

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La biomimética y los patrones de crecimiento mineral.
Influencia de 20 L-aminoácidos sobre el patrón
morfogenético de los Agregados Cristalinos de
Morfología Inducida (IMCA), crecidos en geles de
sílice.

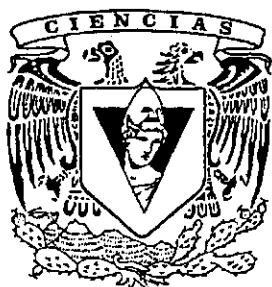
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JUAN PABLO REYES GRAJEDA



MEXICO, D.F.

INSTITUTO DE ESTUDIOS PROFESIONALES
DIRECTOR DE TESIS
DR. ABEL MORENO CARCAMO

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: **“La biomimética y los patrones de crecimiento mineral. Influencia de 20 L-aminoácidos sobre el patrón morfogénico de los Agregados Cristalinos de Morfología Inducida (IMCA), crecidos en geles de sílice”.**

realizado por **Juan Pablo Reyes Grajeda**

con número de cuenta **9130323-5**, pasante de la carrera de **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Abel Moreno Cárcamo

Propietario

Dra. Alicia Negrón Mendoza

Propietario

DR. JESUS SOLE VIÑAS

Suplente

Biol. Luis Rosales León

Suplente

Biol. José Erwin Silva González

FACULTAD DE CIENCIAS
Consejo Departamental de **BIOLOGIA** U.N.A.M.

Edna Maria Suarez Diaz

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

El presente trabajo fue realizado:

- Bajo la dirección del Dr. Abel Moreno Cárcamo, en el laboratorio de Cristalogénesis Biomacromolecular y Cristaloquímica del Departamento de Bioquímica en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.) contando con el apoyo de:

CONACyT

Proyecto J27494-E

DGAPA-UNAM

Proyecto IN200199

DEDICATORIA

Esta Tesis se la dedico a mis padres y a mi hermano sin cuyo apoyo no hubiese llegado a término.

AGRADECIMIENTOS

En especial quiero agradecerle al Director de ésta tesis, el Dr. Abel Moreno por haberme abierto las puertas de su laboratorio y más importante aun abirme las puertas al maravilloso mundo de la ciencia.

Le agradezco enormemente a los Doctores:

Dra. Alicia Negrón Mendoza.

Dr. Jesús Solé Viñas.

Y a los Biólogos

Biol. Luis Rosales León.

Biol. José Erwin Silva González.

por su revisión, comentarios y sugerencias , que enriquecieron éste trabajo.

También quisiera agradecerle a todos aquellos que de alguna u otra manera hicieron posible que se llevase a cabo éste trabajo, a toda la gente del Instituto de Química U.N.A.M. y en especial a la del Departamento de Bioquímica.

Y por su puesto a todos mis amigos de la Facultad de Ciencias que hicieron más placentera mi estancia en ella.

Y a toda la lista de amigos y compañeros dentro y fuera de al Facultad, sinceramente Gracias.

INDICE.

1. JUSTIFICACIÓN.	1
2. ANTECEDENTES.	2
3. OBJETIVOS.	3
I. INTRODUCCIÓN.	
I.1 Los patrones de crecimiento mineral y los agregados cristalinos de morfología inducida.	4
I.1.1 Patrones químicos y patrones de crecimiento mineral.	4
I.1.2 Agregados Cristalinos de Morfología Inducida (IMCA).	7
I.2 La biomimética y sus recientes avances.	8
I.3 La importancia de la biomineralización en los seres vivos.	9
I.3.1 Diferentes tipos de complementariedad molecular.	12
I.4 Los sistemas fuera del equilibrio, aspectos termodinámicos.	14
II. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS GELES DE SÍLICE.	
II.1 Introducción general sobre geles de sílice.	17
II.2 Métodos de síntesis química.	19
II.2.1 Hidrólisis de TMOS y TEOS.	19
II.2.2 Neutralización de metasilicato de sodio.	21
II.3 Obtención de geles de sílice a través de resinas de intercambio iónico.	23
II.4 Aplicaciones diversas de los geles de sílice. El caso de la cristalización de proteínas.	23
III. LOS AMINOÁCIDOS.	
III.1 Los pilares de las proteínas y su importancia en los seres vivos.	26
III.1.1 Clasificación de los aminoácidos.	26
III.1.2 Propiedades ácido-base de los aminoácidos.	27
III.1.3 Aminoácidos esenciales y no-esenciales.	28
III.2 Propiedades fisicoquímicas y estructurales de los L-aminoácidos.	30



<u>Juan Pablo Reyes Grajeda</u>	<u>Indice</u>
III.3 Cristalización y métodos de crecimiento cristalino.	32
III.3.1 Método de difusión en geles de sílice.	36
III.3.2 Método de difusión en fase vapor.	37
III.3.3 Método isotónico.	38
III.4 Datos estructurales obtenidos a través de la difracción de rayos X.	39
SECCION EXPERIMENTAL	42
IV. METODOLOGIA.	
IV.1 Preparación de geles de sílice mediante la neutralización de metasilicato de sodio.	43
IV.2 Metodologías experimentales utilizadas para la obtención de geles de sílice empleando resina de intercambio catiónico (DOWEX-50W8-200).	44
IV.2.1 Metodología utilizada manteniendo la cantidad de metasilicato de sodio constante.	44
IV.2.2 Metodología utilizada manteniendo la cantidad de resina constante.	45
IV.3 Incorporación de los diferentes iones y aminoácidos en la red polimérica de sílice.	45
IV.4 Precipitación de los Agregados Cristalinos de Morfología Inducida dentro de geles de sílice.	46
IV.5 Metodologías utilizadas para la cristalización de los diferentes L-aminoácidos.	48
IV.5.1 Cristalización dentro de geles de sílice	48
IV.5.2 Difusión en fase vapor (gota colgante).	48
IV.5.3 Método isotónico	49
IV.5.4 Evaporación lenta de una solución acuosa saturada.	49



V.	RESULTADOS EXPERIMENTALES.	
V.1	Propiedades fisicoquímicas y síntesis de geles de sílice.	50
V.2	Cristalización de 20 L-aminoácidos.	53
	Registro fotográfico de cristales de aminoácidos	55
V.3	La influencia de los 20 diferentes L-aminoácidos en la obtención de los agregados cristalinos de morfología inducida.	58
V.4	Colección fotográfica de los patrones de crecimiento mineral.	67
V.5	Análisis de frecuencias.	83
VI.	DISCUSION Y CONCLUSIONES.	
VI.1	Sobre la influencia del pH.	88
VI.2	Sobre la influencia de los aminoácidos.	88
VI.3	Sobre la morfología de los IMCA y sus posibles implicaciones geológicas, paleontológicas y bioquímicas en el origen de la vida.	89
VI.4	Determinación de los posibles tipos de complementariedad en las interfaces orgánicas-inorgánicas (Sílice-BaCO ₃).	93
VII.	PERSPECTIVAS.	95
VIII.	APENDICE "A". Tabla de abreviaturas y Glosario.	97
IX.	REFERENCIAS.	98



1. JUSTIFICACION.

Los geles han sido empleados desde hace muchos años para realizar el crecimiento de cristales de alta calidad óptico-estructural. En 1926, Fisher y Simons (citados por Moreno, 1998) propusieron: “los geles forman un excelente medio para el crecimiento de cristales de casi cualquier sustancia, en condiciones absolutamente controlables”, por lo que desde 1960 se han empleado los geles de sílice, debido a sus propiedades inertes con respecto a los compuestos crecidos en su red tridimensional, sirviendo como medios de crecimiento. Recientes avances en los aspectos teóricos para el crecimiento de cristales en geles, permiten predecir un desarrollo futuro de las simulaciones en el laboratorio de sistemas cristalinos naturales (geológicos y biológicos). Se ha sugerido ampliamente la similitud entre la biomineralización mediada por una matriz orgánica y el crecimiento de agregados cristalinos en geles, por lo que es de gran importancia conocer las diferentes interacciones que se dan entre la fase cristalina y la fase orgánica como es: el cambio en el patrón morfológico de los agregados cristalinos en función de las diferentes moléculas orgánicas utilizadas como aditivos, por ejemplo los aminoácidos, y en especial los L-aminoácidos, los cuales son los constituyentes principales de las proteínas y por lo tanto tienen un interés biológico especial.

Por otro lado, el desarrollo de los agregados cristalinos de metales alcalinotérreos a pH alcalino, precipitados por difusión dentro de geles de sílice, para los cuales se ha propuesto el término de Agregados Cristalinos de Morfología Inducida (de aquí en adelante **IMCA** debido a sus siglas en inglés) (Gracia-Ruiz & Amorós, 1981). Estos agregados presentan una morfología inusual, que emulan algunos patrones encontrados en la naturaleza, por lo que su entendimiento puede ser de gran ayuda al estudiar los diferentes patrones morfogenéticos, así como la forma en que éstos se desarrollan y evolucionan, pudiendo comprender el fenómeno desde diferentes puntos de vista. Uno de éstos es la termodinámica de los sistemas fuera del equilibrio, la cual se da en la gran mayoría de procesos biológicos, así como sus posibles aplicaciones en la biomimética, siendo ésta un nuevo campo interdisciplinario que involucra a la biología, la ingeniería y la ciencia de materiales, desarrollando investigaciones acerca de la estructura y las propiedades físicas de compuestos biológicos de interés, con la finalidad de diseñar nuevos materiales, con una serie de características que emulan a los compuestos formados biogénicamente.

Los materiales compuestos, han resultado ser de gran utilidad en el área tecnológica, debido a las propiedades que se han obtenido al combinar diferentes compuestos para formar un



solo material. Este aprovechamiento tiene como antecedentes los procesos naturales de biomineralización controlada por una matriz orgánica, donde el componente orgánico, como una matriz proteínica o una membrana vesicular, controla la morfología final de la fase mineral al proveer sitios de nucleación o restricción espacial, por lo que el control morfológico puede también estar acoplado a la absorción de aditivos solubles sobre caras específicas de los cristales en crecimiento, alterando las velocidades relativas de crecimiento de las diferentes caras cristalográficas y dirigiendo en consecuencia la formación de diferentes hábitos cristalográficos, así la investigación de éste tipo de interacciones tiene grandes aplicaciones a futuro, con la finalidad de poder desarrollar “materiales a la medida”, basándose en el desarrollo de materiales biológicos.

2. ANTECEDENTES.

En la primera década de éste siglo los trabajos de Lille, Mary y Herrera (citados por Baird, 1992) en la búsqueda de entender la morfogénesis biológica, estudiaron la extraña forma adoptada por precipitados inorgánicos, los cuales hoy en día conocemos que son sistemas que se forman fuera del equilibrio termodinámico.

Posteriormente en la década de los setenta García-Ruíz y Amorós redescubrieron que los carbonatos de metales alcalinotérreos precipitan por difusión en geles de sílice a pH alcalino, adoptando morfologías inusuales observadas previamente por Herrera, en donde la forma del material cristalino está controlada por una membrana rica en sílice. Así, el término de Agregados Cristalinos de Morfología Inducida (IMCA) se sugirió por García-Ruíz y Amorós en la década de los setenta (García-Ruíz & Amorós, 1981) para éstos sistemas, ya que es la fase polimérica del gel de sílice la que “induce” la formación de éstos patrones.



3. OBJETIVOS.

- Determinar la influencia de moléculas orgánicas (L-aminoácidos) sobre el patrón morfogenético de agregados cristalinos de morfología inducida (IMCA), crecidos en geles de sílice a pH alcalino.
- Evaluar las propiedades fisico-químicas de los geles de sílice y estandarizar las diferentes técnicas de síntesis.
- Realizar la cristalización de los diferentes L-aminoácidos para determinar si su estructura espacial está vinculada con la morfología observada en los IMCA.
- Determinar los posibles tipos de complementariedad en las interfases orgánicas-inorgánicas.
- Observar y determinar las diferencias y similitudes morfológicas entre los IMCA y los patrones morfogenéticos de origen biológico.
- Registrar detalladamente la evolución morfológica espacio-temporal de los IMCA.
- Evaluar la posibilidad de utilizar éste sistema como un análogo de la biomineralización natural.



I. INTRODUCCIÓN.

I.1 Los patrones de crecimiento mineral y los agregados cristalinos de morfología inducida.

I.1.1 *Patrones químicos y patrones de crecimiento mineral.*

Los patrones espaciales de alta regularidad y diversidad se forman en soluciones químicas no agitadas (inicialmente uniformes bajo ciertas condiciones de reacción), fuera del equilibrio químico. Este rompimiento en la simetría es resultado del acoplamiento de los fenómenos de cinética química con los procesos de transporte, tales como la difusión o la convección, así mismo en algunos casos se observan efectos inducidos por la gravedad, por lo que experimentos realizados en condiciones de microgravedad podrían ayudar en la distinción entre las distribuciones del transporte difusivo o convectivo.

Definición y descripción del fenómeno.

El ordenamiento espacial en escala macroscópica se observa frecuentemente en sistemas químicos fuera del equilibrio termodinámico. Usualmente el fenómeno ocurre en fase líquida, pero involucra una transición de fase a un producto de reacción sólido.

Ejemplos de éste fenómeno son la deposición de masa en forma de anillos o procesos de precipitación periódica (Henisch, 1988); la propagación de ondas en forma de espiral de actividad química en la reacción de Belousov-Zhabotinskii, la cual fue descubierta hace aproximadamente unos cincuenta años (Winfree, 1974; Agladze, 1982); la formación de patrones en forma de "mosaico" obtenidos en capas reactantes de solución (Zhabotinskii, 1973; Showalter, 1980; Orbán, 1980); y el movimiento dinámico de una interfase entre dos fases de líquidos inmiscibles (algunos ejemplos de patrones químicos se pueden observar en la figura. 1). Si se rastrean los reportes científicos sobre la generación espontánea de bellos patrones espaciales, se pueden encontrar muchos de ellos en la literatura, inclusive desde el siglo pasado. Unificando los puntos de vista sobre los principios básicos y los mecanismos respectivos, se podrían desarrollar solamente que madurara en gran medida la termodinámica del no equilibrio y progresando en el conocimiento de los sistemas dinámicos no lineales. Las contribuciones más importantes son las del concepto de Nicolis & Prigogine (1977), acerca de las estructuras disipativas y la auto organización de los sistemas fuera del equilibrio (los cuales se desarrollan a mayor detalle en la sección I.4), así como la aproximación sinérgica de Haken (1985). Es importante tener en cuenta que si uno desea modelar el fenómeno de auto-organización espacial, debe considerarse el acoplamiento de



reacciones químicas complejas con procesos de transporte tales como la difusión y la convección, los cuales hacen necesario desarrollar una serie de ecuaciones diferenciales no lineales acopladas.

Gran parte de los primeros trabajos se enfocaron solo a cuestiones cualitativas o fenomenológicas sobre la gran variedad de rasgos mostrados por este tipo de sistemas. Actualmente las investigaciones experimentales nos permiten obtener descripciones muy aproximadas del fenómeno mediante el uso de sistemas computarizados y con modernas técnicas para el análisis de imágenes. Como resultado de éstas investigaciones sistemáticas se han descubierto nuevos sistemas formadores de estos patrones.

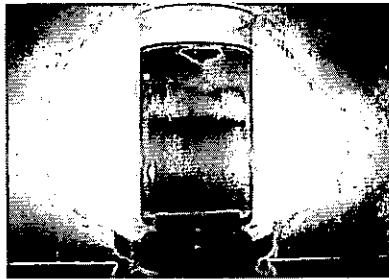
Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de descubrimientos que se han realizado en las últimas décadas, aún no ha sido posible planteada una explicación completa para estos fenómenos.

Una propiedad característica de tales sistemas formadores de patrones químicos, es su alta sensibilidad ante las condiciones externas, lo cual ocasiona una dificultad experimental adicional. En muchos experimentos el papel del acoplamiento entre la difusión-reacción, teniendo en cuenta el rompimiento de la simetría, no puede separarse de los efectos del transporte convectivo, por lo tanto, es importante tomar en cuenta la influencia de la gravedad. El modelo de difusión-reacción es un sistema de ecuaciones diferenciales parciales que describen la distribución espaciotemporal de un número de sustancias. Este modelo fue desarrollado por el matemático Alan Turing (1952), en donde él describe como las inhomogeneidades espaciales emergen a partir de estados homogéneos a causa de los procesos químicos de difusión, reacción y descomposición, y sugiere la posible conexión entre los patrones observados en los sistemas biológicos y los patrones que pueden, en principio, formarse espontáneamente en un sistema químico de difusión-reacción, en donde éstos patrones son variaciones espacio-temporales en la concentración de las sustancias químicas en reacción. Sin embargo los análisis de Turing se basaban en investigaciones teóricas de la formación de diferentes patrones en modelos matemáticos, y no fue sino hasta hace algunos años (Ouyang, 1991; Pearson, 1993) cuando fueron observados en experimentos controlados en el laboratorio y correlacionados con los modelos. A partir de entonces se dio un renacimiento en el interés sobre la formación de los patrones químicos y su similitud con los patrones observados en diversos sistemas tanto físicos como biológicos. Para sustentar adecuadamente la influencia teórica producto de las contribuciones difusiva o convectiva, se hace necesaria una experimentación detallada y cuantitativa bajo condiciones de microgravedad, con el fin de aclarar un gran número de interrogantes. Así, lejos de los efectos de la gravedad, la influencia de éstos procesos se podría demostrar sin ambigüedades en algunos casos, pero en la mayoría de ellos, por

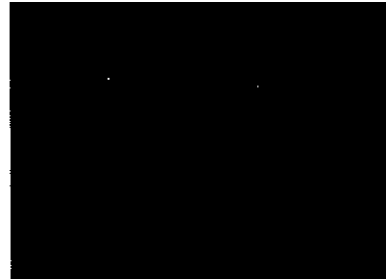


falta de datos experimentales contundentes, es materia de especulación. El creciente número de publicaciones científicas sobre éste tema se explica por el especial interés que existe acerca de los sistemas químicos fuera del equilibrio termodinámico. Estos sistemas permiten realizar estudios encaminados a desarrollar investigaciones en el marco de la dinámica no lineal, que incluye no solamente patrones espaciales, sino también oscilaciones periódicas y caóticas, así como transiciones entre estados estacionarios, entre otros. El campo de la dinámica química podrá dar nacimiento a otras disciplinas en el campo de los fenómenos no lineales, que juegan un papel importante en la geología, la física láser, la hidrodinámica, la meteorología y la morfogénesis.

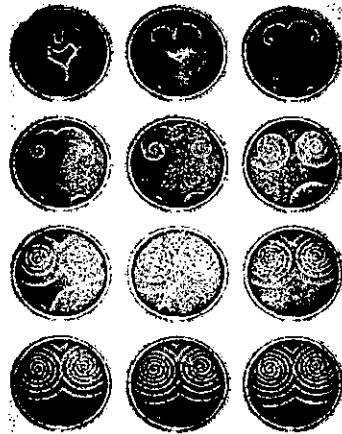
En el caso particular de la biología, los mismos principios que rigen los patrones espaciales en la física y química tendrán un importante impacto en las ciencias de los sistemas no lineales en tiempos venideros.



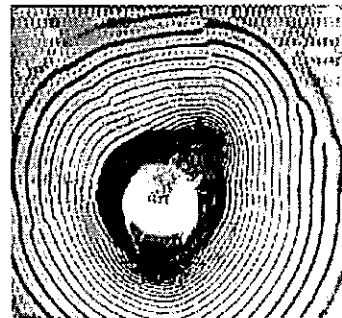
Reacciones de oscilación.



Ondas espirales de actividad química



Patrones en espiral de la reacción de Belousov-Zhabotinskii



Fenómeno de precipitación periódica (Anillos de Liesegang crecidos en geles).

Figura 1. Diferentes tipos de patrones químicos.



I.1.2 Agregados Cristalinos de Morfología Inducida (IMCA).

La precipitación controlada de materiales inorgánicos altamente insolubles está involucrada en la producción de un amplio intervalo de materiales de gran importancia, incluyendo los cementos, cerámica convencional y de alto rendimiento, pigmentos, medios de grabación, catalizadores heterogéneos, metales y vidrios. Además, la interacción entre las partículas precipitadas y las membranas circundantes, están directamente involucradas en el control de la biomineralización.

En la primera década de este siglo Lille, Mary y Herrera (citados por Baird, 1992) en la búsqueda por entender la morfogénesis biológica, estudiaron la extraña forma adoptada por precipitados inorgánicos, los cuales hoy en día conocemos que se forman por procesos fuera del equilibrio termodinámico. Posteriormente, en la década de los setenta, García-Ruíz y Amorós redescubrieron que los carbonatos de metales alcalinotérreos (Ba, Ca, Sr) precipitaban por difusión en geles de sílice a pH alcalino, adoptando morfologías inusuales, en la cual la forma del material cristalino está controlada por una membrana rica en sílice. Ellos propusieron el término de *Agregados Cristalinos de Morfología Inducida* (IMCA por sus siglas en inglés) para éstos sistemas (Baird, 1992).

