

Agregados Biomiméticos de Calcita Crecidos en Hidrogel de Gelatina: Efecto Combinado del Mg y la Concentración de Sólido en el Gel

/ FITRIANA NINDIYASARI (1), ERIKA GRISSHABER (1), LURDES FERNÁNDEZ-DÍAZ (2,3), JOSÉ MANUEL ASTILLEROS (2,3*), NURIA SÁNCHEZ-PASTOR (2), ANDREAS ZIEGLER (4), WOLFGANG W. SCHMAHL (1)

(1) Department für Geo- und Umweltwissenschaften, Ludwig-Maximilians-Universität. 80333, Múnich (Alemania)

(2) Departamento de Cristalografía y Mineralogía. Universidad Complutense de Madrid. C/ José Antonio Novais 2. 28040, Madrid (España)

(3) Instituto de Geociencias (UCM, CSIC) C/ José Antonio Novais 2. 28040, Madrid (España)

(4) Central Facility for Electron Microscopy, University of Ulm, 89081, Ulm (Alemania)

INTRODUCCIÓN

Gran parte de los procesos de mineralización que tienen lugar en el seno de los organismos vivos se desarrollan en matrices de naturaleza gelatinosa ricas en polisacáridos y proteínas. Los hidrogeles sintéticos comparten muchas de las características que exhiben estas matrices orgánicas (Asenath-Smith et al., 2012). Además, es posible ajustar la preparación de los hidrogeles para que las condiciones fisicoquímicas en su seno sean similares a las que se dan en los ambientes de biomineralización en organismos (Nindiyasari et al., 2014a).

La calcita, el polimorfo de CaCO_3 estable en las condiciones reinantes en la superficie terrestre, es uno de los componentes más abundantes de los tejidos mineralizados de los organismos fósiles y modernos. La mayor parte de los tejidos duros calcíticos de origen marino contienen magnesio, que se encuentra incorporado en la estructura de la calcita sustituyendo al calcio. Los contenidos de magnesio de los biominerales varían normalmente entre 0 y 23 % molar, aunque alcanzan valores significativamente más altos en casos concretos. Por ejemplo, algunas partes de los dientes de los erizos de mar contienen un 45% molar de MgCO_3 .

En este trabajo se presenta un estudio sobre las características de la cristalización de carbonato cálcico en hidrogeles de gelatina preparados con distinta concentración de sólido y, por tanto, con distinta densidad y rigidez, y que pueden contener magnesio o no en la disolución acuosa que rellena sus poros. La investigación realizada se ha centrado en el análisis de las características composicionales,

morfológicas y microtexturales de los cristales y agregados cristalinos de calcita obtenidos en los experimentos, así como en el estudio de las características de la matriz de hidrogel que queda ocluido en ellos durante la cristalización. El estudio del efecto que esta matriz tiene sobre el desarrollo de microtexturas en los cristales y agregados es otro de los núcleos de este trabajo.

EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en un sistema de doble difusión consistente en un tubo en U. La rama horizontal del tubo se rellenó con el hidrogel de gelatina. Las ramas verticales se rellenaron con disoluciones de CaCl_2 y de Na_2CO_3 (0,5 M en ambos casos). Los hidrogeles se prepararon disolviendo distintas cantidades de gelatina (2,5, 10 y 15 % en peso) en agua y en una disolución 0,01 M de MgCl_2 . Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado a una temperatura constante de 15° C.

Los experimentos de crecimiento se interrumpieron una semana después de detectarse los primeros cristales en el seno del hidrogel. Los cristales se recuperaron disolviendo el gel en agua a 60 °C y se analizaron mediante distintas técnicas. Las fases minerales presentes en el precipitado se identificaron mediante difracción de rayos X (DRX) y microespectroscopia Raman. La morfología y composición química de los cristales se estudiaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido convencional con detector para análisis EDS (SEM), y de emisión de campo (FE-SEM). Con el fin de estudiar la relación existente entre el componente inorgánico y el entramado polimérico de

gelatina ocluido en el mismo, se seleccionaron muestras representativas, se atacaron con un ácido débil (*etching*) y se estudiaron con FE-SEM. Finalmente, las características microtexturales de los cristales y agregados cristalinos se estudiaron mediante Difracción de Electrones retrodispersados (EBSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto el contenido de gelatina en el hidrogel como la presencia o ausencia de magnesio en el medio de crecimiento influyeron de forma significativa en la cristalización del carbonato cálcico. El componente mayoritario del precipitado fue siempre calcita, si bien esta fase fue la única observada en geles con una concentración de gelatina $\geq 10\%$, independientemente de que en el medio de cristalización estuviera presente el magnesio o no. Además, al aumentar la concentración de gelatina y/o en presencia de magnesio aumentó el tiempo de espera para la formación de los primeros cristales y se redujo el tamaño de los mismos.

