicidad, permitió la realización de un duplicado del experimento, de gran utilidad para el análisis del efecto de las distintas disposiciones espaciales de las mallas electrohiladas de PCL sobre el proceso de cristalización.

Dependiendo de las distintas distribuciones espaciales presentes en las mallas electrohiladas de PCL utilizadas en cada micropocillo, se obtuvieron cristales de CaCO_3 con diferentes características morfológicas y polimorfismo. Según sean las condiciones de cristalización para CaCO_3 , éste puede formar distintos polimorfismos: calcita, vaterita o aragonita, siendo la forma calcita, la más estable termodinámicamente (Han *et al.*, 2005; Du *et al.*, 2016; Gan *et al.*, 2017). En el presente estudio, para analizar la morfología de los cristales obtenidos, el tamaño de las fibras y la composición química elemental de los cristales, se utilizó la técnica SEM-EDS. Estos resultados permitieron establecer la predominancia de cristales de CaCO_3 con distintas características típicas de los polimorfos calcita y vaterita presentes sobre las mallas de PCL electrohiladas, permitiendo obtener una relación entre las diversas formas en cada micropocillo.

Para comprobar la presencia de un polimorfo cristalino determinado, se utilizó la técnica de difracción de rayos X, ya que ésta permite la identificación cualitativa de la composición mineralógica de un cristal mediante el principio de la interferencia óptica que se produce

cuando una radiación monocromática atraviesa una rendija de espesor comparable a la longitud de onda de la radiación de una muestra cristalina. Los resultados de XRD determinaron la presencia de los polimorfos calcita (calcita: 012, 104, 006) y vaterita (vaterita: 110, 111) además de la estabilización de distintas fases cristalinas (ver Figura 12), los cuales fueron comparados con difractogramas con estándares de calcita, aragonita y vaterita usando la base de datos teóricos establecidos por PCDFWIN.

En la presente investigación, se evidenció que, con mismas condiciones de temperatura ambiente y un pH 9.0 constante, al modificar la distribución espacial de las superficies de PCL, en comparación al fundido de PCL, no electrohilado y al control de pocillo vacío, aumentó la proporción de polimorfos con características típicas de vaterita, superando incluso a las calcitas presentes con una relación 2:1 respectivamente, en las mallas alineadas con y sin poros en la superficie de las fibras. Lo anterior permitiría suponer que tanto la presencia de poros, como la distribución de las mallas alineadas, impide o altera la velocidad de cristalización de CaCO_3 , lo cual induce a una mayor estabilización de estadios tempranos de las diferentes formas cristalinas en un ambiente molecular confinado que permiten controlar la nucleación y el crecimiento cristalino, posibilitando la estabilización en el presente estudio de vaterita, el cual presenta incluso una menor estabilidad termodinámica comparada con la calcita y aragonita (Hernández, 2009; Sekkal y Zaoui, 2013; Du *et al.*, 2016).

Cabe mencionar, que independiente de la relación que existe entre ambos polimorfos en las distintas mallas utilizadas, todas las muestras que contienen PCL como matriz para la cristalización, lograron estabilizar el polimorfo vaterita en comparación a la muestra control de pocillo vacío, donde sólo se formó el polimorfo de calcita típico con la fase 104. Estos resultados, contrastan con los obtenidos por Ma *et al.* (2010), en donde sólo se observaron calcitas en ensayos de cristalización *in vitro*, utilizando la técnica de difusión de gases sobre una matriz hidrosoluble, a pH 9.0, pudiendo sugerir, que las diferencias evaluadas podrían ser consecuencia de los distintos sustratos utilizados en ambos experimentos y que la PCL generaría un efecto estabilizador del polimorfo vaterita. Esto último, coincide con los resultados obtenidos por Han *et al.* (2005) e Ivanova *et al.* (2018), en donde, en el primer estudio, se utilizaron 4 mallas de distinta composición, y en la malla de PCL, así como en la malla de polimetilmetacrilato, se obtuvieron polimorfos correspondientes a vaterita. En el segundo estudio mencionado, se utilizó PCL como andamio para la cristalización de CaCO_3 , tratado con plasmas a baja temperatura de O_2 ,

NH_3 y Ar, donde se observó vaterita en las todas las mallas de PCL. Este efecto estabilizador del polimorfo vaterita, podría ser consecuencia de la nano-estructuración del polímero, lo cual sucede debido a que la formación de fibras produce un aumento del área superficial de contacto.