Inicialmente García-Ruíz y Amorós pensaron que estaban generando un tipo de estructuras biológicas, debido a la morfología no cristalina. Sin embargo, este precipitado resultó ser un nanocompuesto auto-organizado que consistía de dos fases claramente distinguibles: una amorfa, formada por una membrana de silicato (siloxano) poco definida bajo análisis de rayos X, lo que quiere decir que las partículas que la forman son invariablemente no estequiométricas, por lo que no dan un patrón de difracción (Williams, 1986), y otra fase cristalina siendo ésta el carbonato de un metal alcalinotérreo, resultando un silicocarbonato del metal empleado (Moreno, 1998).

Los IMCA son originados a partir de los mecanismos de formación de los patrones de crecimiento mineral que ocurren fuera del equilibrio termodinámico. La mayoría de los agregados cristalinos, están compuestos de un número indefinido de cristales tridimensionales, pero en el caso de los IMCA es diferente, ya que las propiedades morfológicas y de crecimiento no son regidas en su totalidad por la relación entre un cristal y otro, sino que éstas propiedades son controladas por un substrato externo, usualmente una membrana bidimensional, que actúa como un sitio de crecimiento tridimensional para los cristales que forman el agregado, presentando una



morfología que en la mayoría de los casos es una simetría no-cristalográfica bien definida. Por ejemplo, los agregados cristalinos constituyen las partes duras de los organismos vivos, ya que si se observa la ultraestructura de una concha de un invertebrado, una cáscara de huevo, etc., ésta consiste de un gran número de pequeños cristales tridimensionales que se encuentran separados unos de otros por una delgada capa de materia orgánica, y a una menor magnificación podemos observar que el arreglo de éstos cristales no es al azar, sino que existe un patrón de ordenamiento y ciertas leyes geométricas controlan la posición de los cristales de tal manera que se forma una simetría no cristalográfica en la mayoría de los casos, por lo que la reproducción en el laboratorio de estas estructuras puede ayudar a un mejor entendimiento de los procesos de biomineralización, pudiéndose desarrollar a futuro materiales apropiados para implantes ortopédicos (García-Ruiz, 1985), así como el desarrollo de biomateriales.

I.2 La biomimética y sus recientes avances.

La biomimética es un nuevo campo interdisciplinario en la que participa la ingeniería, la biología y la ciencia de materiales, en donde ésta última aporta las bases para una nueva tecnología en materiales. Esta ciencia involucra la investigación de tanto la estructura como la función física de compuestos biológicos de interés con la finalidad de diseñar y sintetizar nuevos y mejores materiales.

Las metas principales de la biomimética han sido formuladas basándose en el concepto de auto organización, por lo que se define como una ciencia que emplea sus principios (como son, el principio de organización estructural, regulación y funcionamiento de biomacromoléculas, complejos supramoleculares y estructuras subcelulares) para la construcción de sistemas artificiales con propiedades predeterminadas o para conferir las propiedades deseadas en sistemas bioquímicos naturales con la ayuda de elementos artificiales, (Kurganov, 1991).

En los sistemas biológicos, los organismos producen materiales suaves y duros que tienen extraordinarias propiedades, las cuales podrían ser aplicadas al diseño de nuevos materiales. Estos compuestos son complejos en términos de composición y microestructura, pero sin embargo son altamente ordenados, conteniendo componentes tanto orgánicos como inorgánicos en una mezcla intrincada, por lo que de unos años a la fecha se ha comenzado a estudiar ésta relación para el desarrollo de materiales híbridos orgánico-inorgánico (Mark, 1995) y sus diferentes aplicaciones



en nanotecnología (Hull, 1981;Chow, 1996), dado que éstos compuestos presentan interesantes propiedades ópticas, magnéticas, electrónicas, pizoeléctricas y mecánicas.

Los biomateriales son sintetizados a temperatura ambiente bajo condiciones atmosféricas con refuerzos estructurales completamente controlados por los organismos (Sarikaya, 1994).

Así, aunque la microestructura única y las propiedades de los materiales biológicos no son bien conocidos aún, éstos pueden ser una fuente de inspiración en el desarrollo de futuros materiales, emulando a los de origen biogénico, dando origen a una siguiente generación de materiales para el desarrollo de nuevas tecnologías para el siglo XXI.

Una forma adicional o alternativa de ver, desarrollar y conceptuar a la biomimética, tiene sus bases y origen en la teoría de la Plasmogenia desarrollada a principios del siglo XX por el Biólogo mexicano Alfonso L. Herrera, quien estudiando los fenómenos vitales fundamentales y experimentando por diversos caminos con el propósito de reproducir –o al menos mimetizar- en el laboratorio estructuras semejantes a las de los seres vivos, dio origen a ésta ciencia en su tiempo ampliamente difundida. De tal manera que la Plasmogenia era la ciencia encargada de estudiar el origen del protoplasma, siendo una ciencia totalmente experimental y susceptible de comprobación en el laboratorio, considerando a la vida como el producto de la suma de fenómenos fisicoquímicos propios de los seres vivos (desde el punto de vista mecanicista) y examinando detalladamente los diferentes patrones morfológicos que se presentaban tanto en reacciones químicas como los observados en precipitaciones inorgánicas de diferentes especies minerales y comparándolas con las de origen biogénico, intentando descifrar el origen de la vida (Marin, 1949)

Alfonso L. Herrera llevó a cabo durante casi seis décadas, mas de diez mil experimentos con coloides inorgánicos de sílice, a los que agregaba diferentes sustancias para obtener, como él siempre señaló, imitaciones de células y tejidos a los que denominó colpoides y sulfobios.

Desde cualquier punto de vista que se aborde el tema de la biomimética, ésta ciencia es la encargada de emular estructuras y funciones de los seres vivos, ya sea para el desarrollo tecnológico en un futuro no muy lejano o en la búsqueda de las fuerzas físicas y químicas que rigen la vida.

I.3 La importancia de la biomineralización en los seres vivos.

La formación controlada de minerales inorgánicos en los organismos, resulta en la biomineralización de materiales amorfos y cristalinos con una ultraestructura, forma y simetría



increíble. A causa de que éstos sólidos inorgánicos se encuentran ampliamente conservados a través de la evolución, han sido sujeto de extensas investigaciones en el campo de la sistemática biológica y la paleontología. En contraste, los procesos químicos y bioquímicos de la biomineralización han sido solo estudiados recientemente en detalle. Estos estudios nos llevan a una nueva visión en la química bioinorgánica y proveen nuevos conceptos en la ingeniería de cristales y la ciencia de materiales. Un amplio número de biominerales es conocidos hoy en día. La mayoría son iones metálicos depositados en organismos unicelulares y multicelulares como son los cationes divalentes de metales alcalinotérreos (Mg, Ca, Sr, Ba), los metales de transición, Fe, y el Si. Estos usualmente forman fases sólidas con aniones como los carbonatos, oxalatos, sulfatos, fosfatos e hidróxidos / óxidos. Menos comunes son los metales como el Mn, Au, Ag, Pt, Cu, Zn, Cd y Pb que se depositan en las bacterias generalmente como sulfitos metálicos. Las formas cristalóquímicas, generalmente están relacionadas con una función biológica específica, como el soporte estructural (huesos y conchas), fuerza mecánica (dientes), almacenaje de hierro (ferritina) y receptores magnéticos y de gravedad, mientras que otros minerales generados de forma y tamaño heterogéneo pueden tener un gran valor al incrementar la densidad celular y en la defensa en contra de predadores (Mann, 1989).

Dos procesos de biomineralización han sido reconocidos: uno en el cual la formación es inducida por el organismo, como resultado de la interacción entre metabolitos biológicos y los cationes presentes en el medio ambiente externo (llamada mineralización “inducida biológicamente”), y el otro, un proceso en que los minerales crecen en un esqueleto estructural orgánico preformado (llamada mineralización mediada por “matriz-orgánica”) (Lowenstam, 1981).

En el proceso de mineralización “inducida biológicamente”, la precipitación mineral adopta hábitos cristalinos similares a los formados por procesos inorgánicos, y la orientación de los cristales, en el caso de los agregados, es esencialmente al azar. En contraste en el proceso de mineralización mediado por “matriz-orgánica”, los minerales adoptan un hábito cristalino único, mientras que su tamaño y distribución tienen una orientación bien definida (Lowenstam, 1981).

Así mismo, en casi todos los organismos, los cristales están siempre asociados con una membrana o con una matriz orgánica fibrosa (Watabe, 1974), ésta matriz tiene influencia sobre la formación, morfología, y cristalografía de la fase inorgánica (Sarikaya, 1994), sirviendo como sitio de nucleación para la formación de los cristales, así como siendo una limitante, ya que puede



determinar la orientación y el tamaño de éstos, como es en el caso de las conchas de moluscos, huesos en vertebrados, etc.

Por lo que podríamos considerar el desarrollo de un sistema análogo a la biomineralización mediada por “matriz-orgánica” si consideramos que la fase de la red polimérica del gel de sílice juega el papel de la membrana orgánica cuando se están formando las partes minerales.

En un organismo vivo, la precipitación se lleva a cabo en un medio de crecimiento caracterizado por el transporte de difusión y una baja concentración de los reactivos. Así, varios compuestos que son importantes en la biomineralización, como el fosfato y el oxalato de Calcio han sido obtenidos en geles de sílice, por lo que uno puede imaginar la similitud entre la precipitación dentro de un gel y la precipitación de las diferentes especies minerales en rocas sedimentarias, en lagos, en medioambientes cavernosos, en esqueletos, en biomineralización patológica y biomineralización natural, etc. Además muchos de éstos minerales son compuestos poco solubles y su crecimiento en geles es un método de síntesis que permite la nucleación y crecimiento de cristales de un tamaño apropiado para ser observados y caracterizados (García-Ruíz, 1982).

Recientes avances en los aspectos teóricos sobre la difusión en el crecimiento de cristales en geles, permiten predecir un desarrollo futuro de las simulaciones en el laboratorio de sistemas cristalinos naturales, tanto geológicos como biológicos, por lo que la similitud entre la biomineralización y el crecimiento de agregados cristalinos en geles, ha sido sugerido ampliamente. Por lo tanto, los sistemas experimentales utilizados en el desarrollo de éste trabajo nos conducen a simular el crecimiento de agregados cristalinos de carbonatos en presencia de una matriz polimérica, siendo un proceso análogo a los sistemas naturales, ya que las condiciones de crecimiento de agregados cristalinos, los cuales tienen propiedades morfológicas y simétricas muy peculiares, son similares a las encontradas en la biomineralización biológica, así como las relaciones texturales entre los cristales que forman el agregado, además de que la existencia de un control morfológico del agregado por acción de la matriz polimérica, recalca la posibilidad de utilizar éste sistema como un análogo de la biomineralización natural.

El método utilizado en el desarrollo de los IMCA es una técnica apropiada para obtener información acerca del crecimiento mineral en medios naturales dadas las interacciones entre superficies específicas de un cristal y especies moleculares extrañas al sistema, las cuales son capaces de modificar el hábito del cristal induciendo la formación de nuevas morfologías (García-Ruíz, 1998), las cuales se ven reflejadas en el desarrollo del agregado cristalino.



I.3.1 Diferentes tipos de complementariedad molecular.

A continuación se mencionan los diferentes tipos de complementariedades moleculares descritas por Mann (1989) las cuáles se presentan en los sistemas naturales de biomineralización.

1. Distribución espacial de cargas.

La más fundamental de las propiedades de la matriz orgánica en relación con la nucleación de un mineral inorgánico es la distribución de cargas a través de su superficie, lo cual parece factible que haya sucedido en los primeros intentos biológicos para controlar la mineralización basándose simplemente en centros cargados, particularmente si éstos centros eran químicamente activos, desarrollándose en un principio mediante procesos de oxido-reducción.

La presencia de centros cargados sobre una matriz orgánica no induce un control cristalocómico, sin embargo, la carga puede ser organizada espacialmente de modo que complemente específicamente la cristalografía de un núcleo incipiente. La forma más simple de lograr esto es a través de la curvatura de la superficie de la matriz orgánica, dando una periodicidad estructural en dos dimensiones (cristales bidimensionales), dando origen posteriormente a un núcleo tridimensional.

La matriz puede contener “hoyos” y “canales” con una alta densidad local de cargas, en donde se acumulan iones que estabilizan las diferentes interacciones que resultan en la inducción de la nucleación. El rearrreglo estructural de los iones dispersos dentro de una estructura más ordenada depende de la libertad impuesta por las interacciones con la matriz. Por ejemplo, una fuerte unión de éstos iones a la superficie de la matriz puede favorecer la formación de un precipitado amorfo, mientras que una afinidad de unión menor facilita el movimiento de iones y su depositación dentro de estructuras más ordenadas.

La curvatura de cavidades moleculares provee un control tridimensional sobre la nucleación y una limitante para el tamaño del sitio de nucleación. Las superficies planares en contraste, proveen una superficie de nucleación solo en dos dimensiones, similar a una superficie convexa en donde hay una menor actividad de nucleación a causa de que los sitios de unión se encuentran más alejados en comparación de los que se presentan en superficies cóncavas, los cuales se encuentran más próximos unos de otros.



Por otra parte, la matriz puede influenciar cambios en la energía libre envuelta en la nucleación. Los iones unidos a la superficie de la matriz pueden jugar un papel importante en la disminución de la energía superficial de la fase de condensación al reducir el grado de subsaturación de los iones minerales.

2. Requerimientos de simetría en uniones epitaxiales; interfases quirales.

La correspondencia estructural en las interfases mineral-matriz no solo depende de la relación numerológica descrita para las epitaxias sino también de la simetría de unión entre los grupos espaciales bidimensionales que representan la organización de los sitios de unión de la matriz y los iones en determinada cara del cristal.

3. Requerimientos estereoquímicos.

Weissbuch, Addadi y colaboradores (1991) han demostrado experimentalmente *in vitro* la importancia de la estereoquímica en la determinación de la nucleación de caras específicas de un cristal a interfases macromoleculares. Sin embargo, algunas consideraciones sobre la geometría de coordinación de cationes están implicadas en la teoría epitaxial a causa de la flexibilidad estereoquímica.

4. Cooperatividad.

Los diferentes tipos de complementariedad molecular envueltos en la nucleación de biominerales sobre una matriz no se dan de forma aislada, sino que es probable que éste control se de mediante la combinación de los diferentes procesos.

5. Sinergismo.

Los experimentos han resaltado la posibilidad de interacciones sinérgicas (patrones colectivos que emergen a partir de muchos componentes que interactúan mutuamente), entre los iones y la dinámica molecular de la superficie orgánica, con respecto a éstas observaciones, el óptimo control de la nucleación en la biomineralización puede llevarse a cabo sobre superficies que están localmente activadas para la nucleación a través de cambios conformacionales específicos inducidos por la unión de iones sobre superficies estereoquímicamente predisuestas y por lo tanto fuertemente catalíticas para la nucleación. Un mecanismo de éste tipo puede ser la coordinación de iones específicos presentes bajo condiciones de subsaturación, los cuales inducen el ordenamiento local de la superficie de la matriz, la cual, dirige el flujo adicional de iones hacia un sitio determinado y el subsecuente desarrollo de un núcleo inorgánico.



I.4 Los sistemas fuera del equilibrio, aspectos termodinámicos.

La termodinámica es una rama de las ciencias físicas y químicas, que estudia la transferencia, almacenaje, transformación y disipación de la energía en forma de calor, así como sus diferentes interconversiones en los procesos físicos y químicos. Existen varias subdisciplinas que involucran a la física y la química, éstas incluyen a la termodinámica clásica, la cual considera la transferencia de energía y trabajo en sistemas macroscópicos, sin considerar la naturaleza de las fuerzas e interacciones entre partículas individuales (microscópicas); la termodinámica estadística la cual considera el comportamiento microscópico, describiendo las relaciones energéticas en función del comportamiento de un gran número de átomos o moléculas individuales; y la termodinámica química que se enfoca a la transferencia de energía durante las reacciones químicas y el trabajo realizado en los sistemas químicos, haciendo énfasis en el estado inicial y final del sistema, de manera que no provee información concerniente a las velocidades de cambio o a lo que ocurre a nivel molecular y atómico.

Leyes de la Termodinámica.

La primera ley dice que la energía puede ser convertida de una forma a otra pero que no puede ser creada o destruida. Esta ley provee las bases para todas las explicaciones cuantitativas de la energía sin importar su forma, por lo que la energía es el concepto más importante en la física actual.

La segunda ley o ley de la entropía establece que en un proceso irreversible la entropía del universo aumenta, mientras que en un proceso reversible la entropía del universo permanece constante y nunca disminuye. La irreversibilidad de los procesos físicos, implica que ésta ley hace probablemente a la entropía la ley más importante para el entendimiento de los procesos terrestres incluyendo a los sistemas biológicos (Mahan, 1987).

La tercera ley de la termodinámica dicta que la entropía de un cristal perfecto de cualquier elemento o compuesto es cero a la temperatura del cero absoluto (0° K), por lo que se puede evaluar la entropía absoluta ΔS de una sustancia, así en un cristal perfecto a la temperatura de cero



absoluto sólo existe un estado microscópico o condición mecánica distinguible, por lo que cada átomo ocupa una de las posiciones en la red cristalina y tiene la menor energía posible.

Dado esto, las condiciones para las cuales las variables de estado están cambiando con el tiempo y el espacio reciben el nombre de estados de no equilibrio y caen fuera del estudio de la termodinámica, por lo tanto la termodinámica trata solamente de estados de equilibrio, en los cuales las variables de estado poseen valores uniformes y constantes a través de todo el sistema (Mahan, 1987).

Así, la estabilidad puede ser fácilmente formulada y discutida en términos de potenciales termodinámicos como la entropía o la energía libre, pero la situación es radicalmente diferente en las situaciones fuera del equilibrio, donde no existen en general potenciales, los cuales pueden caracterizar el estado del sistema. Es por ésta razón por la que la teoría de la estabilidad juega un papel importante (Nicolis & Prigogine, 1977).

Por otra parte, la composición química de un sistema en equilibrio tiene que ser uniforme, para lo cual es preciso que no se produzca reacción alguna. Si existe cualquier cambio químico neto se producirían inevitablemente variaciones de algunas propiedades del sistema tales como densidad o temperatura y la especificación de su estado resultaría imposible (Mahan, 1987).

Por lo que al introducir la dirección del tiempo, no se puede describir un proceso en evolución en términos termodinámicos.

Así, al ser los IMCA originados a partir de los mecanismos de formación de los patrones de crecimiento mineral que ocurren fuera del equilibrio termodinámico, no pueden ser caracterizados mediante la termodinámica clásica.

El ordenamiento espacial en escala macroscópica se observa frecuentemente en sistemas químicos fuera del equilibrio termodinámico. Usualmente el fenómeno ocurre en fase líquida, pero involucra una transición de fase a un producto de reacción sólido.

Las contribuciones más importantes son las del concepto de Nicolis & Prigogine (1977), acerca de estructuras disipativas y la auto-organización de los sistemas fuera del equilibrio, en las que se hace alusión a que un sistema auto-organizado que disminuye su entropía termodinámica tiende necesariamente (a causa de la segunda ley de la termodinámica) a exportar o “disipar” ésta entropía hacia los alrededores, esto debido a que los sistemas que se encuentran lejos del equilibrio termodinámico tienden a auto organizarse. Otra de las aportaciones es la aproximación sinérgica del físico Hermann Haken (1985, 1997), el cual sugirió el nivel de sinérgico para el campo que



estudia los patrones colectivos que emergen a partir de muchos componentes que interactúan mutuamente, como los encontrados en las reacciones químicas y en la formación de cristales.

El descubrimiento de Onsager (citado por Nicolis & Prigogine, 1977) sobre las relaciones de reciprocidad, condujo a una extensión de la termodinámica clásica, la cual fue apropiadamente llamada “termodinámica lineal del no equilibrio”, la cual cubre un intervalo de situaciones en las que los procesos irreversibles son funciones lineales de las “fuerzas termodinámicas”, como son la temperatura o los gradientes de concentración, esta nueva rama de la termodinámica ha sido aplicada al caso de las reacciones químicas, donde la medida de las reacciones químicas es generalmente una función no lineal de las variables involucradas, como los gradientes de temperatura y concentración.

Así, en términos generales, la entropía es la tendencia de un sistema fisicoquímico aislado, de evolucionar irreversiblemente hacia el equilibrio, por lo tanto, ésta provee una medida del orden que prevalece en el sistema, pero éste concepto puede ampliarse y aplicarse a sistemas abiertos y a situaciones fuera del equilibrio (Nicolis & Prigogine, 1977).



II. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS GELES DE SÍLICE.

II.1 Introducción general.

Los materiales a los cuales generalmente se les llama geles, no incluyen solamente a los geles de sílice, sino también a otros grupos de geles como el agar, las gelatinas, los jabones suaves, una gran variedad de olefinas y esteratos, alcohol polivinílico, varios hidróxidos en agua, tetrahidroxisilanos en presencia de electrolitos y co-disolventes (metanol) o agentes con superficie ácida (Campos & Zúñiga, 1998).

En la naturaleza podemos tener diferentes tipos de geles, los cuales podríamos definir como un sistema de dos componentes de naturaleza semisólida, rico en líquido, o bien se puede decir que un gel es un sistema de dos fases, una líquida que moja una fase sólida microporosa, que consiste de una red tridimensional, más o menos regular y más o menos rígida, formado por un proceso de polimerización o policondensación de un agente formador de geles en solución. (Moreno, et al. 1999).