La complejidad y variabilidad morfológica de los cristales y agregados cristalinos de calcita aumento con la concentración de gelatina en el gel y con la presencia de magnesio en el medio. Además, los análisis EDS realizados sobre la superficie de los agregados crecidos en presencia de magnesio evidenciaron un mayor contenido de este elemento en aquellos crecidos en geles más densos. Por otro lado, la morfología de los agregados se hizo más compleja al aumentar su contenido en magnesio. La figura 1 muestra un ejemplo de los tipos de agregados obtenidos en geles con una concentración de gelatina del 15% en peso en un medio libre de magnesio

palabras clave: Sistemas biomiméticos, Calcita, Biocomposites

key words: Biomimetic systems, Calcite, Biocomposites

(Figura 1a) y un medio con una concentración 0,01M de magnesio (Figura 1b,c,d). El contenido en magnesio de los agregados crecidos en geles con una concentración de 2,5 % en peso de gelatina se situó entre 0 y 9% molar. En el caso de los agregados crecidos en geles con $\geq 10\%$ en peso de gelatina el contenido varió con la morfología, estando entre 0,2 y 0,5% molar en los agregados radiales (Figura 1b), entre 8 y 10% molar en los agregados tipo coliflor (Figura 1c) y entre 20 y 28% molar en los agregados esféricos (Figura 1d). Estos resultados apuntan a que el gel de gelatina juega un papel químicamente activo en la cristalización a través de sus grupos funcionales ácidos. Estos grupos facilitarían la deshidratación del ion Mg^{2+} y, como consecuencia, contrarrestarían su efecto inhibitor del crecimiento de calcita facilitando la incorporación en su estructura (Nindiyasari et al., 2014b). Este papel activo también explicaría en los precipitados formados en presencia de magnesio en geles con una concentración de gelatina $\geq 10\%$ no se encuentre aragonito.

Los experimentos de *etching* revelaron una íntima relación entre el componente inorgánico y el hidrogel ocluido. Tanto la cantidad de hidrogel incorporado como las características de su distribución en el interior de los agregados variaron con la densidad del hidrogel y la presencia de magnesio en el medio. Así, los agregados crecidos en los hidrogeles más densos incorporaron mayores cantidades de entramado polimérico distribuido de forma menos homogénea. En el caso de los agregados crecidos en hidrogeles con magnesio se observó además la formación de membranas de gel separando subunidades cristalinas. Las características de la distribución de gel ocluido en el interior de los cristales se han interpretado como el resultado del balance entre la fuerza del gel y la presión de cristalización: la primera depende de la densidad del gel, mientras que la segunda depende de la velocidad de crecimiento y, por tanto, de la sobresaturación (Asenath-Smith et al., 2012).

El estudio mediante EBSD evidenció que la incorporación de magnesio en la estructura de la calcita y de matriz polimérica en el interior de los cristales ejerce una gran influencia sobre las características microtexturales de los agregados.