En adición, con los resultados obtenidos en el presente estudio, se reconoce la relevancia de la presencia de poros en la superficie de las fibras, ya que en ambas mallas porosas se presentaron aglomeraciones de cristales. En las mallas con distribución al azar se presentaron aglomeraciones de calcita, siguiendo la orientación de la microfibra y en el caso de la malla con presencia de poros y distribución alineada, se obtuvieron vateritas siguiendo el mismo patrón de alineación. Debido a estos resultados, se plantea que la topografía y la presencia de poros superficiales podrían enlentecer el flujo de vapores de CO_2 al sistema, lo cual, en solución de CaCl_2 influiría en la formación de cristales de CaCO_3 . Lo anterior, podría revelar que los poros actuarían como sitios de nucleación local en el proceso de nucleación cristalina.

Finalmente, se obtuvo en la presente investigación, que los tamaños de los cristales de CaCO_3 obtenidos en las mallas de PCL, se encuentran en una directa relación con respecto al tamaño de los poros presentes en las mismas, en donde, al aumentar el tamaño de los poros, se presentaba también un aumento en el tamaño de los cristales.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se demostró que, en ensayos de cristalización mediante difusión de gases, la distinta disposición espacial de fibras en mallas de PCL, así como la presencia o ausencia de poros en su superficie, no sólo actúan como soporte orgánico para la nucleación de los cristales sino también influyen en el proceso de cristalización determinando el tipo de polimorfo formado y controlando la morfología y crecimiento de los cristales de CaCO_3 obtenidos.

Nuestros resultados experimentales permiten inferir que en un estudio que involucre la interacción de los cristales de CaCO_3 con grupos funcionales presentes en las mallas electrohiladas de PCL, podrían entregar mayores antecedentes del control que ejercen la topografía de mallas de PCL como andamio orgánico y entregar valiosas herramientas para desarrollar biomateriales a base de CaCO_3 con potenciales usos industriales y biomédicos.

BIBLIOGRAFÍA

ADDADI, L.; JOESTER, D.; NUDELMAN, F.; WEINER, S. 2006. Mollusk shell formation: A source of new concepts for understanding biomineralization processes. *Chem. Eur. J.* 12: 980 - 987.

BHARDWAJ, N.; KUNDU, S. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology. *India Biotech. Adv.* 28: 325 - 347.

CAUSA, F; BATTISTA, E; DELLA MOGLIE, R; GUARNIERI, D; IANNONE, M; NETTI, P. 2010. Surface investigation on biomimetic materials to control cell adhesion: The case of RGD conjugation on PCL. *Langmuir* 26. 9875 - 9884.

CIZER, O.; RODRIGUEZ-NAVARRO, C.; RUIZ-AGUDO, E.; ELSEN, J.; VAN HEMERT, D.; VAN BALEN, K. 2012. Phase and morphology evolution of calcium carbonate precipitated by carbonation of hydrated lime. *J. Mater Sci.* 47: 6151 - 6165.

DEVIA, J. 2014. Efecto de quitosano sulfonado sobre la cristalización heterogénea de carbonato de calcio *in vitro*. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

DICKINSON, S.; HENDERSON, G.; MCGRATH, K. 2002. Controlling the kinetic versus thermodynamic crystallization of calcium carbonate. *J. Cryst. Growth* 244: 369 - 378.

DOMÍNGUEZ, J.; GAUTRON, J.; GARCIA, Y. 2000. The Effect of Avian Uterine Fluid on the Growth Behavior of Calcite Crystals. *Poultry Sci.* 79: 901 - 907.

DU, Y.; CHANG, H.; YANG, S.; HUANG, S.; TSAI, Y.; HUANG, J.; CHUNG, J. 2016. Study of binding interaction between Pif80 protein fragment and Aragonite. *Sci. Rep.* 6: 1 - 10.

GAN, X; HE, K; QIAN, B; DENG, Q; LU, L; WANG, Y. 2017. The effect of glycine on the growth of calcium carbonate in alkaline silica gel. *J. Cryst. Growth* 458, 60 - 65.