El crecimiento de cristales dentro de geles ha sido utilizado desde hace mucho tiempo como un método de simulación de procesos naturales en el laboratorio, realizándose generalmente a temperatura ambiente, para obtener cristales de compuestos poco solubles.

Por regla general, éste consiste de una reacción química donde la velocidad es controlada por la difusión de los reactivos. Históricamente, los geles fueron empleados con la finalidad de evitar la transferencia de masa por convección, pero en los últimos años han sido utilizadas exitosamente muchas variantes. Así, se cree que el transporte por difusión de los reactivos es el paso determinante en la totalidad de los procesos de crecimiento de cristales. Dadas éstas características, este método recibió el nombre de “método de difusión”, pero introduciendo el término de baja temperatura, para diferenciarla de otras técnicas de crecimiento de cristales. El origen de éste método se remonta a finales del siglo XIX, cuando el químico alemán R.F.Liesegang (1889) obtuvo la precipitación periódica de una sal poco soluble (cromato de plata) en gelatina. Es un hecho que los trabajos de Liesegang tuvieron gran impacto en la literatura relacionada con el crecimiento de cristales en geles y en especial sobre el fenómeno de precipitación periódica. No obstante, los primeros trabajos sobre el tema fueron realizados por



Rose (1837) y por Drevenmann (1854) citados por Kirov (1972). Después de un periodo de treinta años en que el interés por ésta técnica disminuyó, un nuevo impulso se dio en 1965, gracias a los trabajos de Henisch y colaboradores. En ésta nueva época se han realizado muchos estudios relacionados con el crecimiento de cristales de sustancias con aplicaciones tecnológicas y orientados a la optimización de la calidad y tamaño de los cristales.

Los geles han sido empleados desde hace muchos años para realizar el crecimiento de cristales de alta calidad óptico- estructural, hacia 1926, Fisher y Simons propusieron que “los geles forman un excelente medio para el crecimiento de cristales de casi cualquier sustancia, en condiciones absolutamente controlables”.

Los geles de sílice han sido objeto de muchos estudios en los últimos años y el interés en éstos materiales es en parte a la gran variedad de aplicaciones basadas en su estructura fractal, gran porosidad (hasta un 99.9% de espacio vacío), y su gran área superficial (600-800 m²/g). Los geles de sílice pueden ser hechos por la gelificación de sílice coloidal (geles coloidales producidos por la neutralización del metasilicato de sodio) o por la polimerización de alcóxidos de sílice en agua (hidrogeles) o en alcohol (alcogeles u organogeles). Los alcogeles pueden ser secados a punto crítico para la obtención de aerogeles de sílice, los cuales aparentemente mantiene la delicada estructura fractal del organogel original (Ferri, 1991).

Los geles de sílice son la fase amorfa, parcialmente hidratada y con gran porosidad del óxido de silicio (SiO₂), el cual es una sustancia hecha a partir de dos de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, el silicio y el oxígeno. De hecho, más del 55% en peso de la corteza terrestre consiste de tanto dióxido de silicio como de silicatos (sílice combinado con óxidos metálicos). La mayoría del sílice encontrado naturalmente no se encuentra significativamente hidratado y aunque éste puede existir tanto en forma cristalina como amorfa, usualmente se encuentra en forma de cuarzo, cristobalita o tridimita.

El óxido de silicio (SiO₂) puede ser considerado como el anhidro del ácido monosilícico, éste ocurre naturalmente en forma cristalina aunque es muy poco soluble en agua, por lo tanto la hidratación es muy lenta y no es una forma práctica de producir geles de sílice, como podría ser por la hidratación directa del cuarzo (Scott, 1993).

Desde 1960 se han empleado los geles de sílice para el crecimiento de cristales, debido a sus propiedades inertes con respecto a los compuestos crecidos en su red tridimensional, sirviendo como crisoles de crecimiento inertes y flexibles, estos geles pueden clasificarse como hidrogeles y



organogeles si nos basamos en el tipo de disolvente utilizado (agua y solvente orgánico respectivamente), como geles inorgánicos por su naturaleza química y como geles de tipo químico por el tipo de gelificación involucrada en su formación.

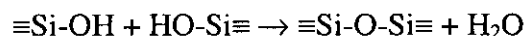
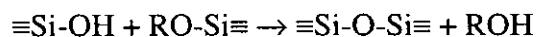
II.2 Métodos de síntesis química.

Aunque existe una gran cantidad de sistemas de difusión-reacción que se han empleado en el crecimiento de compuestos químicos, solo algunos de ellos reúnen las características adecuadas como medios de soporte del crecimiento de cristales. Dentro de éstos, son tal vez los geles de sílice los más empleados e incluyen a los obtenidos a través de la neutralización de metasilicato de sodio, mediante la utilización de resinas de intercambio catiónico y los obtenidos mediante la hidrólisis de siloxanos como el tetrametoxisilano (TMOS) y el tetraetoxisilano (TEOS).

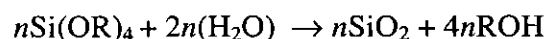
II.2.1 Hidrólisis de TMOS y TEOS.

El sistema más ampliamente estudiado es la hidrólisis del tetraetoxisilano, comúnmente conocido como tetraetil ortosilicato (TEOS). De una variedad de parámetros que afectan la velocidad de hidrólisis, los catalizadores ácidos y básicos son tal vez los que ejercen una mayor influencia, un menor efecto es producido por la temperatura, el agua, la relación de alcóxidos, el disolvente y la naturaleza de los grupos R sobre el Si (grupos relativamente grandes retrasan la velocidad de hidrólisis).

El crecimiento de las especies poliméricas es afectado por las reacciones de condensación con la eliminación de agua y alcohol.



La reacción neta requiere de dos moles de H_2O por mol de alcóxido para la conversión a Si-O_2 .

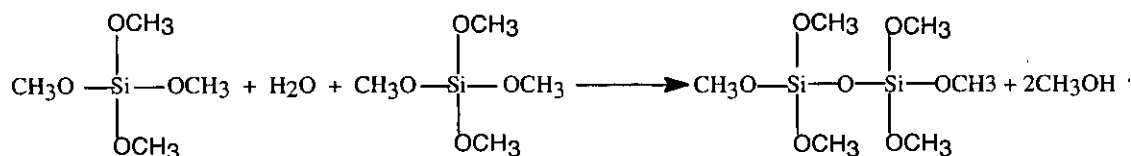


Las reacciones de polimerización por condensación e hidrólisis generalmente ocurren simultáneamente, así la polimerización comienza antes de que el metal alcóxido esté completamente hidrolizado, por lo que hay que hacer notar que mientras crece la cadena polimérica se produce un número potencialmente grande de especies total o parcialmente hidrolizadas.

El grado de entrecruzamiento puede ser alterado significativamente, dadas las diferentes sensibilidades de las reacciones de condensación e hidrólisis al pH. El punto en el cual la red polimérica forma una red tridimensional es fácil de distinguir ya que el sistema incrementa rápidamente su viscosidad y obtiene una mayor rigidez (Rao, 1993).

Las reacciones de polimerización y formación de geles utilizando TMOS son en general iguales a las observadas en la polimerización del TEOS, diferenciándose esencialmente en que el alcohol liberado durante la polimerización es el metanol en vez del etanol en el primer caso.

La forma de obtención de geles de tetrametoxisilano (TMOS) y tetraetoxisilano (TEOS), es preparar una solución acuosa en el intervalo de 2 al 20% v/v y colocar en agitación continua, en ésta técnica se debe tomar en cuenta que la gelificación es inversamente proporcional a la concentración y a la temperatura y directamente proporcional a la homogenización del sistema, ya que la formación de monómeros implica una inmediata reacción de polimerización. Sin embargo la polimerización debe darse en condiciones estáticas a fin de obtener geles con propiedades mecánicas adecuadas. La reacción química que se lleva a cabo en éste tipo de sistemas es:



La reacción de polimerización procede con la formación de lazos y partículas esféricas, las cuales pueden crecer y agregarse de acuerdo a la fuerza iónica, pH y composición química del medio de gelificación.

En el empleo de éste tipo de geles es necesario tener las siguientes consideraciones:

- La velocidad de gelificación incrementa en forma proporcional a la concentración de TMOS o TEOS.

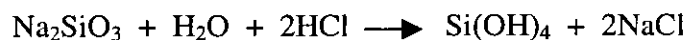


- La homogenización es recomendable para incrementar la formación de monómeros. Si esta es muy rápida puede disminuirse mediante el descenso de la temperatura.
- Una vez que se ha llevado a cabo la hidrólisis (homogenización), la reacción de polimerización debe de proceder en estado estático (segunda etapa de obtención del gel).
- El proceso de homogenización es más rápido cuando se emplean buffers, y ésta es mayor cuando el valor de pH se disminuye. Si existen incompatibilidades con el buffer empleado, se puede mezclar el siloxano (TEOS o TMOS) con uno de los componentes del amortiguador y posteriormente adicionar el otro componente.
- Los siloxanos son componentes corrosivos, por ello es necesario tomar las precauciones necesarias en su uso.

II.2.2 Neutralización de metasilicato de sodio.

El descubrimiento de los geles de sílice es usualmente acreditado a Sir Thomas Graham (1861), quien preparaba éste tipo de geles dializando una solución diluida de sílice, obtenida a partir de una disolución de silicato de sodio con ácido clorhídrico. Hoy en día, los geles de sílice son preparados casi de la misma forma, por el proceso de Patrick que consiste esencialmente en liberar el ácido silícico de una solución concentrada de silicato de sodio mediante la adición de un medio ácido (ácido acético, clorhídrico, sulfúrico, etc). El silicato de sodio es usualmente preparado mediante el calentamiento de arena a altas temperaturas y adicionando NaOH o carbonato de sodio (NaCO₃).

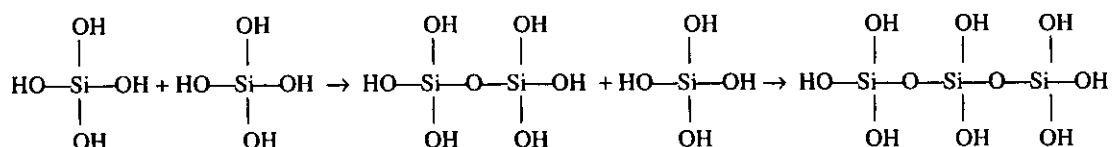
Inicialmente el ácido monosilícico es liberado mediante la adición de un ácido, siguiendo la siguiente reacción para el caso del ácido clorhídrico:



Sin embargo, el ácido libre comienza lentamente a condensarse por sí mismo, mediante la eliminación de agua para formar dímeros, trímeros y eventualmente ácido monosilícico polimérico (Scott, 1993).

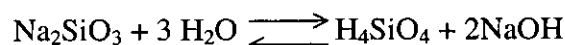


POLIMERIZACION DEL ACIDO MONOSILICICO.



El polímero continúa su crecimiento, inicialmente formando agregados poliméricos y posteriormente esferas de polímero de unos cuantos Å de diámetro. Estas esferas poliméricas son usualmente referidas como partículas primarias de sílice, éstas partículas continúan creciendo hasta un tamaño determinado, en donde la superficie de los grupos silanol (grupos hidroxilo unidos a los átomos de sílice) que se encuentran adyacentes a las partículas primarias, se condensan con la eliminación de agua. Esta condensación causa que las partículas primarias se adhieran unas con otras y la solución comienza a gelificar. Durante éste proceso, las partículas primarias de gel de sílice que se han formado tienen un diámetro de varios Å a varios cientos de Å dependiendo de las condiciones de formación (Scott, 1993).

Las reacciones de polimerización para la obtención de los geles de sílice están basadas en el siguiente equilibrio dinámico:



Es generalmente aceptado que al ácido monosilícico puede polimerizar con la liberación de H_2O , hasta obtener una red tridimensional de $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$ llamada polisiloxano (Moreno, 1995).

Los tiempos requeridos para el proceso de gelificación son muy sensibles al pH. A causa de que la gelificación es un proceso gradual, no existe una definición única para el tiempo de gelificación.

Así, el proceso de gelificación es complicado, por lo que hasta hoy en día no está totalmente claro. Sin embargo, se sabe que otros dos iones están involucrados, el H_3SiO_4^- y el $\text{H}_2\text{Si}_4^{2-}$, producidos en cantidades relativas que dependen de la concentración de iones hidrógeno. Valores de pH muy altos, así como valores muy bajos, evidentemente, al llevar grandes superficies cargadas (negativa y positiva respectivamente) inhiben la gelificación.



De tal manera que el tiempo de gelificación depende de muchos parámetros: naturaleza y concentración de las especies en solución, pH, temperatura. En el caso de las soluciones estables térmicamente, se puede acortar el tiempo incrementando la temperatura. Los parámetros determinados para los geles de sílice, como la solubilidad, tiempo de gelificación y el tamaño de poro han sido investigados y establecidos recientemente por Moreno y colaboradores (1999), así como por Gavira Gallardo J.A. (2000).

II.3 Obtención de geles de sílice a través de resinas de intercambio iónico.

De acuerdo con la ecuación de equilibrio para la neutralización del silicato de sodio, la neutralización de las moléculas de NaOH se puede llevar a cabo por medio de resinas de intercambio catiónico, sin que éstos tengan que reaccionar con el medio ácido (lo cual involucra la introducción de algunas especies iónicas remanentes del producto de la reacción que en algunos casos podrían interferir o desviar los resultados).

Características generales de la resina de intercambio iónico empleada.

La resina utilizada como donadora de protones fue una resina de intercambio catiónico y separadora de iones de Na. Esta es una resina de intercambio catiónico de tipo ácido fuerte, cuya estructura esta constituida de poliestireno reticular con grupos sulfonato protonados como la fuente de iones H^+ .

II.4 Aplicaciones diversas de los geles de sílice. El caso de la cristalización de proteínas.

A causa de que la convección depende de las propiedades de viscosidad del medio, la cristalización en geles representa un medio alternativo esencialmente libre de convección para el crecimiento de cristales de alta calidad óptico-estructural, por lo que ha sido utilizada para la cristalización de macromoléculas biológicas y en especial para las proteínas.

La cristalización en geles es un caso particular de crecimiento de cristales en solución, aunque es afectada por parámetros similares a los que se dan en éste método de crecimiento. Los geles para crecer cristales son hidrogeles en los que el proceso de gelificación corresponde al agrupamiento de un grupo de unidades monoméricas para formar un polímero, el cual ocupa el



volumen completo que ocupaba la solución. Este proceso es reversible para los geles físicos (como la gelatina y los geles de agarosa) los cuales pueden ser obtenidos por el decremento en la temperatura, o irreversible para los geles químicos (como los geles de sílice y los de poliacrilamida) los cuales son obtenidos mediante la formación de enlaces fuertes de tipo covalente. Aunque no existe un gel específico para el crecimiento de cristales, los geles de agarosa y los de sílice han demostrado una gran eficacia en el crecimiento de cristales de compuestos macromoleculares.

Los geles de sílice presentan una serie de ventajas para el crecimiento de macromoléculas biológicas; son estables en un amplio rango de temperaturas (0-60 °C) y son compatibles con muchas sustancias debido a su composición química similar a los vidrios. La incorporación de la solución de proteína dentro de la red polimérica del gel de sílice previene la iniciación de la convección natural la cual es inducida por el gradiente de densidad y el movimiento de volúmenes macroscópicos de líquido. Estos gradientes son inevitables a causa de que son los que aportan las fuerzas para la transferencia de masa y para el crecimiento de las interfases. Al utilizar el gel como medio de crecimiento, la transferencia de masa se da mediante procesos difusivos a través de los poros del gel, los cuales proveen un medio regular y en algunas ocasiones ajustable para la acumulación de soluto. Las partículas de soluto como los cristales en crecimiento son también atrapados en la red del gel para que ellos puedan crecer libremente evitando la tensión ejercida por las paredes del contenedor, impurezas o por la acción de otros cristales. La única tensión es la ejercida por el mismo gel, pero debido a la baja elasticidad de éste, generalmente se fisura en todo el perímetro del cristal en crecimiento formando una cavidad, por lo que para crecimiento de cristales frágiles se recomienda el uso de geles con una estructura no muy rígida minimizando así su resistencia para el óptimo crecimiento de éstos (Ducruix, 1992).

Los geles de sílice proveen una serie de características y adaptabilidad para el crecimiento de cristales de proteínas, dado que con éste tipo de geles es posible usar una gran variedad de diferentes agentes precipitantes, incluyendo sales, algunos disolventes orgánicos y precipitantes poliméricos como el polietilenglicol (PEG), pudiendo realizar experimentos a diferentes valores de pH y temperatura (Ducruix, 1992).

Una técnica relativamente nueva en la que se hecha mano de las diferentes características de los geles de sílice para el crecimiento de cristales de proteínas, es la técnica de acupuntura en geles desarrollada por García-Ruiz y Moreno (1993). Teniendo la gran ventaja de que los cristales crecen dentro de capilares, como los utilizados para la colecta de datos con difracción de rayos X.



Desde el punto de vista biológico, la cristalización de proteínas puede ayudar al entendimiento del autoensamblaje macromolecular en los sistemas vivos. Virus y partículas biológicas como los ribosomas, membranas, poros, citoesqueletos celulares, y otras estructuras biológicas con estructuras altamente ordenadas son todas formadas por procesos de auto-organización que a menudo requieren de una serie de interacciones relacionadas con la simetría de las macromoléculas. Hoy en día el conocimiento de la estructura tridimensional de éstos ensamblajes, como membranas, poros nucleares o ensamblajes de oligopéptidos auto-complementarios es obtenida por técnicas de microscopía electrónica. Sin embargo, el entendimiento de las bases moleculares de la auto-organización permanece esencialmente sin explicación. Hoy en día se ha incrementado el interés sobre el crecimiento de cristales de proteínas a causa de la necesidad de determinar la estructura de macromoléculas mediante técnicas de difracción de rayos X. Esta necesidad se ha incrementado por los rápidos avances en biología, biotecnología, farmacología molecular y medicina molecular las cuales requieren del entendimiento de los procesos biológicos a nivel atómico, y solo si se conoce la estructura tridimensional de las proteínas y los ácidos nucleicos pueden describirse los procesos macromoleculares a diferentes niveles, como sus interacciones *per se* y sus interacciones con ligandos (incluyendo fármacos) los cuales modulan y regulan los procesos biológicos, asentando así las bases para el diseño de proteínas y fármacos “a la medida” (Giegé, 1995).



III. LOS AMINOÁCIDOS.

III.1 Los pilares de las proteínas y su importancia en los seres vivos.

Las proteínas están constituidas por la concatenación de unos compuestos químicos denominados aminoácidos. Son éstos la unidad estructural de las proteínas. Por hidrólisis de proteínas se han identificado 20 aminoácidos distintos.

Un aminoácido, de ahí su nombre, posee dos grupos funcionales característicos: un grupo amino $-NH_2$ y un grupo carboxilo $-COOH$. Hay aminoácidos con un solo grupo amino y un solo grupo carboxilo, denominándose entonces monoamino-monocarboxílicos. Hay otros sin embargo que poseen más de un grupo carboxilo.

III.1.1 Clasificación de los aminoácidos.

Los aminoácidos pueden clasificarse de acuerdo a su carácter ácido o básico, pudiendo así clasificarse como;

- ◆ Neutros: alifáticos, aromáticos, azufrados, secundarios.
- ◆ Ácidos.
- ◆ Básicos.

No obstante, tiene un mayor interés y significado el esquema de clasificación basado en la polaridad de sus grupos R, cuando se hallan en disolución acuosa a un pH próximo a 7.0:

- ◆ Aminoácidos con grupos R polares sin carga: Sus grupos R son más solubles en agua por que sus grupos funcionales establecen puentes de hidrógeno con ella. Los aminoácidos correspondientes a éste grupo son: Glicina, Serina, Treonina, Tirosina, Asparagina, Glutamina y Cisteina.
- ◆ Aminoácidos con grupos R no-polares: Estos grupos R son de naturaleza hidrocarbonada y poseen un carácter hidrofóbico. Los aminoácidos correspondientes a éste grupo son: Alanina, Valina, Leucina, Isoleucina, Prolina, Fenilalanina, Triptófano y Metionina.
- ◆ Aminoácidos con grupos R cargados negativamente: Son los aminoácidos ácidos, ya que sus grupos R poseen una carga negativa neta a pH 7.0; Los aminoácidos correspondientes a éste grupo son: Acido aspártico y Acido Glutámico.



- ◆ Aminoácidos con grupos R cargados positivamente: Son los aminoácidos básicos, en los que los grupos R poseen una carga positiva neta a pH 7.0: Los aminoácidos correspondientes a éste grupo son: Arginina, Lisina e Histidina.

Todos los aminoácidos a pH 7.0, tienen sus grupos amino y carboxilo de las cadenas laterales ionizados, exceptuando la histidina en la que el grupo imidazol se ioniza a partir de pH 6.0.

Los grupos α -amino y α -carboxilo también resultan ionizados a pH 7.0

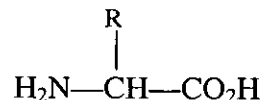
III.1.2 Propiedades ácido-base de los aminoácidos.