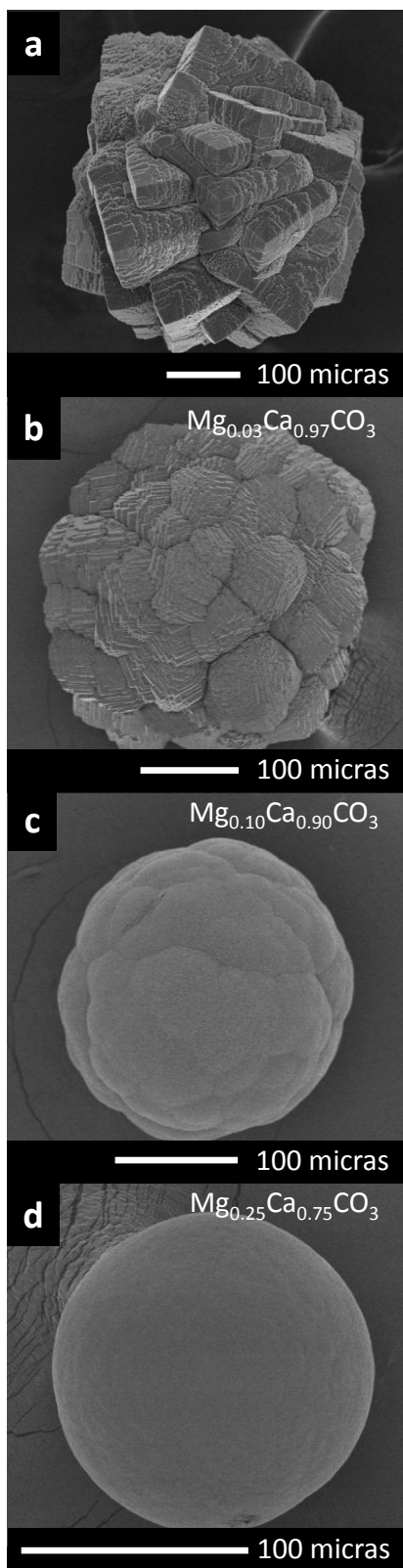


fig 1. Evolución de los agregados de calcita crecidos en hidrogel con una concentración de gelatina de 15% en peso en un medio libre de magnesio (a) y en presencia de magnesio (b-d). El contenido de Mg de los agregados, medido mediante EDS sobre su superficie aumenta de (b) a (c).

Los agregados cristalinos crecidos en geles más densos están formados por un número mayor de unidades, las cuales están a su vez constituidas por más subunidades que aparecen ligeramente desorientadas entre sí. El grado de desorientación dentro de los bloques de un agregado puede variar, lo que refleja una distribución no homogénea de la matriz polimérica ocluida. Además, los diagramas de coorientación cristalina permitieron establecer una correlación positiva entre el contenido en magnesio de los agregados y el desarrollo de bordes de bajo y de gran ángulo en el interior de las unidades que los forman. La progresiva desorientación entre subunidades que resulta de la acumulación de bordes conduce al desarrollo de texturas en abanico y de esferulitos. La formación de estos bordes se interpreta como el resultado de la generación de dislocaciones que relajan la deformación de la red asociada a la incorporación anisótropa de magnesio en escalones de crecimiento estructuralmente no equivalentes (Davis et al., 2004).

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación ha sido financiada por la Acción Integrada Hispano Alemana (AIB2010 DE-0008, DAAD-50749739) y de los proyectos CGL2010-20134-C02-01 y 2013-47988-C2-1-P. Se agradece el apoyo del Centro Nacional de Microscopia, del servicio central de difracción (UCM) y del laboratorio de Espectroscopia Raman (MNCN, CSIC).

REFERENCIAS

- Asenath-Smith, E., Li, H., Keene, E. C., She, Z. W., Estroff, L. A. (2012): *Crystal growth of calcium carbonate in hydrogels as a model of biomineralization*. *Adv. Funct. Mater.* **22**, 2891-2914.
- Davis, K. J., Dove, P. M., Wasylenki, L.E., De Yoreo, J. J. (2004): *Morphological consequences of differential Mg^{2+} incorporation at structurally distinct steps on calcite*. *Am.Min.*, **89**, 714-720.
- Nindiyasari, F., Fernández-Díaz, L., Griesshaber, E., Astilleros, J. M., Sánchez-Pastor, N., Schmahl, W. W. (2014a): *The influence of gelatin hydrogel porosity on the crystallization of $CaCO_3$* . *Cryst. Growth Des.*, **14**, 1531-1542.
- , Griesshaber, E., Fernandez-Diaz, L., Astilleros, J.M., Sánchez-Pastor, N., Ziegler, A., Schmahl, W. W. (2014b): *Effects of Mg and hydrogel solid content on the crystallization of calcium carbonate in biomimetic counter-diffusion systems*. *Crystal Growth Des.*, **14**, 4790-4802.