- GEHRKE, N.; CÖLFEN, H.; PINNA, N.; ANTONIETTI, M.; NASSIF, N.** 2005. Superstructures of calcium carbonate crystals by oriented attachment. *Cryst. Growth Des.* 5: 1317 - 1319.
- GÓMEZ, E.** 2013. Estudio teórico-experimental de las propiedades elásticas de nanofibras poliméricas. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencia e Ingeniería de Materiales, universidad Nacional Autónoma de México. P. 16.
- GOPI, S.; SUBRAMANIAN, V.; PALANISAMY, K.** 2013. Aragonite–calcite–vaterite: A temperature influenced sequential polymorphic transformation of CaCO_3 in the presence of DTPA. *Mater. Res. Bull.* 48: 1906 -1912.
- GOWER, L.** 2008. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biomineralization. *Chem. Rev.* 108: 4551 - 4627.
- HAN, J., XU, X., KIM, D., CHO, K.** 2005. Biomimetic fabrication of vaterite film from amorphous calcium carbonate on polymer melt: Effect of Polymer Chain Mobility and Functionality. *Chem. Mater.* 17: 136 - 141.
- HAN, Y.; HADIKO, G.; FUJI, M.; TAKAHASHI, M.** 2006. Crystallization and transformation of vaterite at controlled pH. *J. Cryst. Growth* 289: 269 - 274.
- HERNÁNDEZ, L.** 2009. Estudios de precipitación de CaCO_3 como herramienta para entender los procesos de biomineralización, usando como modelo biológico la cáscara de huevo de gallina. Memoria de Título Doctorado en Biotecnología. Granada, España. Universidad de Granada.
- IVANOVA, A., SYROMOTINA, D., SHKARINA, S., SHKARIN, R., CECILIA, A., WEINHARDT, V., BAUMBACH, T., SAVELEVA, M., GORIN, D., DOUGLAS, T., PARAKHONSKIY, B., SKIRTACH, A., COOLS, P., DE GEYTER, N., MORENT, R., OEHR, C., SURMENEVA, M., SURMENEV, R.** 2018. Effect of low-temperature plasma treatment of electrospun polycaprolactone fibrous scaffolds on calcium carbonate mineralisation. *RSC Adv.*, 2018, 8, 39106 - 39114.
- KATSOGIANNIS, K., VLADISAVLJEVIC, G., GEORGIADOU, S.** 2015. Porous electrospun polycaprolactone (PCL) fibres by phase separation. *Eur. Polym. J.* 69: 284 - 295.

- MA, Y.; GAO, Y.; FENG, Q.** 2010. Effects of pH and temperature on CaCO₃ crystallization in aqueous solution with water soluble matrix of pearls. *J. Cryst. Growth* 312: 3165 - 3170.
- 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* CaCO₃ crystallization. *Langmuir*. 24. 12496 - 12507.
- NI, M.; RATNER, B.** 2008. Differentiating calcium carbonate polymorphs by surface analysis techniques – an XPS and TOF-SIMS study. *Surf. Interface Anal.* 40: 1356 - 1361.
- PANT, H.; NAM, K.; GOPAL, J.; PANTHI, G.; KIM, H.; KIM, B.; KIM, H.** 2011. Effect of polymer molecular weight on the fiber morphology of electrospun mats. *J. of Colloid and Interf. Sci.* 364: 107 - 111.
- PARK, S.; LEE, J.; KIM, Y.; KIM, J.; LEE J.H; SHIN, J; KWON, I; KIM, W.** 2014. Fabrication of biomimetic PCL scaffold using rapid prototyping for bone tissue engineering. *Macrom. Res.* 22. 882 - 887.
- PARK, J; KYNG, H; TSUKADA, K; KIM, S; SHIRATORI, S.** 2017. Biodegradable polycaprolactone nanofibres with b-chitosan and calcium carbonate product a hemostatic effect. *Polymer* 123. 194 - 202.
- REYES, S; VARGAS, N; CARRILLO, I; MOLINA, A.** 2016. Obtención de composites biomédicos de poli (ε-caprolactona), nanohidroxiapatita y alúmina por electrohilado. <[http://www.interempresas.net/MetalMecanica/Articulos/150258-Obtencion-composites-biomedicos-poli-\(949-caprolactona\)-nanohidroxiapatita-alumina.html](http://www.interempresas.net/MetalMecanica/Articulos/150258-Obtencion-composites-biomedicos-poli-(949-caprolactona)-nanohidroxiapatita-alumina.html)> [consulta, 25 abril de 2018].
- SEKKAL, W.; ZAOU, A.** 2013. Nanoscale analysis of the morphology and surface stability of calcium carbonate polymorphs. [en línea]. <<https://www.nature.com/articles/srep01587.pdf>>. [consulta: 20-05-2018].
- SINHA, V.; BANSAL, R.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, A; TREHAN, A.** 2004. Polycaprolactone microspheres and nanospheres: an overview. University Institute of Pharmaceutical Sciences, Panjab University, India. *Intern. J. of Pharma.* 278: 1 - 23.

SHOJA, M.; SHAMELI K.; AHMAD, M.; ZAKARIA, Z. 2015. Preparation and Characterization of poli (ϵ - caprolactone)/TiO₂ micro-composites. Dig. J. Nanomater. Bios. 10: 471 - 477.

SZCZE, A. 2013. Effects of DPPC Cholesterol liposomes on the properties of freshly precipitated calcium carbonate. Colloids Surf. B 101: 44 - 48.

TAYLOR, G. 1969. Electrically driven jets. Proc. Roy. Soc. Lond. A. 313: 453 - 475.

WOODRUFF, M,; HUTMACHER, D. 2010. The return of a forgotten polymer- Polycaprolactone in the 21st century. Institute of Health and Biomedical Innovation, Queensland University of Technology. Progress in Polym. Sci. 35: 1217 - 1256.