Un aminoácido simple (con grupo R no polar), a pH neutro, es una molécula eléctricamente neutra. Esta neutralidad no se debe a que no tenga cargas sino a que su grupo carboxilo está cargado negativamente y el grupo amino positivamente, confiriendo al aminoácido una carga neta nula. Este tipo de iones dipolares se llaman “zwiteriones”.

Por su estructura de zwiterión, los aminoácidos pueden actuar como ácidos débiles o como bases débiles, por lo que se dice que tienen propiedades anfóteras. Así, el grupo carboxilo puede liberar un protón, actuando como ácido, o el grupo amino puede captar un protón, actuando como una base. Así, un aminoácido puede encontrarse en solución en forma aniónica, catiónica o dipolar.

En general a un pH bajo, el aminoácido existe en la forma catiónica y al ir aumentando éste, el aminoácido toma sucesivamente las formas dipolar y aniónica (Ruíz-Amil, 1992).

De los 20 aminoácidos encontrados usualmente en las proteínas, 19 tienen una estructura general del tipo:



y difieren solamente en la estructura química de la cadena lateral **R**. El aminoácido 20, la prolina, es similar, pero su cadena lateral esta unida al átomo de nitrógeno dando como resultado un iminoácido.



Excepto en la glicina, donde la cadena lateral solo tiene un átomo de hidrógeno, el átomo central de carbono es asimétrico y es del tipo isomérico L.

Estructuralmente el átomo central de carbono es designado como α , y los átomos de la cadena lateral son comúnmente designados con las letras sucesivas del alfabeto griego, es decir: $\beta, \gamma, \delta, \epsilon$ y ζ conforme se alejan del carbono α (Creighton, 1993).

Una gran variedad de organismos tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos. En general, los microorganismos y las plantas pueden sintetizar todos los aminoácidos que ellos requieren usando formas simples de nitrógeno como el amonio y los nitratos. Sin embargo, las rutas biosintéticas usadas frecuentemente involucran la actividad de muchas enzimas, así como también un aporte substancial de energía metabólica. A causa de esto, muchos microorganismos obtienen los aminoácidos a partir del medio ambiente cuando éstos están disponibles. Los mamíferos carecen de la capacidad de sintetizar casi la mitad de los 20 aminoácidos que necesitan para la fabricación de proteínas. Estos aminoácidos son por lo tanto llamados **aminoácidos esenciales** y aquellos que sí pueden ser sintetizados son llamados **aminoácidos no esenciales**. En general los aminoácidos esenciales son los químicamente más complejos, con anillos aromáticos y cadenas laterales hidrocarbonadas. Los aminoácidos no son solamente utilizados para formar proteínas, sin embargo éste es su papel principal: éstos también son precursores de otros constituyentes celulares, por ejemplo, los nucleótidos purínicos son sintetizados en parte a partir de la Glicina, mientras que la Metionina y la Ornitina son precursores de las poliaminas. Así mismo, el esqueleto de carbono de todos los aminoácidos puede ser usado como combustible metabólico.

III.1.3 Aminoácidos esenciales y no-esenciales.

Los humanos somos incapaces de sintetizar 9 de los 20 aminoácidos estándar usados en la síntesis de proteínas. Estos aminoácidos esenciales son: Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano y Valina. Estos aminoácidos pueden ser sintetizados por plantas y microorganismos usando rutas metabólicas complejas, por lo que los mamíferos obtenemos los aminoácidos esenciales a partir de las proteínas incluidas en la dieta, las cuales son digeridas en el intestino liberando los aminoácidos que son subsecuentemente absorbidos. Estos aminoácidos pueden servir como precursores de proteínas u otros materiales



biológicos. El grupo amino de los aminoácidos en exceso son removidos por transaminación y el esqueleto de carbono que permanece es catabolizado a intermediarios que pueden oxidarse para liberar energía o pueden ser convertidos en combustibles metabólicos como la glucosa o los cuerpos cetónicos, dándose éste proceso en el hígado (Smith, 1992).

Proteínas.

Virtualmente todas las propiedades que caracterizan a los organismos vivos están controladas por las proteínas. Los ácidos nucleicos, la información genética que codifican – especificaciones en su mayoría para la estructura de las proteínas y la expresión de ésta información depende casi totalmente de las proteínas.

Las formas vivas realizan muchas reacciones químicas para abastecerse de energía química, pero por sí mismas estas reacciones no pueden ocurrir rápidamente a condiciones fisiológicas (solución acuosa, 37° C, pH 7 y presión atmosférica) para sustentar la vida, por lo que la tasa de éstas reacciones, se incrementa en varios órdenes de magnitud, por la presencia de las enzimas, las cuales también son proteínas.

Las proteínas almacenan y transportan una gran variedad de partículas. Estas guían el flujo de electrones en los procesos vitales de la fotosíntesis; las hormonas, transmiten información entre células y órganos específicos en los organismos complejos; algunas proteínas controlan el paso de moléculas a través de las membranas que compartimentalizan células y organelos; las proteínas funcionan en el sistema inmune de los organismos complejos defendiéndolos contra los intrusos, además de controlar la expresión génica uniéndose a secuencias específicas de ácidos nucleicos. Las proteínas son componentes cruciales de los músculos y otros sistemas que convierten la energía química en energía mecánica. Por otro lado algunas proteínas son simplemente estructurales, como las involucradas en la formación del cabello, tendones, huesos, etc.

A pesar de ésta gran diversidad de funciones biológicas, las proteínas son una clase relativamente homogénea de moléculas. Todas son del mismo tipo de polímero lineal, construido de varias combinaciones de los mismos 20 aminoácidos, variando solamente en la secuencia en que los aminoácidos se acomodan en una cadena polimérica. El secreto de la gran diversidad funcional de las proteínas reside en la diversidad química de los aminoácidos y en la diversidad de estructuras tridimensionales que se pueden formar.

Las proteínas son más complejas que muchos polímeros lineales ya que ellas pueden incorporar 20 diferentes monómeros en su construcción. Las proteínas son polímeros lineales y no



ramificados y tienen una longitud precisa y una secuencia de aminoácidos exacta, pero no solo éstas características distinguen a una proteína de otra sino también su estructura tridimensional y su plegamiento en el espacio (Creighton, 1993).

III.2 Propiedades fisicoquímicas y estructurales de los L-aminoácidos.

Las propiedades fisicoquímicas de moléculas pequeñas como los aminoácidos nos ayuda a comprender en parte la gran complejidad de macromoléculas como las proteínas y cómo éstas han sido socorridas por la naturaleza debido a su gran funcionalidad y diversidad, debido a la casi infinita serie de combinaciones que pueden realizarse a partir de éstas moléculas “simples” para la formación de proteínas. Debido a la estructura de los aminoácidos existe una serie de interacciones que son favorecidas y otras no, por lo que las características individuales de cada aminoácido juegan un importante papel para la comprensión estructural y comportamiento de macromoléculas y complejos macromoleculares.

Con la finalidad de poder determinar la estructura de una proteína, es necesario conocer las diferentes propiedades fisicoquímicas y estructurales de los 20 L-aminoácidos, y aunque hoy en día pueden utilizarse técnicas de mutagénesis dirigida para la sustitución de un aminoácido por otro, naturalmente existe una serie de parámetros generales (restricciones) en la estructura de las proteínas debido al tamaño, forma, hidrofobicidad, carga, puentes de hidrógeno y reactividad química de los aminoácidos, pudiendo existir también interacciones no-específicas (Fasman, 1990).

A continuación se enlista una serie de características fisicoquímicas de interés para el estudio de las proteínas y para el entendimiento de los fenómenos involucrados en el desarrollo de los agregados cristalinos cuando éstos se utilizan como aditivos, así mismo éstas características son importantes para su cristalización.



Nombre.	Símbolo de tres letras.	Peso Molecular. (Da)	Punto de fusión (°C)	pK _a	pK _b	pK _x	pI	S g/kg H ₂ O
Alanina.	Ala.	89.09	297	2.34	9.69		6.00	167
Valina.	Val.	117.15	292-295	2.32	9.62		5.96	58
Leucina.	Leu.	131.17	337	2.36	9.60		5.98	23
Isoleucina.	Ile.	131.17	284	2.36	9.60		6.02	34
Prolina.	Pro.	115.13	222	1.99	10.60		6.30	1622
Fenilalanina.	Phe.	165.19	284	1.83	9.13		5.48	29
Triptófano.	Trp.	204.23	282	2.83	9.39		5.89	12
Metionina.	Met.	149.21	283	2.28	9.21		5.74	56
Glicina.	Gly.	75.07	290	2.34	9.60		5.97	251
Serina.	Ser.	105.09	228	2.21	9.15		5.68	422
Treonina.	Thr.	119.12	253	2.09	9.10		5.60	97
Cisteína.	Cys.	121.16	178	1.96	10.28	8.18	5.07	
Tirosina.	Tyr.	181.19	344	2.20	9.11	10.07	5.66	0.5
Asparagina.	Asn.	132.12	236	2.02	8.80		5.41	25
Glutamina.	Gln.	146.15	185	2.17	9.13		5.65	42
Ac. Aspártico.	Asp.	133.10	270	1.88	9.60	3.65	2.77	5
Ac. Glutámico.	Glu.	147.13	249	2.19	9.67	4.25	3.22	
Arginina.	Arg.	174.20	238	2.17	9.04	12.48	10.76	181
Lisina.	Lys.	146.19	224-225	2.18	8.95	10.53	9.74	6
Histidina.	His.	155.16	277	1.82	9.17	6.00	7.59	43

pK_a: Logaritmo negativo de la constante de disociación para el grupo carboxilo (α -COOH).

pK_b: Logaritmo negativo de la constante de disociación para el grupo amino (α -NH₃⁺).

pK_x: Logaritmo negativo de la constante de disociación para cualquier otro grupo presente en la molécula.

pI: pH donde la carga neta es cero.

S: Solubilidad en agua a 25° C en unidades de gramos por kilogramo de agua.

Tabla 1. Características fisicoquímicas de los diferentes L-aminoácidos.

Los datos aquí resumidos son importantes tanto en el estudio de proteínas como para determinar las condiciones de cristalización de cada uno de los aminoácidos.



III.3 Cristalización y métodos de crecimiento cristalino.

Hoy en día existen numerosas técnicas y aproximaciones fisicoquímicas que nos dan información acerca de la estructura molecular de las diferentes especies minerales, así como de las diferentes moléculas y macromoléculas biológicas. Algunos de éstos métodos como la Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y la dinámica molecular, están ayudando cada vez mas a conocer las diferentes estructuras moleculares, particularmente las de aquellas con una masa molecular baja. Existe sin embargo, solo una técnica que ayuda a una descripción mas detallada y precisa en términos matemáticos, la difracción de rayos X, éste método ha sido utilizado para la determinación estructural de especies minerales, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En los últimos 30 años, la práctica de la cristalografía a través de rayos X ha avanzado a pasos agigantados. Casi todos los componentes críticos y de consumo de tiempo de la técnica han sido mejorados, acelerados y refinados, convirtiéndose en una técnica práctica, confiable y relativamente rápida para obtener respuestas directas a preguntas complicadas. Los datos de difracción de rayos X que antes requerían años para ser obtenidos, ahora pueden ser colectados en semanas o incluso en días, de igual manera las herramientas computacionales desarrolladas hoy en día se han convertido en una herramienta común en la resolución estructural (McPherson, 1990)

El paso fundamental para la aplicación de las diferentes metodologías para la resolución estructural es obtener la cristalización de la especie mineral, molecular o macromolecular de interés, la finalidad no es solo obtener cristales, sino que éstos tienen que ser de la mejor calidad y tamaño para un análisis de difracción de rayos X de alta resolución.

La estrategia empleada para realizar la cristalización de un compuesto consiste generalmente en guiar muy lentamente al sistema a un estado de solubilidad reducida, modificando las propiedades del disolvente, acompañado del incremento en la concentración del agente precipitante o alterando algunas condiciones fisicoquímicas como el pH y la temperatura. En cualquier método utilizado no deben escatimarse esfuerzos con el fin de fomentar y promover interacciones de unión específicas entre moléculas y para estabilizarlas una vez que se han formado. Este aspecto depende generalmente de las propiedades físicas y químicas del compuesto a cristalizar. En soluciones altamente concentradas las moléculas pueden agregarse como un precipitado amorfo, este resultado tiene que evitarse si es posible y es un indicativo de que la sobresaturación procedió demasiado rápido o extensivamente, por lo que se debe procurar



acercarse lo mas lentamente posible al punto de solvatación y dar a la molécula la oportunidad de ordenarse por sí misma en una estructura cristalina (McPherson, 1990).

Crecimiento de cristales a partir de soluciones sobresaturadas.

En una solución sobresaturada, existen dos estados en equilibrio, una fase sólida y una que consiste de moléculas libres en solución. En la saturación, no existe ningún aumento neto en la proporción de la fase sólida que pueda acumularse para la formación de un núcleo cristalino. Así, los cristales no nuclean a partir de una solución saturada. El sistema tiene que estar en un equilibrio, o estado de sobresaturación, el cual provee las fuerzas termodinámicas que dirigen la cristalización. Cuando el objetivo es crecer cristales de cualquier compuesto, una solución de ésta molécula tiene que ser llevada a un estado de sobresaturación y regresada al equilibrio por medio de fuerzas de exclusión de moléculas de soluto hacia el estado sólido, el cristal. Así, a partir de una solución saturada, el disolvente puede ser retirado gradualmente por evaporación, disminuyendo o aumentando apropiadamente la temperatura o alterando algún otra propiedad del sistema, hasta que se exceda el límite de solubilidad y la solución se sobresature. Si una fase sólida está presente, o es introducida, la saturación estrictamente puede ser restablecida ya que las moléculas salen del solvente para unirse a la fase sólida. Si no existe una fase sólida presente, como las condiciones están cambiando, entonces el soluto no parte de dos fases y la solución permanecerá en el estado de sobresaturación. El estado sólido no necesariamente se desarrolla espontáneamente cuando se excede el límite de saturación por que la energía, análoga a la energía de activación de una reacción química, es necesaria para crear la segunda fase, el núcleo estable de un cristal o un precipitado. Así, es necesario librar una barrera energética o cinética para acercarse más y más hacia el equilibrio, dentro de la zona de sobresaturación. Sobre un diagrama de fases (Ostwald-Miers) en donde la concentración en el equilibrio (solubilidad) se grafica contra la concentración de agente precipitante, (Figura 2), la línea indicativa de la saturación es también una unión que marca las necesidades energéticas para dar paso a una segunda fase, la formación del núcleo de un cristal o un agregado no específico caracterizado como un precipitado. Cuando un núcleo estable ha sido formado en una solución sobresaturada, éste puede seguir creciendo hasta que el sistema llegue al equilibrio, pero mientras prevalezcan las fuerzas del no equilibrio y exista algún grado de sobresaturación, los cristales seguirán creciendo o continuará la precipitación amorfa (McPherson, 1990).



Es importante entender el significado del término “núcleo estable”. Muchos agregados o núcleos se forman espontáneamente cuando se ha llegado a la sobresaturación, pero en general son “no estables”. En lugar de continuar su desarrollo, éstos se redisuelven rápidamente y regresan a formar parte de los constituyentes moleculares de la solución. Un “núcleo estable” es un agregado molecular de tamaño y estructura física bien determinada que puede adicionar nuevas moléculas dentro de sus superficies en crecimiento más rápidamente que las que se pierden en la solución; esto es, que puede seguir creciendo mientras que el sistema esté sobresaturado.

En la teoría clásica de crecimiento de cristales, la región de sobresaturación que se encuentra exactamente sobre la de saturación, está dividida en dos zonas, la región metaestable y la región lábil.

Por definición, los núcleos estables no pueden formarse en la región metaestable justo arriba de la de saturación, sin embargo un núcleo estable o sólido puede estar presente en la región metaestable, en la que puede mantenerse para crecer. Por el contrario, es en la región lábil en donde los núcleos estables pueden formarse espontáneamente, por lo que siendo estables en ésta región, las moléculas se acumulan y se agota la fase líquida hasta que el sistema reingresa a la región metaestable, llevándolo al estado de saturación.

Un punto importante de éstas dos regiones sobre la saturación, es que una puede soportar el crecimiento de los cristales pero no la formación de núcleos estables, mientras que la otra puede producir núcleos y soportar su crecimiento. Ahora, la velocidad de crecimiento del cristal, está en función de la distancia de la solución a la posición de equilibrio en la saturación. Así, los núcleos que se forman lejos del equilibrio en la región lábil pueden crecer rápidamente en un principio mientras se agota la fase líquida y regresar al estado metaestable, donde el crecimiento es cada vez más lento, así que cuando el sistema se acerca al estado metaestable es por que se ha formado un núcleo estable.

Por lo que al parecer la mejor forma de obtener cristales, es presionar al sistema a alejarse dentro de la región lábil, sobresaturándola. Aquí, la probabilidad de la formación de núcleos es grande, así como la velocidad de crecimiento y la probabilidad de obtener cristales.

Como la región lábil está más alejada de la saturación, es también probable que se de una nucleación espontánea y descontrolada, por lo que la cristalización en la región lábil lejos del estado metaestable, frecuentemente resulta en una extensa y descontrolada abundancia de cristales, y en general ninguno crece hasta un tamaño apropiado para estudios de difracción de rayos X, así que cuando la cristalización es iniciada a partir de un punto de alta sobresaturación, el crecimiento



inicial es extremadamente rápido y éste está frecuentemente asociado con la aparición de defectos y dislocaciones. Por lo tanto, los cristales producidos a partir de soluciones extremadamente saturadas tienden a ser numerosos, pequeños y a ser afectados con defectos en el crecimiento.

En términos de diagramas de fases, el crecimiento ideal de un cristal puede comenzar con la formación de un núcleo en la región lábil justo arriba de la región metaestable. Allí, el crecimiento puede ocurrir lentamente mientras que la solución se agota, y regresar a la región de metaestabilidad donde no se pueden formar más núcleos estables y solo unos cuantos núcleos ya establecidos continúan creciendo.

Así, en cristales crecidos para análisis de rayos X, se intenta ya sea por deshidratación o por la alteración de condiciones físicas, transportar a la solución a la región lábil y al estado de sobresaturación, acercándose lo más posible al estado metaestable (Ducruix, 1992).

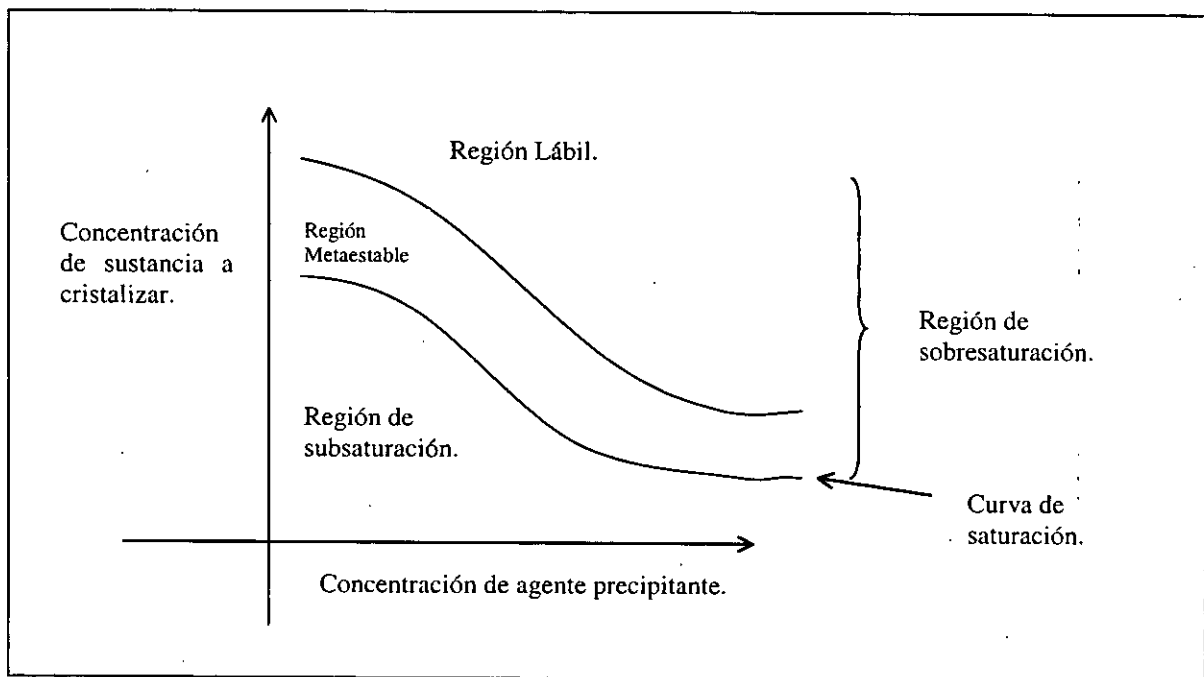


Figura 2. Diagrama de fases (Ostwald-Miers) donde se muestra la solubilidad en función de la concentración de agente precipitante (Ducruix, 1992).



III.3.1 Método de difusión en geles de sílice.

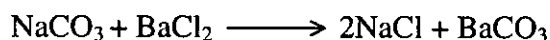
El procedimiento más simple para controlar el crecimiento de un cristal regido por y transferencia de masa a través de la difusión, involucra la adición controlada de dos o más soluciones reaccionantes en un gran volumen de disolvente. Existen varias formas de hacerlo, por control electrolítico, precipitación homogénea, etc., pero para disminuir la convección por transferencia de masa y obtener cristales con grandes cualidades óptico-estructurales es necesario el uso de un medio poroso. Muchos tipos diferentes de medios porosos han sido utilizados en el método de difusión y principalmente los medios porosos no-rígidos como los geles y en especial los geles de sílice. Los geles de sílice usados en los experimentos clásicos de crecimiento de cristales son producidos por la mezcla de una solución de silicato de sodio y la cantidad apropiada de ácido. En la mayoría de los casos, se utiliza una solución de metasilicato de sodio con una densidad de entre 1.04 g/cm^3 y 1.06 g/cm^3 y con un pH de entre 11 y 11.2. El pH del gel es ajustado mediante la acidificación de ésta solución con agitación constante. Las cantidades de reactivos tienen que ser reguladas cuidadosamente, ya que pequeñas variaciones en los volúmenes producen cambios drásticos en el pH. Es importante hacer notar que el tiempo mínimo de gelificación es de unos segundos entre pH 7-8. Por lo tanto si es necesario obtener un gel con un pH bajo (menor de 7), es la solución de silicato de sodio la que tiene que adicionarse al ácido. Los geles de sílice son utilizados en ésta técnica ya que son ópticamente transparentes, y los cristales pueden ser observados en cualquier punto del experimento. Además, el uso de los geles de sílice minimiza el efecto de la interacción entre diferentes tipos de precipitados, y el impacto de los cristales con las paredes y el fondo del contenedor.

Existen algunas variantes de la técnica de crecimiento en geles, éstas pueden ser agrupadas basándose en los dispositivos experimentales utilizados y las reacciones químicas que ocurren para obtener las diferencias en los potenciales químicos necesarios para la nucleación de una nueva fase sólida. En relación con éste último aspecto García-Ruíz (1982) determinó dos grupos mayores a considerar:

A) *Substancias poco solubles en agua.* Los cristales de éste tipo de compuestos son obtenidos utilizando los siguientes métodos químicos:

A-1) Método de reacción, en el cual los núcleos cristalinos aparecen como resultado de una reacción de doble descomposición entre dos reactivos. Este método es el utilizado en la formación de los agregados cristalinos de morfología inducida (IMCA), mediante la siguiente reacción:





A-2) Método de reducción química, usado en la nucleación y el crecimiento de cristales de metales.

B) *Substancias solubles en agua*. Dos variantes han sido utilizadas hasta hoy en día:

B-1) Método de evaporación. Una solución de la sustancia deseada es incorporada dentro de la solución de metasilicato de sodio acidificado antes de que gelifique, así, como resultado de la pérdida de agua por evaporación, pueden formarse pequeños cristales en la superficie del gel.

B-2) Método de reducción de la solubilidad. Este método se basa en el hecho de que la solubilidad de un compuesto soluble en agua, puede ser reducida al adicionar un disolvente no-polar o al cambiar el pH de la totalidad de la solución. Este método fue utilizado para la cristalización de varios L-Aminoácidos, basándose en su grado de solubilidad en diferentes disolventes.

III.3.2 Método de difusión en fase vapor.

Actualmente, el método más ampliamente utilizado para llevar un compuesto a la sobresaturación en microgotas es la difusión en fase vapor. Este método tiene una amplia diversidad de variantes, las cuales pueden dividirse en aquellos denominados de *gota sedente o "sitting drop"* y aquellos que emplean una *gota colgante o "hanging drop"*. De cualquier forma, éste método se basa en el transporte de agua o cualquier otro agente volátil entre una microgota del líquido madre (compuesto a cristalizar), con un volumen generalmente de entre 5 y 25µl, y una solución precipitante o de concentración, la cual se encuentra en un reservorio mucho mayor de entre 0.75 a 25ml de capacidad. Mediante la difusión en fase vapor, la gota y el reservorio tienden al equilibrio, y a causa de que el reservorio tiene un volumen mucho más grande, las condiciones finales en el equilibrio, son esencialmente las del estado inicial del reservorio. A través de la difusión en fase vapor, el agua es removida lentamente de la gota, pudiendo cambiar el pH, o introducir disolventes volátiles gradualmente como el etanol, metanol, etc. Una de las ventajas de éste sistema es que puede llevarse a cabo a diferentes temperaturas utilizando volúmenes pequeños de muestra.

El método de gota colgante consiste en poner una microgota de la solución a cristalizar, generalmente subsaturada (por lo menos de 5µl), suspendida en un cubreobjetos siliconizado circular, que es puesto sobre un pozo que contiene la solución precipitante (aproximadamente 1ml). Los dispositivos mas utilizados son las cajas de plástico para cultivo de tejidos (Limbro) que



tienen 24 reservorios que permiten ser selladas al aplicar grasa de vacío o aceite alrededor de la circunferencia de cada uno de los pozos. Estas tienen la ventaja de que el volumen necesario para cada experimento es muy bajo, además de que pueden hacerse barridos de las diferentes condiciones que afectan la cristalización como la concentración de la muestra y del agente precipitante, pH, etc, de igual manera éstas pueden ser examinadas rápida y fácilmente con un microscopio convencional y pueden ser guardadas de forma compacta apilando unas sobre otras, así esta técnica puede ser utilizada para optimizar las condiciones para el crecimiento de cristales (McPherson, 1990).

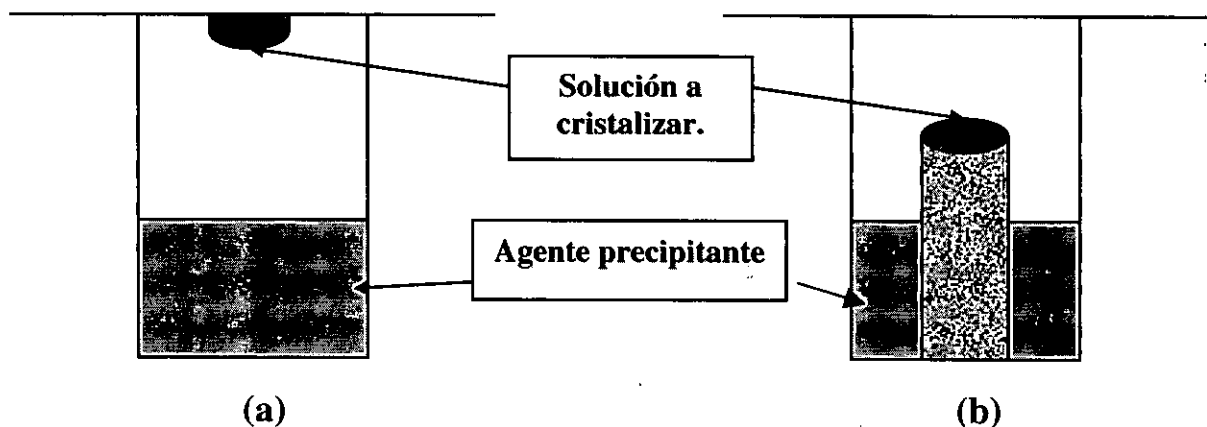


Fig. 3 Sistema experimental utilizado en la técnica de difusión en fase vapor ("hanging drop" o gota colgante (a) y "sitting drop" o gota sedente (b)).

III.3.3 Método isotónico (Evaporación simple a temperatura constante).

Este método para la obtención de cristales es de lo más sencillo, pero es recomendable solo para los casos en que se conocen bien las condiciones de cristalización o cuando no es tan importante el control de la velocidad de evaporación, aunque se pueden montar sistemas experimentales para controlar la evaporación, esta técnica consiste en colocar una gota de 5 a 10 μl en un lugar a temperatura ambiente, procurando que no se encuentre cerca de fuentes de aireación para evitar su contaminación ya que se deja en dichas condiciones para que el disolvente se evapore y la muestra se concentre, en muchos casos es necesario regular un poco la velocidad



de evaporación ya que como hemos visto anteriormente si ésta es muy drástica se obtiene un precipitado amorfo.



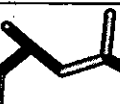

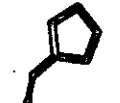
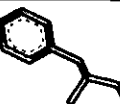
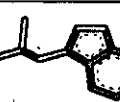
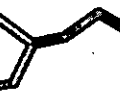

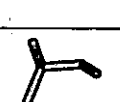


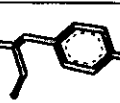
III.4 Datos estructurales obtenidos a través de la difracción de rayos X.

Los rayos X son una radiación electromagnética de longitud de onda corta, ésta es emitida cuando los electrones saltan de un estado de mayor a menor energía. Los rayos X generalmente son producidos por tubos a alto voltaje, en los cuales una placa de metal (el ánodo), es bombardeada con electrones acelerados, causando por lo tanto la emisión de rayos X de una longitud de onda específica, por lo que son llamados rayos X monocromáticos. A causa del alto voltaje se produce un rápido aumento en la temperatura de la placa por lo que tiene que ser enfriada. La placa es comúnmente de cobre, que emite rayos X con una longitud de onda de 1.5418 \AA ($\text{CuK}\alpha$), la cual es muy similar a la distancia de un puente de hidrógeno (Duncan, 1993). Un eficiente enfriamiento es llevado a cabo con los generadores de rayos X de ánodo rotatorio. Así, cuando el rayo principal de la fuente de rayos X interactúa con el cristal, muchos de los rayos pasan a través de él, sin embargo éstos interactúan con los electrones de cada átomo causando su oscilación. Los electrones oscilantes sirven como una nueva fuente de rayos X, siendo emitidos casi en todas direcciones, por lo que éste patrón de difracción obtenido a partir de la difracción de los rayos X es registrado en una placa fotográfica o un detector electrónico y a partir de éstos datos es posible determinar la estructura tridimensional de la molécula mediante una serie compleja de análisis matemático (Branden, 1991)

De tal manera que la interacción de los Rayos-X con la materia nos da información estructural del orden o desorden interno de un sólido, por lo que pueden emplearse para conocer la estructura tridimensional de un sólido cristalino con una alta precisión en base a la calidad óptico-estructural de los cristales.

En la siguiente tabla se resumen los datos estructurales obtenidos mediante difracción de rayos-X, como es el tamaño de la celda unidad, el sistema cristalino y el grupo espacial de los diferentes L-aminoácidos, así como los datos bibliográficos de donde se obtuvieron.



Nombre.	Símbolo de tres letras.	Datos de la celda unidad.	Sistema cristalino.	Grupo espacial.	Referencia.	Estructura tridimensional.
Alanina.	Ala.	a= 6.032 b= 12.343 c= 5.784	Ortorrómbico	$P_{na}2_1$	Simpson Jr, H. 1966	
Valina.	Val.	a= 9.71 b= 5.27 c=12.6 $\beta= 90.8^\circ$	Monoclínico	$P2_1$	Torii, K. 1970	
Leucina.	Leu.	a= 7.29 b= 24.51 c= 5.54	Ortorrómbico	$P2_12_12_1$	Subramanian, E. 1967	
Isoleucina.	Ile.	a=9.75 b= 5.32 c=14.12 $\beta= 95.8^\circ$	Monoclínico	$P2_1$	Torii, K. 1971	
Prolina.	Pro.	a= 20.73 b=6.34 c=5.20 $\beta= 93^\circ 40'$	Monoclínico	C_2^3-C2	Sasisekharan, V. 1959	
Fenilalanina.	Phe.	a= 13.13 b= 6.59 c= 10.28 $\beta= 104^\circ 38'$	Monoclínico	$P2_1$	Khawas, B. 1971	
Triptofano.	Trp.	a= 16.81 b= 17.90 c= 6.90	Ortorrómbico	Pmmm	Khawas, B. 1969	
Metionina.	Met.	a= 9.498 b= 5.189 c= 15.318 $\beta= 97.69^\circ$	Monoclínico.	$P2_1$	Torii, K. 1973	
Glicina.	Gly.	a= 5.10 b= 11.96 c= 5.45 $\beta= 111'38^\circ$	Monoclínico	$P2_1$	Albrecht, G. 1939	
Serina.	Ser.	a= 1.176 b=1 c=0.528	Monoclínico	$C_5^2h-P2_1/a$	Shoemaker, D. 1953	
Treonina.	Thr.	a=13.611 b= 7.738 c= 5.142	Ortorrómbico.	$P2_12_12_1$	Srinivasan, R. 1974	
Cisteina.	Cys.	a= 11.51 b=5.240 c=9.517	Monoclínico	$P2_1$	Harding, M. 1968	
Tirosina.	Tyr.	a= 13.89 b=21.08 c=5.84	Ortorrómbico.	$P_{na}m$	Khawas, B. 1969	



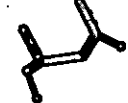
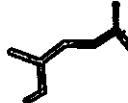


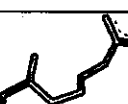


Asparagina.	Asn.	a= 5.593 b=9.827 c=11.808	Ortorrómbico.	P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁	Ramanadham,M 1972	
Glutamina.	Gln.	a= 16.01 b=7.76 c=5.10	Ortorrómbico	P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁	Cochran,W. 1952	
Ac.Aspartico	Asp.	a= 7.617 b=6.982 c=5.142	Monoclínico.	P ₂ ₁	Derissen,J. 1968	
Ac.Glutámico	Glu.	a= 5.16 b=11.80 c=13.30	Ortorrómbico	P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁	Dawson,B. 1953	
Arginina.	Arg.	a= 11.044 b= 8.481 c= 11.241 $\beta=91.31^\circ$	Monoclínico	P ₂ ₁	Dow, L. 1970	
Lisina.	Lys.	a= 7.492 b=13.320 c=5.879	Monoclínico.	P ₂ ₁	Bhat, T. 1976	
Histidina.	His.	a= 5.177 b=7.322 c=18.87	Ortorrómbico.	P ₂ ₁ 2 ₁ 2 ₁	Madden,J. 1972	

Tabla 2. Datos estructurales de los diferentes L-aminoácidos obtenidos mediante difracción de rayos-X



SECCION EXPERIMENTAL



IV. MATERIAL Y METODOS.

IV.1 Preparación de geles de sílice mediante la neutralización de metasilicato de sodio.

Los geles de sílice fueron preparados a partir de la neutralización de una solución comercial de Silicato de Sodio (Aldrich, CAT. 33,844-3), la cual contiene aproximadamente 27% SiO₂ y 14% NaOH, una densidad de 1.39 g/cm³ y un pH de 11.6 ± 0.2. Esta solución se diluyó con agua destilada para obtener una disolución con una densidad de 1.06 g/cm³ utilizando la siguiente ecuación:

$$V_{ss} = \frac{V_a (0.06)}{1.39 (\text{g/cm}^3) - \rho_{H_2O}}$$

Donde:

V_{ss} = El volumen de Silicato de Sodio del reactivo de partida ($\rho = 1.39 \text{ g/cm}^3$)

V_a = Volumen de aforo.

ρ_{H_2O} = densidad del H₂O a la temperatura de trabajo.

Dicha disolución fue preparada en material de polipropileno con el fin de evitar que el metasilicato de sodio atacara las paredes del material de vidrio debido a su alto valor alcalino y evitando así su contaminación.

La neutralización se llevó a cabo mediante la adición de una solución de HCl 1M, para lo cual se realizó una curva de calibración. Esta curva es el producto de una serie de titulaciones de silicato de sodio con la solución de HCl, de la misma manera se realizaron una serie de curvas de calibración con H₂SO₄ y con ácido acético, aunque para el desarrollo de los IMCA solo se utilizaron geles producto de la neutralización de metasilicato de sodio con HCl debido a su rápida reacción y facilidad de uso, los valores de pH fueron registrados con un potenciómetro (Fisher Scientific 300 403.1 Rev.E) con el que se pudieron detectar variaciones de hasta 0.01 unidades de pH.

Es importante mencionar que el hecho de hacer alusión a geles con pH 8, 9 y 10, ésto NO quiere decir que la solución en el interior del gel se encuentra a éste valor de pH, lo que sucede en



este proceso es que aunque existe un pequeño remanente de la solución sin polimerizar, ésta se considera irrelevante, por lo que la neutralización nos da en todos los casos un valor de pH de la solución en el gel de aproximadamente 7 (neutro). El hecho de hacer mención a los valores de pH alcalinos, es concerniente al valor en que se da el proceso de síntesis y a que las propiedades físicas y mecánicas a éstos diferentes valores de pH, sí son un factor que debe de tomarse en cuenta, por lo que se decidió mantener la expresión de pH 8, 9 y 10 tomando en cuenta lo que significa ésto en realidad.

IV.2 Metodologías experimentales utilizadas para la obtención de geles de sílice empleando resina de intercambio catiónico (DOWEX-50W8-200).

La metodología experimental para la obtención de geles de sílice mediante la utilización de resina de intercambio catiónico (Sigma. DOWEX-50W8-200) consistió en:

- Realizar una curva de calibración con la finalidad de determinar la cantidad necesaria de resina para la neutralización de las moléculas de NaOH que se encuentran en un volumen constante de 10ml de metasilicato de sodio y determinar el valor de pH final.
- Realizar otra curva en la que se mantiene constante la cantidad de resina y se varía el volumen de metasilicato de sodio adicionado a la resina, y determinar el pH de la solución final.

Esta serie de experimentos se realizó con la finalidad de observar las diferencias generales, en las cantidades de reactivos utilizados, así como estandarizar las diferentes técnicas.

IV.2.1 Metodología utilizada manteniendo la cantidad de metasilicato de sodio constante.

Se utilizaron volúmenes iguales de una solución de metasilicato de sodio (10ml) con una densidad de 1.06 g/cm^3 y se colocaron en un recipiente de polipropileno, a cada uno de éstos volúmenes se le adicionó una cantidad en gramos de resina DOWEX-50W, una vez adicionada la resina, la mezcla se mantuvo en agitación por un periodo de tiempo de entre 10 y 15 minutos, al término de éste tiempo la solución fue filtrada utilizando papel filtro (Whatman cat.No. 1001 110) y fue medido el pH utilizando un potenciómetro Fisher Scientific 300 403.1 Rev.E. Con los datos obtenidos se construyó la curva de calibración para la estandarización de la técnica.

Esta serie de experimentos se realizó en un intervalo de 0 a 6 g de resina.



IV.2.2 Metodología utilizada manteniendo la cantidad de resina constante.

La otra variante experimental utilizada consistió en mantener constante la cantidad de resina (5 g) y variar el volumen de metasilicato de sodio adicionado, de igual manera se utilizó una solución de metasilicato con una densidad de 1.06 g/cm^3 , a partir de ésta solución se tomaron diferentes volúmenes y fueron adicionados a la resina de intercambio catiónico, manteniéndose en agitación por un periodo de tiempo de entre 10 y 15 minutos, al término de éste lapso de tiempo, la mezcla fue filtrada utilizando papel filtro similar al empleado en el caso anterior y se le midió el pH para la construcción de una nueva gráfica de estandarización.

IV.3 Incorporación de los diferentes iones y aminoácidos en la red polimérica de sílice.

Es importante mencionar que aunque se realizó la estandarización de las diferentes técnicas para la obtención de geles de sílice (neutralización de metasilicato de sodio con ácido clorhídrico, sulfúrico y acético, y utilizando resinas de intercambio catiónico), la técnica utilizada en todos los casos para el crecimiento de agregados cristalinos de morfología inducida fue la neutralización con HCl, dadas las características de los geles obtenidos, así como su facilidad de manejo y síntesis, aunque no se descarta que las otras técnicas puedan ser utilizadas para la formación de los geles de sílice, por lo que nos referiremos solamente a la neutralización de metasilicato de sodio con HCl en la estandarización de la técnica para la obtención de los IMCA.

Una vez estandarizada la metodología de neutralización del metasilicato de sodio con HCl, se procedió a incorporar en la matriz del gel de sílice cada uno de los 20 diferentes L-aminoácidos utilizados, los cuales fueron: Cys, Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Asp, Glu, Arg, Lys, His. (Kit. Sigma. LAA-21 Lot.48H9800) y cada uno de estos a su vez a 3 valores diferentes de pH de formación del gel (8.0, 9.0 y 10.0), esto consistió en agregar a 10 ml de la disolución de Silicato de Sodio $100 \mu\text{l}$ de una solución de Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) 0.1M y $2 \mu\text{l}$ de una solución de uno de los aminoácidos a una concentración de 1 mg/ml, ya que se tenía esta nueva solución se le agregó el HCl necesario para llevarla al pH de trabajo basándose en la curva de calibración. Después 6 ml de esta solución fueron adicionados al sistema experimental (Figura 4) en el cual posteriormente se llevarían a cabo las reacciones, este



sistema consistía de dos placas de vidrio de 10 cm de largo por 7 cm de ancho, separados por un caucho de 3mm de espesor el cual circundaba 3 lados de las placas de vidrio, a este caucho se le agregó grasa de vacío (Hampton Research CAT.HR3-510) para evitar fugas, una vez que el cassette fue cargado con la solución, el cuarto lado fue sellado con una tira del mismo caucho (Fig. 4 a y b). Esta metodología se realizó para cada uno de los 20 aminoácidos obteniendo así tres placas por aminoácido.

IV.4 Precipitación de los Agregados Cristalinos de Morfología Inducida dentro de geles de sílice.

Una vez obtenidos los geles en cuya red tridimensional se encontraban tanto iones como aminoácido, para comenzar la reacción de precipitación dentro del gel, se agregó BaCl_2 0.1M hasta el nivel de aforación, procurando no dejar burbujas de aire, esto se realizó utilizando jeringas desechables. Una vez agregado el BaCl_2 se selló perfectamente la placa utilizando un sellador de silicona (Wacker Silicone Sealant), al momento de agregar el BaCl_2 se registró la hora tomando este tiempo como t_0 (Fig. 4 c y d). Es importante mencionar que una vez preparados los geles, estos se mantuvieron a una temperatura constante de 18 °C dentro de una cámara de temperatura controlada.

Las estructuras formadas por la precipitación y posterior formación de los silicocarbonatos de Bario fueron examinados y fotografiados usando un microscopio Olympus S2H-ILLK equipado con un dispositivo de polarización de luz y una cámara Olympus SC35 de 35mm, las fotografías se tomaron a intervalos de 24hrs, siendo estos 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 y 672hrs. correspondientes a 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 y 28 días respectivamente después de la adición del BaCl_2 . Las películas empleadas para el registro fotográfico fueron Kodak Plus X-Pan 125 PX 135-36 para impresiones en blanco y negro, con el fin de registrar los cambios estructurales y cómo cada uno de los aminoácidos afectaba la morfología de los IMCA a los diferentes valores de pH.



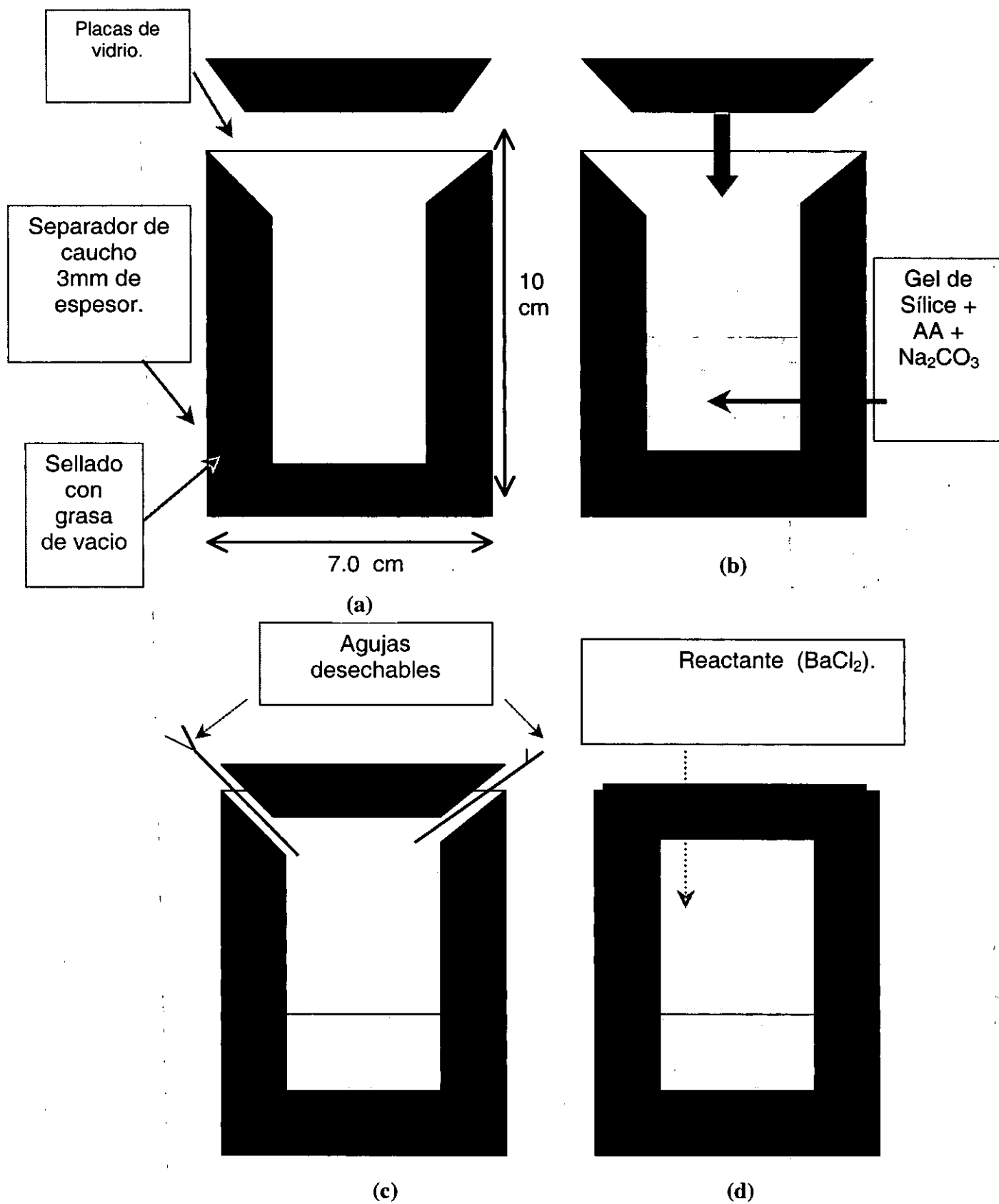


Figura. 4 Diseño del sistema experimental empleado en éste trabajo.



IV.5 Metodologías utilizadas para la cristalización de los diferentes L-aminoácidos.

La obtención de cristales de los diferentes aminoácidos se basó en las características intrínsecas de cada uno de éstos así como en sus propiedades fisicoquímicas y estructurales (sección III.2), empleando así metodologías específicas para cada caso, basadas en técnicas clásicas de crecimiento de cristales.

IV.5.1 Cristalización dentro de geles de sílice.

Esta técnica se basa en la solubilidad diferencial de algunos aminoácidos en distintos disolventes, dado que la solubilidad de un compuesto soluble en agua, puede ser reducida al adicionar un disolvente no-polar o al cambiar el pH de la totalidad de la solución, en general la técnica consistió en preparar soluciones saturadas de los diferentes aminoácidos, que son solubles o altamente solubles en agua y mezclar 0.5ml de ésta solución con 0.5ml de una solución de silicato de sodio neutralizada con ácido acético 1M, introduciendo así a las moléculas de aminoácido dentro de la red polimérica de sílice, una vez dada la reacción de polimerización se adicionó un volumen similar al de la mezcla (1ml) de EtOH absoluto, 80% v/v y 60% v/v, para determinar los mejores parámetros de cristalización. La función del etanol fue reducir la solubilidad del aminoácido al ir difundiendo en el gel de sílice, mediante ésta técnica se logró obtener cristales de Metionina, Glicina, Serina, Treonina y Asparagina.

IV.5.2 Difusión en fase vapor (gota colgante).

Esta técnica es una de las más utilizadas en el crecimiento de cristales de macromoléculas biológicas. Aunque existe un gran número de variantes, para el crecimiento de cristales de aminoácidos se utilizó en todos los casos la de gota colgante o "hanging drop" llevando a la solución a un nivel de sobresaturación extrayendo agua de la gota mediante el uso de agentes precipitantes como el PEG-6000 (polietilenglicol) o cambiando las propiedades del disolvente en el que se encuentra disuelto el aminoácido (como son la constante dieléctrica y solubilidad) mediante la utilización de disolventes orgánicos como el EtOH y el MeOH,



que tienen una presión de vapor mayor a la del agua. Mediante ésta técnica se pudieron obtener cristales de Leucina, Fenilalanina, Cisteina y Glutamina.

IV.5.3 Método isotónico (evaporación simple a temperatura constante).

Esta técnica consistió en general en colocar una gota de 5 a 10 μ l de una solución saturada de un aminoácido sobre un cubreobjetos siliconizado y dejar que el disolvente se evapore a temperatura ambiente, la velocidad de evaporación depende del nivel de saturación de la muestra y la presión de vapor a las condiciones de temperatura y presión dadas. Dadas las condiciones de cristalización es necesario prevenir en lo posible la contaminación de la muestra. Mediante ésta técnica aunque no se obtuvieron cristales de gran tamaño, si fue posible obtener cristales de dos aminoácidos: Valina e Isoleucina.

IV.5.4 Evaporación lenta de una solución acuosa saturada.

Esta técnica consiste solo en preparar una solución saturada del aminoácido a cristalizar (1ml) y ponerlo en un pequeño vial el cual tiene una capacidad de aproximadamente 2.5ml y tapanlo con Parafilm, realizando una pequeña perforación en la superficie de éste y manteniendo la solución en una cámara de temperatura controlada a 18° C. Mediante ésta técnica se logró la cristalización del aminoácido Alanina.



V. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

V.1 Propiedades fisicoquímicas y síntesis de geles de sílice.

Los resultados experimentales obtenidos para los geles de sílice, se basan en las propiedades fisicoquímicas de éstos, por lo que a continuación se presentan las curvas de calibración realizadas para la estandarización de la técnica de neutralización de metasilicato de sodio con ácido clorhídrico, acético y sulfúrico (Figuras. 5,6 y 7 respectivamente), así como las curvas de calibración realizadas para la obtención de los geles utilizando la resina DOWEX-50W8-200 para intercambio catiónico (Figuras. 8 y 9). Es importante tener en cuenta que para realizar la curva de calibración para geles con valores de pH alcalino es necesario realizar la titulación del metasilicato de sodio con el ácido, ya que conforme se va adicionando el ácido, la solución tiende a neutralizarse y polimerizar a valores cercanos a pH 7, por lo que éste tipo de titulación es la realizada para obtener geles con valores de pH alcalino o cercanos a 7, pero no para la preparación de geles con valores de pH ácido, por lo que para la obtención de un gel con un pH ácido, es necesario hacer la titulación inversa en donde la adición es de metasilicato de sodio a una solución de ácido ya sea éste clorhídrico, acético o sulfúrico, esto no quiere decir que solo éstos ácidos puedan ser utilizados para la neutralización del metasilicato, pero hay que tomar en cuenta que aunque todos llevan acabo de manera similar la reacción de neutralización, cada uno afecta de manera distinta la estructura del gel debido a su diferente pH, constante dieléctrica, etc. El tiempo de gelificación necesario para la formación de los geles del sistema experimental varió de aproximadamente 24 horas a unos pocos minutos en función del pH.



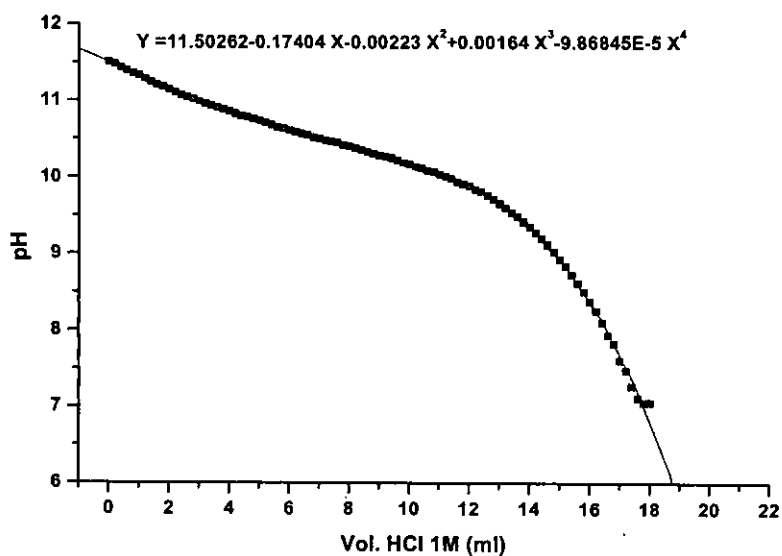


Figura 5. Titulación de metasilicato de sodio, volumen constante (10ml) con HCl 1M.

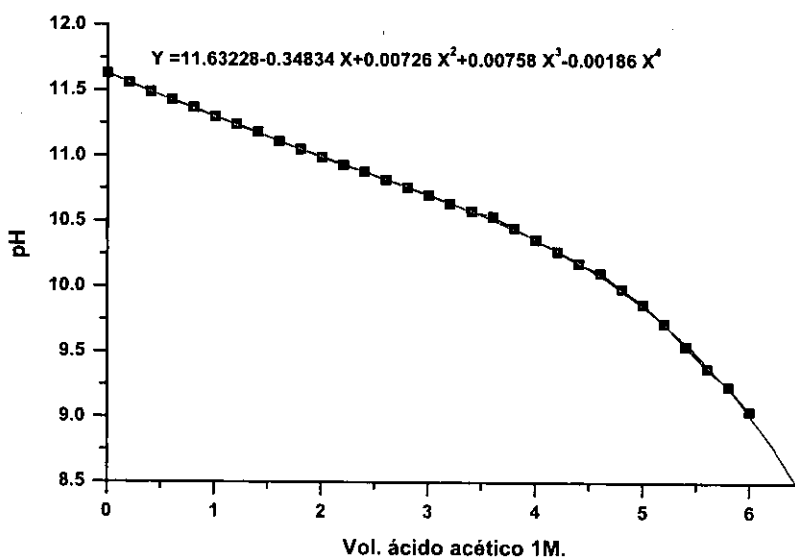


Figura 6. Titulación de metasilicato de sodio, volumen constante (10ml) con ácido acético 1M.



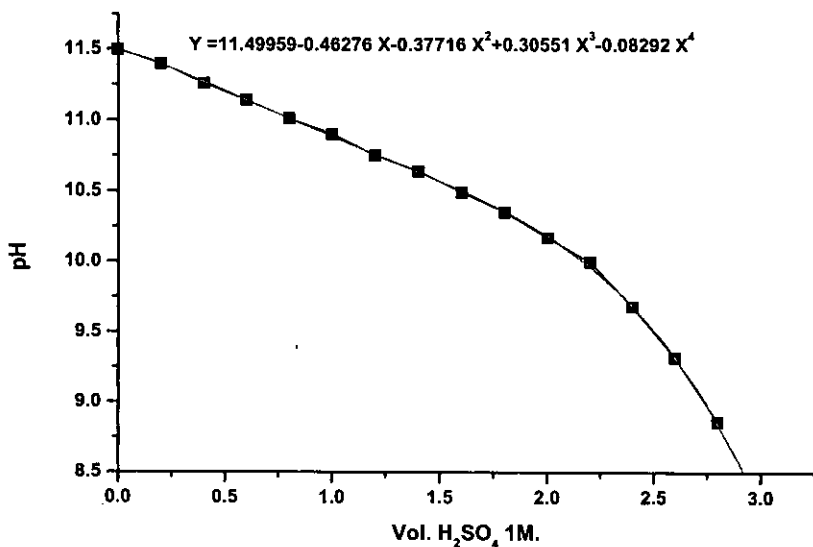


Figura 7. Titulación de metasilicato de sodio, volumen constante (10ml) con ácido sulfúrico (H₂SO₄)1M.

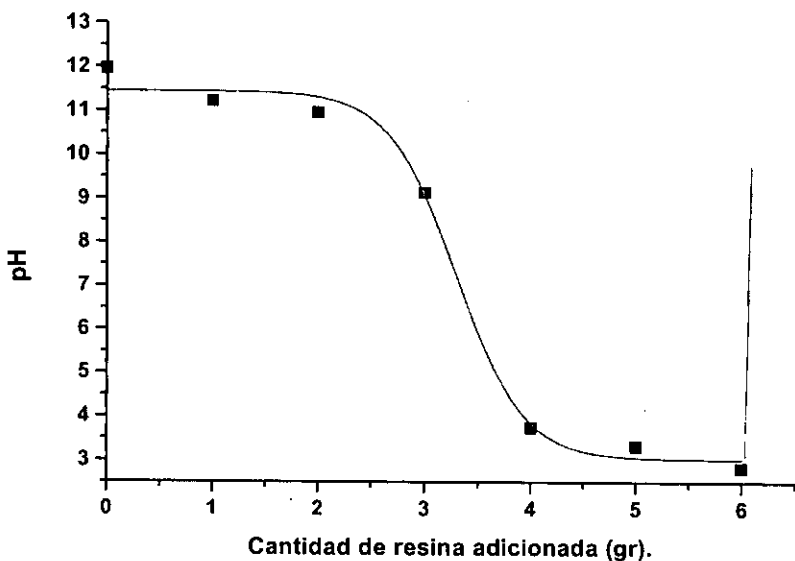


Figura 8. Variación del pH en función de la cantidad de resina adicionada. (manteniendo el volumen de metasilicato de sodio constante (10ml)).



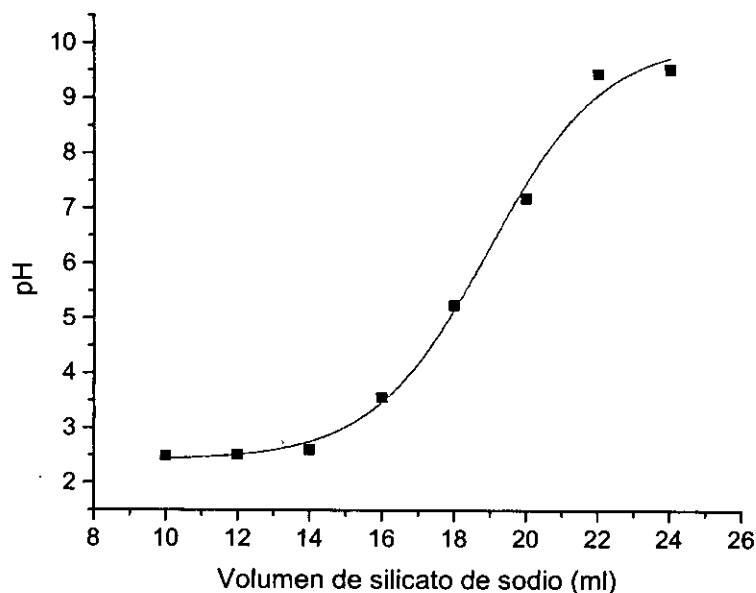


Figura 9. Variación del pH en función de la cantidad de silicato de sodio adicionado, manteniendo el peso de la resina constante (5gr).

V.2 Cristalización de 20 L-aminoácidos.

La cristalización de los diferentes 20 L-aminoácidos fue realizada con la finalidad de observar y determinar si la estructura espacial de los cristales de éstos, estaba de alguna manera vinculada con la morfología observada en los biomorfos (Agregados Cristalinos de Morfología Inducida). Las diferentes técnicas utilizadas para la cristalización de éstos, estuvieron directamente relacionadas con las características fisicoquímicas de cada aminoácido como son la solubilidad, punto isoelectrico, etc. Las técnicas utilizadas fueron: difusión en fase vapor (gota colgante), difusión en geles de sílice basándose en la solubilidad diferencial en diferentes disolventes, la evaporación a temperatura ambiente y la evaporación lenta de soluciones saturadas. Las técnicas y condiciones utilizadas para cada aminoácido se encuentran resumidas en la siguiente tabla.



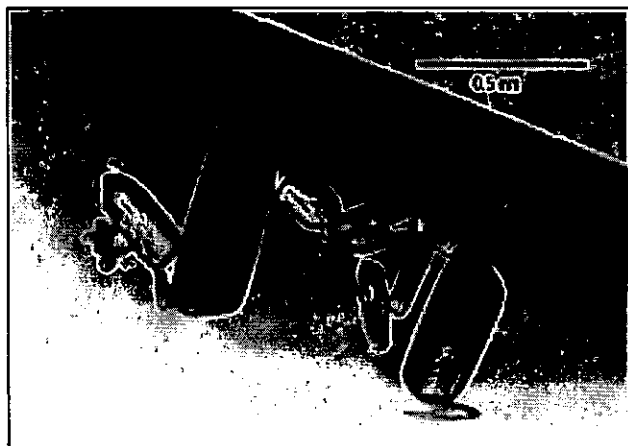
Aminoácido	Técnica utilizada en la cristalización.	Parámetros de cristalización
Alanina.	Evaporación lenta de una solución acuosa saturada.	83.5mg/ml. evaporación lenta a 18° C
Valina.	Evaporación a temperatura ambiente.	Disolución en agua a 58mg/ml. Evaporación del disolvente a temperatura ambiente.
Leucina.	Gota colgante.	10mg/ml Agente precipitante: EtOH 75%
Isoleucina.	Evaporación a temperatura ambiente.	Disolución en agua 18.5 mg/ml evaporación a temperatura ambiente.
Prolina.	Evaporación a temperatura ambiente.	200mg/ml 1:1 con piridina.
Fenilalanina.	Gota colgante.	30mg/ml. Agente precipitante: EtOH 75%
Triptofano.	Evaporación a temperatura ambiente.	100mg/ml en NaOH 1M y acidulada con HCl 1M y evaporada a T ambiente.
Metionina.	Crecimiento de cristales en geles de sílice.	Gel pH 6-7 Concentración real 50mg/ml. Precipitación por solubilidad diferencial en agua y EtOH.
Glicina.	Crecimiento de cristales en geles de sílice.	Gel pH 6-7 Concentración real 50mg/ml. Precipitación por solubilidad diferencial en agua y EtOH.
Serina.	Crecimiento de cristales en geles de sílice.	Gel pH 6-7 Concentración real 50mg/ml. Precipitación por solubilidad diferencial en agua y EtOH.
Treonina.	Crecimiento de cristales en geles de sílice.	Gel pH 6-7 Concentración real 50mg/ml. Precipitación por solubilidad diferencial en agua y EtOH.
Cisteína.	Gota colgante	Solución a 2 mg/ml. agente precipitante: PEG-6000, 20% y 5%
Tirosina.	Evaporación lenta a temperatura ambiente.	Khawas,B. 1969
Asparagina.	Crecimiento de cristales en geles de sílice.	Gel pH 6-7 Concentración real 50mg/ml. Precipitación por solubilidad diferencial en agua y EtOH.
Glutamina.	Gota colgante.	Solución a 5mg/ml agente precipitante: EtOH 80%
Ac. Aspártico	Gota colgante.	Solución a 6mg/ml Agente precipitante PEG 6000 al 5%
Ac. Glutámico	Disolución en HCl 20% y evaporación lenta a 40°C.	Dawson,B. 1953
Arginina.	Evaporación a temperatura ambiente de una solución en etanol.	Dow, L.1970
Lisina.	Evaporación a temperatura ambiente.	Wright, D. 1962.
Histidina.	Gota colgante.	Solución a 50mg/ml Agente precipitante EtOH 60%

Tabla 3. Condiciones de cristalización para cada uno de los diferentes L-aminoácidos.

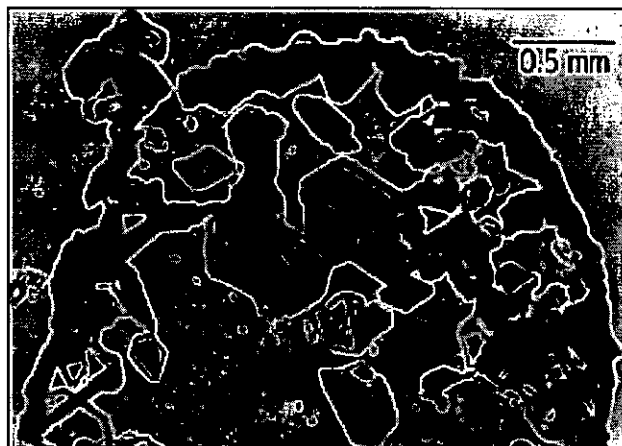
La primer columna corresponde al nombre de cada uno de los aminoácidos, la segunda a la técnica utilizada en su cristalización y la tercera a los parámetros de cristalización (en las secciones en las que se menciona la cita bibliográfica corresponde a los aminoácidos que no se cristalizaron, manteniéndose la cita del autor original).



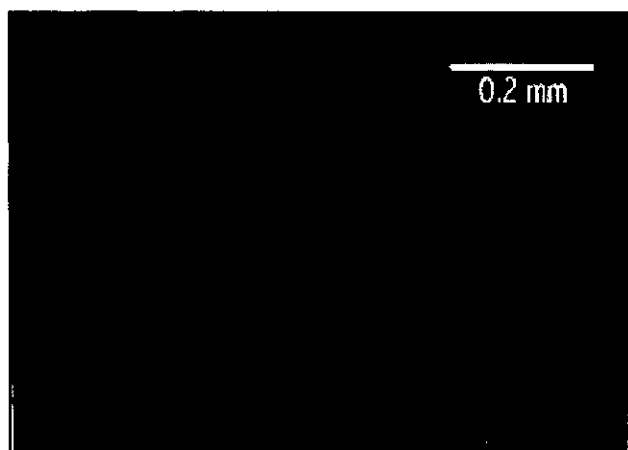
Registro fotográfico de cristales de aminoácidos.



Alanina (evaporación)



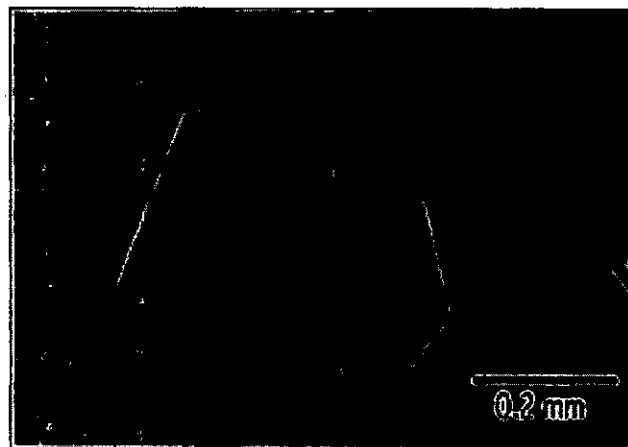
Valina (evaporación)



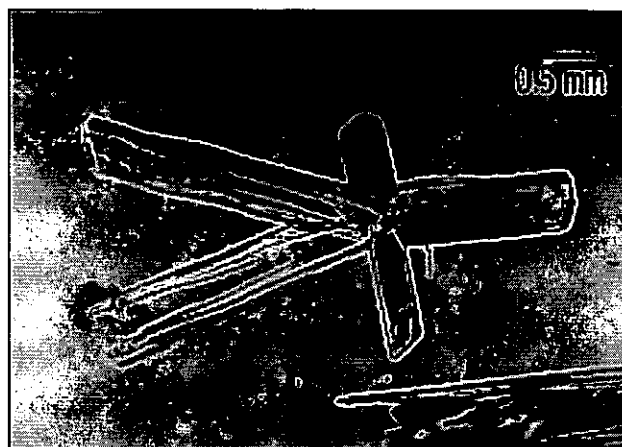
Leucina (gota colgante)



Isoleucina (evaporación)

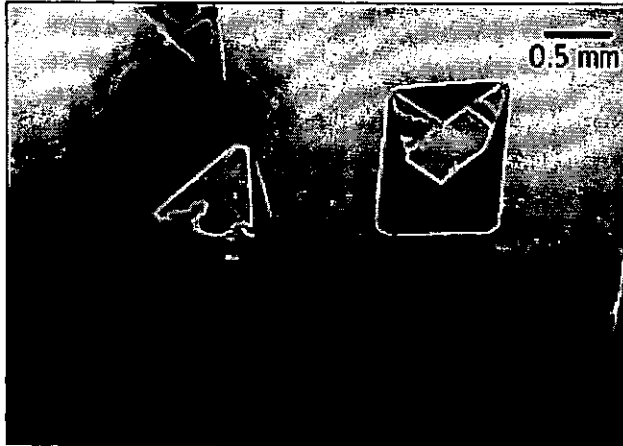


Fenilalanina (gota colgante)

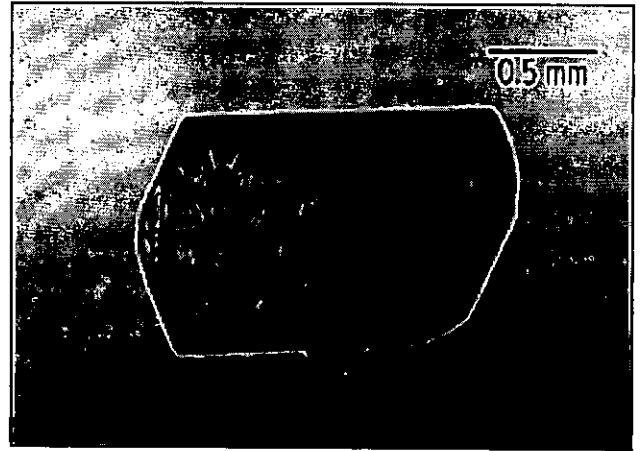


Metionina (geles de sílice)

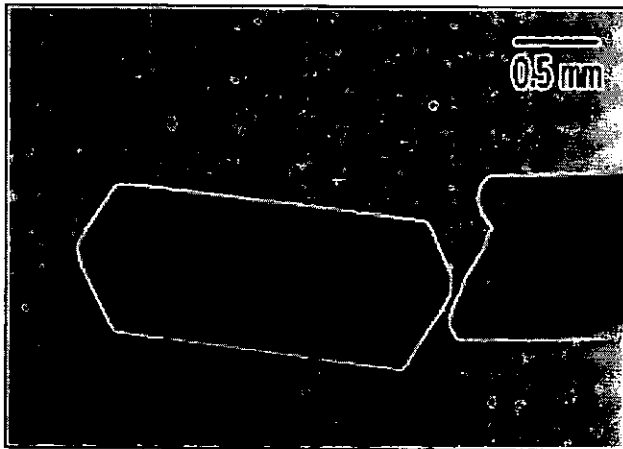




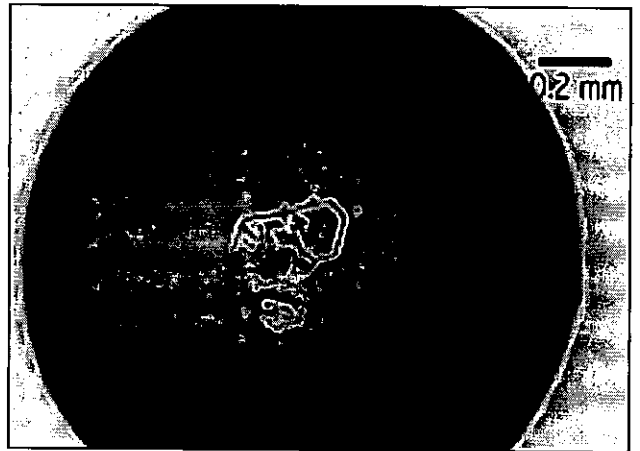
Glicina (geles de sílice)



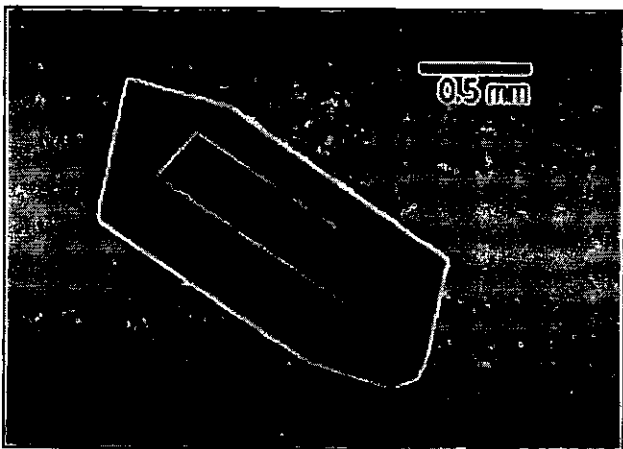
Serina (geles de sílice)



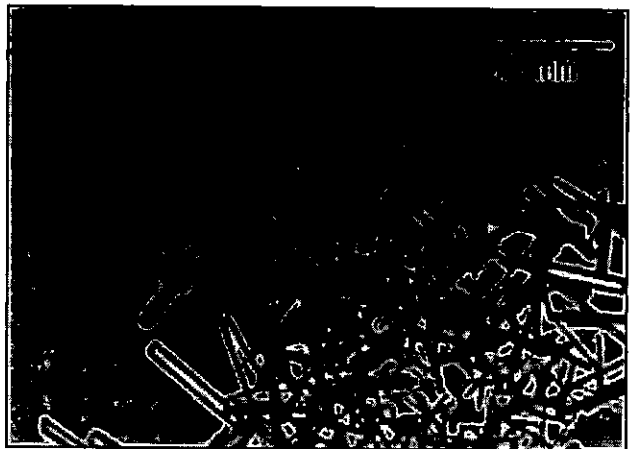
Treonina (geles de sílice)



Cisteina (gota colgante)



Asparagina (geles de sílice)

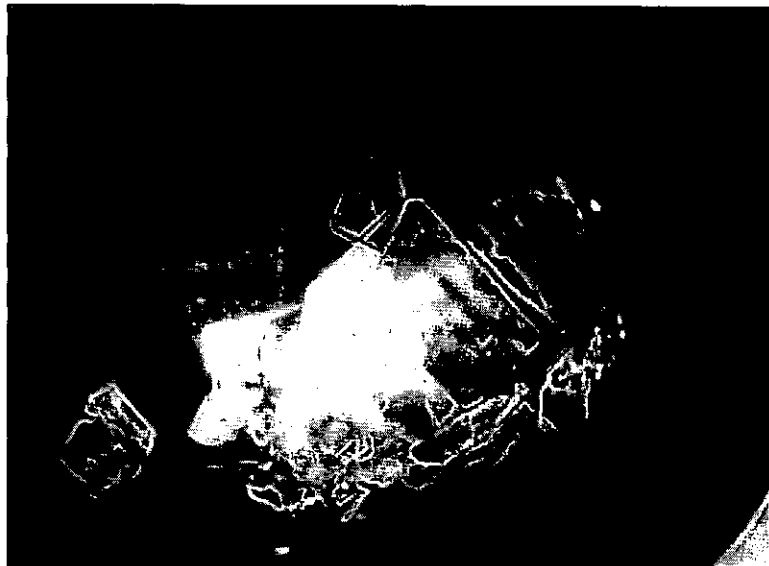


Glutamina (gota colgante)





Acido Aspártico (gota colgante)



Histidina (gota colgante)



V.3 La influencia de los 20 diferentes L-aminoácidos en la obtención de los agregados cristalinos de morfología inducida.

Los biomorfos de sílice o Agregados Cristalinos de Morfología Inducida (sección I.1.2) son precipitados inorgánicos auto-organizados, resultado de un proceso de agregación de cristales, el cual consiste de dos fases claramente distinguibles: una amorfa, formada por una membrana de metal silicato poco definida bajo análisis de rayos X, y otra fase cristalina de carbonato de un metal alcalinotérreo, resultando un silicocarbonato del metal empleado (Moreno, 1998). Estos despliegan propiedades morfológicas y simétricas similares a las observadas en los seres vivos, y se forman bajo condiciones fisico-químicas similares a algunas condiciones geoquímicas, que se han sugerido para la precipitación química de precursores de cherts Precámbricos (García-Ruiz, 1993), de igual manera se ha considerado que éste tipo de sistemas pueden considerarse como un análogo a la cristalización natural. Dadas éstas características, los IMCA pueden ser utilizados de igual manera para el desarrollo de nanocompuestos y biomateriales con propiedades especiales y con diversas aplicaciones, así como para un mejor entendimiento de los procesos de biomineralización natural geológica y/o biológica (tanto natural como patológica, como es el caso de los cálculos biliares y renales) por lo que es de gran importancia conocer la influencia de diferentes moléculas orgánicas sobre el patrón morfogenético de éste tipo de agregados, tales como los L-aminoácidos los cuales son los pilares en la formación de las proteínas.

A continuación se presentan los resultados de la influencia de los diferentes L-aminoácidos sobre el patrón morfogenético de los IMCA a nivel morfológico a los diferentes valores de pH. Una tabla de abreviaturas y un glosario con una descripción mas detallada de las diferentes morfologías típicas de los IMCA puede consultarse en el **apéndice "A"**.

Resultados experimentales obtenidos a pH 8

Sin Aminoácido

Estructuras de dendríticas a esferulíticas en función del avance del patrón de difusión y de precipitación, en función del tiempo las estructuras esferulíticas sirven de "esqueleto" para que siga la precipitación de los silico-carbonatos sobre éstas, de tal manera que se obtienen estructuras de mamelonadas a pisolíticas que en su parte externa tienen un gran número de pequeñas espículas.



AMINOACIDOS CON GRUPOS R POLARES Y QUE NO TIENEN CARGA NETA.**Cisteina (Cys)**

Hay una inhibición en el crecimiento de los cristales, aunque en un principio en el patrón de precipitación aparecen dendritas y espículas conforme éste avanza pasa a un crecimiento esferulítico y de éste a estructuras mamelonadas y pisolíticas.

Glicina (Gly)

Se inhibió fuertemente la formación de los precipitados, a tal grado que solo se pudieron registrar estructuras hasta las 168 h, las cuales fueron generalmente dendríticas y posteriormente esferulíticas al parecer sobre las dendríticas.

Serina (Ser)

Predominancia de estructuras dendríticas muy delgadas y finas, conforme avanzó el patrón de precipitación éstas se volvieron más gruesas y poco bifurcadas.

Treonina (Thr)

Crecimiento netamente dendrítico, sirviendo de esqueleto para el crecimiento esferulítico sobre éstas en función del tiempo.

Asparagina (Asn)

Predominancia de estructuras dendríticas durante todo el patrón de precipitación.

Glutamina.(Gln)

Se vio fuertemente inhibido el crecimiento de cristales en los primeros días, observándose solo puntos de nucleación sobre el gel, en función del tiempo se observaron estructuras dendríticas fuertemente ramificadas y delgadas, terminando con la aparición de estructuras dendríticas gruesas.

Tirosina (Tyr)

Se observaron estructuras que van de dendríticas a dendríticas-esferulíticas y posteriormente a netamente esferulíticas en función del tiempo.

AMINOACIDOS CON GRUPOS R APOLARES Y QUE NO TIENE CARGA NETA**Alanina (Ala)**

El crecimiento va de dendrítico a dendrítico-esferulítico.

Valina (Val)

Crecimiento de dendrítico a dendrítico-esferulítico.

Leucina (Leu)

Crecimiento de dendrítico a dendrítico-esferulítico.



Isoleucina (Ile)

Estructuras netamente dendríticas de gran tamaño, en función del tiempo se dio la precipitación de microcristales en algunas de las puntas de las estructuras dendríticas, dando una apariencia pisolítica.

Prolina (Pro)

En un principio hubo una fuerte inhibición en el crecimiento de los agregados cristalinos, posteriormente aparecieron estructuras dendríticas de diferentes tamaños, y finalmente aparecieron estructuras dendríticas de gran tamaño y grosor, pero en un número bajo.

Fenilalanina (Phe)

Hay una fuerte inhibición en el desarrollo de las estructuras, posteriormente aparecieron estructuras aciculares de muy pequeño tamaño, dado por una lenta difusión en el gel.

Triptofano (Trp)

Se observó una fuerte inhibición en la precipitación, apareciendo solo algunas estructuras aciculares, conforme avanzó el patrón se observaron estructuras dendríticas de mayor tamaño, pasando posteriormente a dendrítico-esferulíticas.

Metionina (Met)

Fuerte inhibición en el patrón de precipitación, observándose solamente algunas estructuras aciculares muy pequeñas.

AMINOACIDOS CARGADOS NEGATIVAMENTE.**Ácido Aspártico (Asp)**

Se observó una fuerte inhibición en el patrón de precipitación, observándose solamente algunos centros de nucleación sobre el gel y un pobre crecimiento de éstos.

Ácido Glutámico.

Estructuras dendríticas de menor a mayor tamaño y complejidad en función del patrón de precipitación, pasando posteriormente a dendrítico-esferulítico y finalmente a netamente esferulítico.

AMINOACIDOS CARGADOS POSITIVAMENTE.**Arginina (Arg)**

Se observó una fuerte inhibición en patrón de precipitación durante las primeras horas, notándose solamente algunas estructuras dendríticas muy pequeñas, posteriormente se observaron estructuras dendríticas de mayor tamaño en función del patrón pero en un número bajo, y finalmente aparecieron estructuras dendrítico-esferulíticas a netamente esferulíticas.



Lisina (Lys)

Fuerte inhibición en el desarrollo de estructuras, observándose solamente algunas dendritas muy pequeñas, en función del tiempo aparecieron estructuras dendríticas de mayor tamaño y con grandes ramificaciones, para finalmente convertirse en estructuras dendrítico-esferulíticas y esferulíticas.

Histidina (His)

En un principio se observó una fuerte inhibición en el desarrollo de estructuras, haciéndose notar solamente algunas estructuras aciculares pequeñas, posteriormente se observaron estructuras dendríticas de mayor tamaño y complejidad, pasando a ser posteriormente de dendrítico-esferulítico a netamente esferulítico.

Resultados experimentales obtenidos a pH 9**Sin aminoácido.**

Hubo una rápida precipitación debido a una mayor velocidad de difusión, se observaron pequeñas estructuras dendrítico-esferulíticas y algunas otras netamente dendríticas. Conforme avanzó el patrón de difusión y de precipitación con el tiempo aparecieron estructuras del tipo de micas con un centro de crecimiento común las cuales iban de dendríticas a laminares con protuberancias en algunos vértices que generalmente fueron del tipo helicoidal.

Entre las últimas estructuras observadas aparecen unas de tipo cónico laminar a partir de un punto de crecimiento con 3 o 4 vértices. Así como la aparición de una serie de estructuras de gran complejidad sobre el gel, éstas con marcados "anillos de crecimiento o precipitación" con un gran parecido a las hifas septadas de algunos hongos o algo similar a algas filamentosas. Así mismo se pudieron observar algunas láminas no "septadas" a partir de las cuales crecen otras estructuras en formas de manos y dedos los cuales sí se encuentran septados.

AMINOACIDOS CON GRUPOS R POLARES Y QUE NO TIENEN CARGA NETA.**Cisteina (Cys)**

El crecimiento va de dendrítico a esferulítico-laminar, pasando después a micas concéntricas y por último un precipitado de micro espículas sobre las estructuras ya formadas dando apariencia del tipo mamelonado.

Glicina (Gly)

Estructuras marcadamente dendríticas y aciculares, con algún tipo de alineamiento en algunos puntos, conforme avanzó el patrón de precipitación aparecen estructuras esferulíticas sobre un esqueleto dendrítico.



Serina (Ser)

Se observaron estructuras dendríticas ahusadas de menor tamaño en la parte superior del patrón de precipitación, conforme éste avanzó aparecieron estructuras laminares y helicoidales irregulares y después laminas con una morfología más regular.

Treonina (Thr)

En la parte superior del patrón de precipitación se observaron estructuras del tipo dendrítico, conforme éste avanzó en el tiempo aparecieron estructuras dendrítico-esferulíticas y posteriormente únicamente esferulíticas. Así mismo se pudieron observar estructuras helicoidales irregulares a partir de un punto mutuo de crecimiento asemejando una morfología radial

Asparagina (Asn)

De crecimiento dendrítico a dendrítico-esferulítico, observándose la presencia de estructuras de forma helicoidal radial conforme avanzó el patrón de precipitación.

Glutamina.(Gln)

Se observó en un principio una precipitación en forma de dendritas de muy pequeño tamaño, posteriormente el crecimiento dendrítico se sigue dando pero ahora éstas de un mayor grosor asemejando espinas, de ahí el crecimiento pasa a ser del tipo dendrítico-esferulítico y termina siendo netamente esferulítico. Cabe mencionar la precipitación de pequeños cristales que envuelven la parte dendrítica en las últimas observaciones realizadas, dando apariencia mamelonada.

AMINOACIDOS CON GRUPOS R APOLARES Y QUE NO TIENE CARGA NETA**Alanina (Ala)**

Las morfologías van de dendrítico a esferulítico

Valina (Val)

Precipitación adoptando morfologías de dendrítico a esferulítico pasando por las fases intermedias.

Leucina (Leu)

Crecimiento de dendrítico a esferulítico pasando por las fases intermedias.

Isoleucina (Ile)

Estructuras de microdendríticas a dendríticas, conforme avanzó el patrón de difusión y precipitación, se observan estructuras esferulíticas y esferulíticas con proyecciones en algunos vértices.



Prolina (Pro)

En la parte superior del patrón de precipitación se observaron estructuras dendríticas, posteriormente a consecuencia del avance de éste, aparecieron estructuras dendrítico-esferulíticas para terminar con estructuras netamente esferulíticas al final del patrón.

Fenilalanina (Phe)

En la parte superior del patrón de precipitación aparecieron estructuras aciculares y dendríticas de muy pequeño tamaño, posteriormente, estructuras dendrítico-esferulíticas y estructuras aciculares de gran grosor, radiales, y con un punto mutuo de crecimiento y caras bien definidas.

Triptofano (Trp)

Estructuras de dendrítico a dendrítico-esferulíticas en función del patrón de precipitación, posteriormente se observaron algunas láminas y hélices irregulares, siendo la excepción algunas estructuras regulares.

Metionina (Met)

Se observaron estructuras dendríticas y aciculares de diferente grosor, conforme el patrón de precipitación avanzó, se observaron estructuras de dendríticas a dendríticas-esferulíticas.

AMINOACIDOS CARGADOS NEGATIVAMENTE.**Ácido Aspártico (Asp)**

En la primera parte del patrón de precipitación se observaron estructuras aciculares, posteriormente láminas irregulares de gran complejidad, así como estructuras “metaméricas” en forma de hélices y algo similar a tentáculos (éstas últimas aparecieron después de un periodo de 84 días =2016 h).

Ácido Glutámico.

En la parte superior del patrón de precipitación, se observó una dominancia de estructuras dendríticas de tamaño muy pequeño, conforme éste avanzó se observaron estructuras helicoidales radiales y laminares radiales. Finalmente se observó una serie de estructuras de gran complejidad de forma laminar “septada o metamérica”.

AMINOACIDOS CARGADOS POSITIVAMENTE.**Arginina (Arg)**

Precipitación en un principio netamente dendrítico, en función del avance del patrón de precipitación aparecieron estructuras cristalinas con caras bien definidas y con un centro mutuo de crecimiento, y finalmente estructuras laminares y helicoidales radiales irregulares. 84 días



después del comienzo de la reacción se observaron estructuras con anillos de crecimiento o precipitación de forma laminar “septado”.

Lisina (Lys)

Estructuras netamente dendríticas y aciculares, estructuras cristalinas con caras bien definidas y concéntricas, finalmente se observaron estructuras helicoidales radiales irregulares.

Histidina (His)

Precipitación en un principio netamente dendrítico, en función del avance del patrón de precipitación aparecieron estructuras cristalinas con caras bien definidas y con un centro mutuo de crecimiento, y finalmente estructuras laminares y helicoidales radiales irregulares.

84 días después del comienzo de la reacción se observaron estructuras con anillos de crecimiento o precipitación de forma laminar “septado”.

Resultados experimentales obtenidos a pH 10

Sin aminoácido

Se observó la formación de laminas irregulares junto con hélices pequeñas, conforme avanzó el patrón de precipitación aparecieron micas concéntricas poco regulares y posteriormente un amplio dominio de estructuras helicoidales, con algún tipo de alineamiento en algunos puntos.

AMINOACIDOS CON GRUPOS R POLARES Y QUE NO TIENEN CARGA NETA.

Cisteina (Cys)

Láminas irregulares con un punto mutuo de crecimiento, pequeñas micas irregulares, conforme avanzó el patrón de precipitación el dominio es de formas helicoidales observándose un marcado alineamiento.

Glicina (Gly)

Pequeñas estructuras concéntricas de aciculares a laminares, después aparecieron láminas de gran complejidad unidas a estructuras helicoidales de longitud variable, así como un superenrollamiento un tanto laxo en algunos puntos de éstas últimas.

Serina (Ser)

Se observaron estructuras dendrítico-esferulíticas de tamaño muy pequeño, seguido por hélices y láminas irregulares, para terminar con hélices y láminas más regulares.

Treonina (Thr)

Estructuras de dendrítico-esferulítico a laminar irregular terminando con una zona laminar y helicoidal regular.



Asparagina (Asn)

En la parte superior del patrón se observaron estructuras helicoidal radial, seguidos de láminas pequeñas más o menos irregulares, mientras que en la parte más baja se formaron estructuras helicoidales de gran longitud y con un gran enrollamiento.

Glutamina.(Gln)

Se observaron un gran número de puntos de nucleación, así como láminas y estructuras helicoidales más o menos irregulares, éstas últimas aparecieron en un principio con un bajo enrollamiento, conforme avanzó el patrón las láminas y las hélices fueron más regulares.

Tirosina (Tyr)

Se observaron estructuras laminares pequeñas y en bajo número en la primera parte del patrón de difusión o transporte, conforme éste avanzó se observaron estructuras helicoidales regulares de gran longitud y enrolamiento.

AMINOACIDOS CON GRUPOS R APOLARES Y QUE NO TIENE CARGA NETA**Alanina (Ala)**

Estructuras del tipo helicoidal radial y láminas concéntricas se observan en la parte superior del patrón, posteriormente láminas irregulares, para finalmente encontrar láminas y estructuras helicoidales regulares.

Valina (Val)

En la parte superior del patrón de precipitación se observan estructuras algo semejantes a la morfología helicoidal radial, éstas posteriormente dan paso a láminas y estructuras helicoidales irregulares, y finalmente a láminas regulares y estructuras helicoidales superenrolladas de gran longitud.

Leucina (Leu)

Morfología helicoidal radial y láminas concéntricas son las estructuras observadas en la parte superior del patrón, posteriormente estas dan paso a láminas irregulares y éstas a su vez a láminas y estructuras helicoidales regulares.

Isoleucina (Ile)

Estructuras laminares y helicoidales regulares de menor a mayor tamaño en función del patrón de precipitación, en la parte mas baja de éste se observaron estructuras helicoidales que crecieron apartir de algunos vértices de las láminas.

Prolina (Pro)

Estructuras laminares y helicoidales regulares, una serie de estructuras helicoidales crecieron en función del tiempo a partir de algunos vértices de las láminas.



Fenilalanina (Phe)

Estructuras en forma de hélices y láminas de irregulares a regulares de gran tamaño y complejidad, puede observarse que el patrón de difusión y precipitación avanzó muy poco.

Triptofano (Trp)

Láminas y hélices de menor a mayor tamaño y de irregulares a regulares en función del avance del patrón de precipitación, el cual avanzó poco. Posteriormente se observaron estructuras laminares de gran complejidad con sucesivas bifurcaciones, asemejando estructuras fractales.

Metionina (Met)

En la parte superior del patrón se observaron estructuras helicoidal radial, seguidos de láminas pequeñas más o menos irregulares, mientras que en la parte más baja se formaron estructuras helicoidales y laminares regulares.

AMINOACIDOS CARGADOS NEGATIVAMENTE.**Ácido Aspártico (Asp)**

Estructuras laminares y helicoidales de irregulares a regulares, destacando un gran superenrollamiento de éstas últimas.

Ácido Glutámico. (Glu)

Prevalecieron estructuras laminares y helicoidales regulares en la mayor parte del patrón de precipitación, posteriormente se observaron estructuras laminares de gran complejidad con sucesivas bifurcaciones, asemejando estructuras fractales, así como un gran número de hélices.

AMINOACIDOS CARGADOS POSITIVAMENTE.**Arginina (Arg)**

Estructuras laminares regulares de menor a mayor tamaño en función del avance del patrón de precipitación, finalmente se observaron estructuras laminares con sucesivas bifurcaciones asemejando estructuras fractales.

Lisina (Lys)

Estructuras laminares regulares de menor a mayor tamaño, con un marcado alineamiento en algunos puntos, estructuras laminares de gran complejidad y con sucesivas bifurcaciones asemejando estructuras fractales, así como hélices regulares en menor número.

Histidina (His)

Estructuras laminares regulares de menor a mayor tamaño en función del avance del patrón de precipitación, finalmente se observaron algunas estructuras laminares con sucesivas bifurcaciones asemejando estructuras fractales.



V.4 Colección fotográfica de los patrones de crecimiento mineral.

Todo el registro fotográfico mostrado a continuación es de las estructuras mas representativas a los diferentes valores de pH y con la influencia de cada uno de los grupos de diferentes aminoácidos, no se trata de un registro a los mismos tiempos o localización del patrón de precipitación.

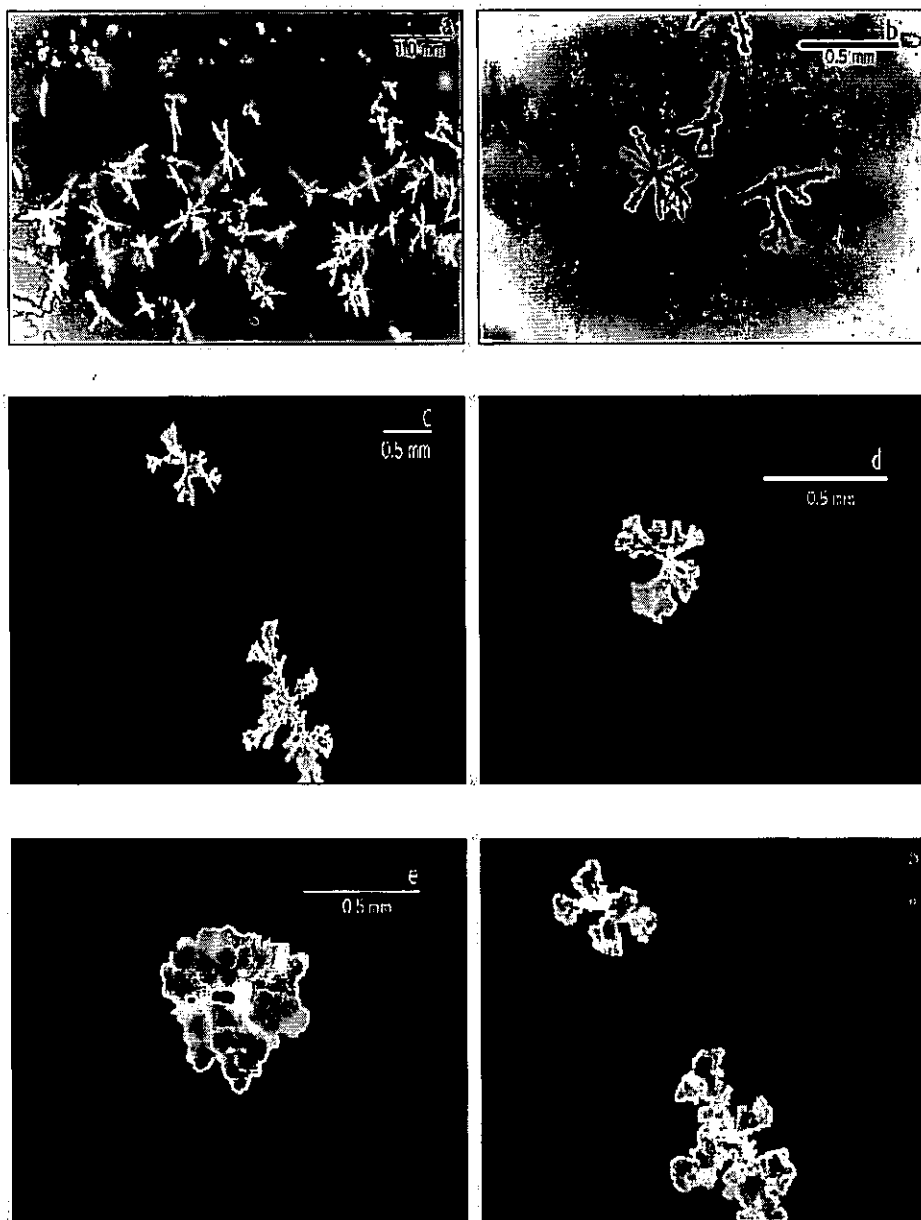


Fig. 10. Principales estructuras observadas a pH 8 sin presencia de aminoácido (sistema control).



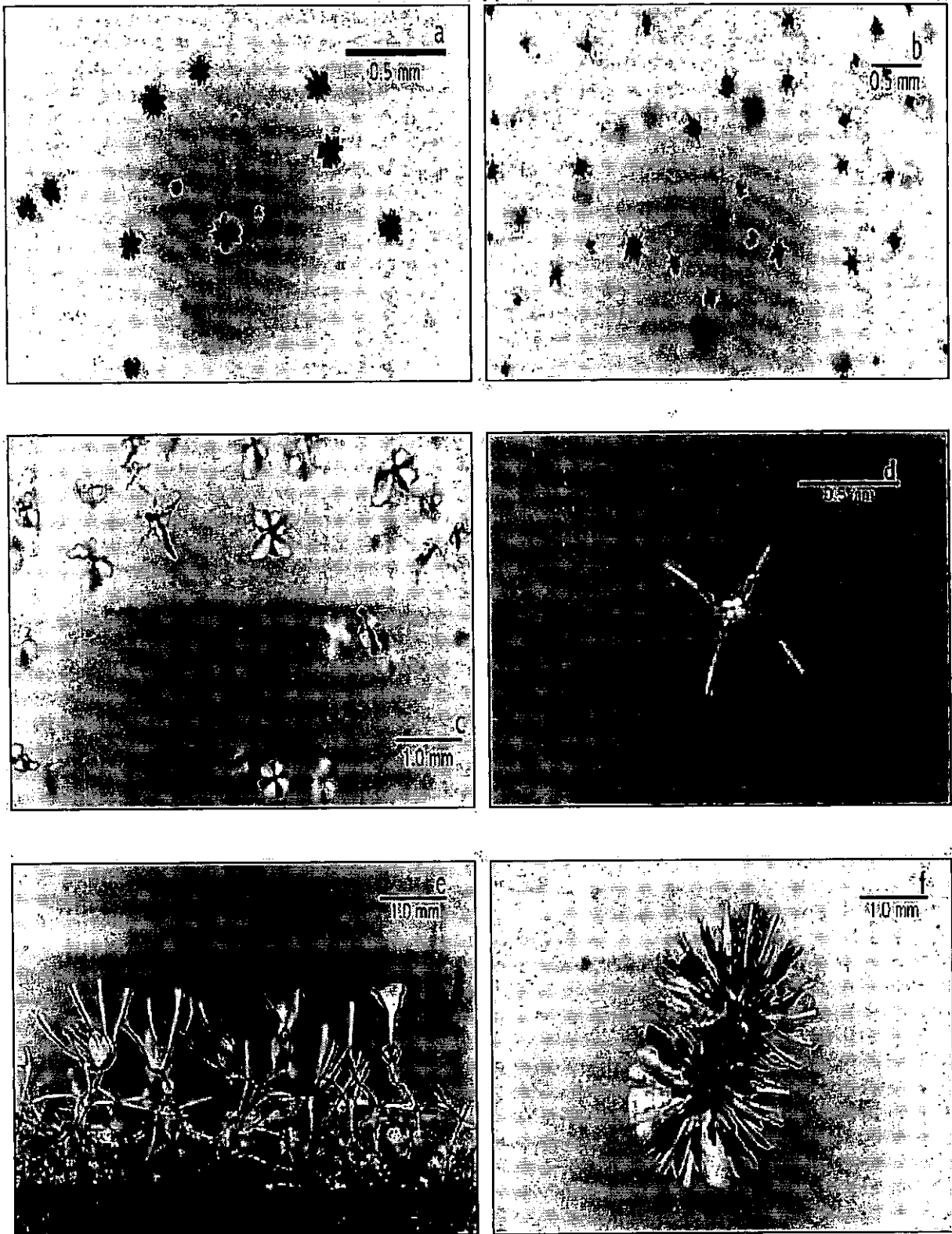


Fig. 11. Principales estructuras observadas a pH 9 sin presencia de aminoácido (sistema control).



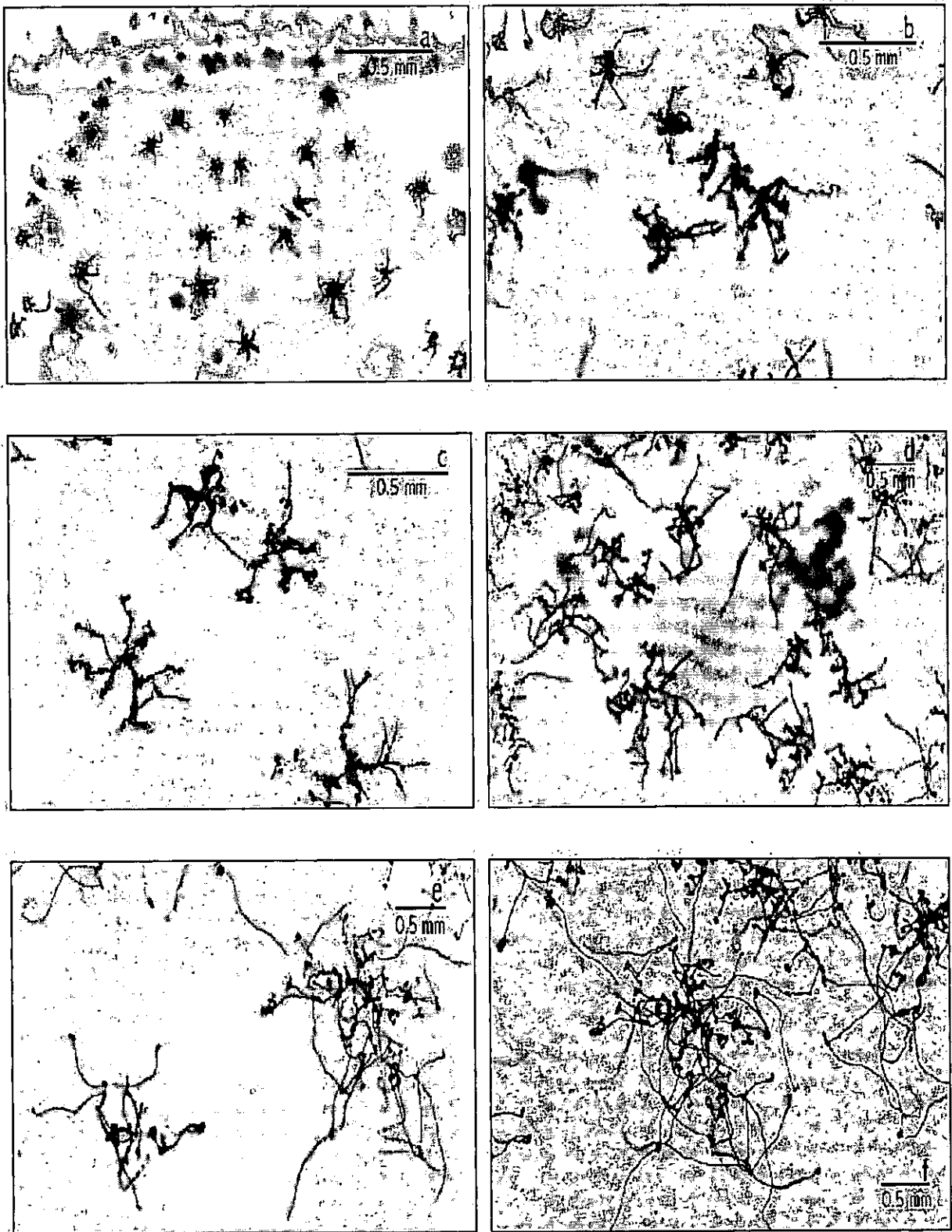


Fig. 12. Principales estructuras observadas a pH 10 sin presencia de aminoácido (sistema control).



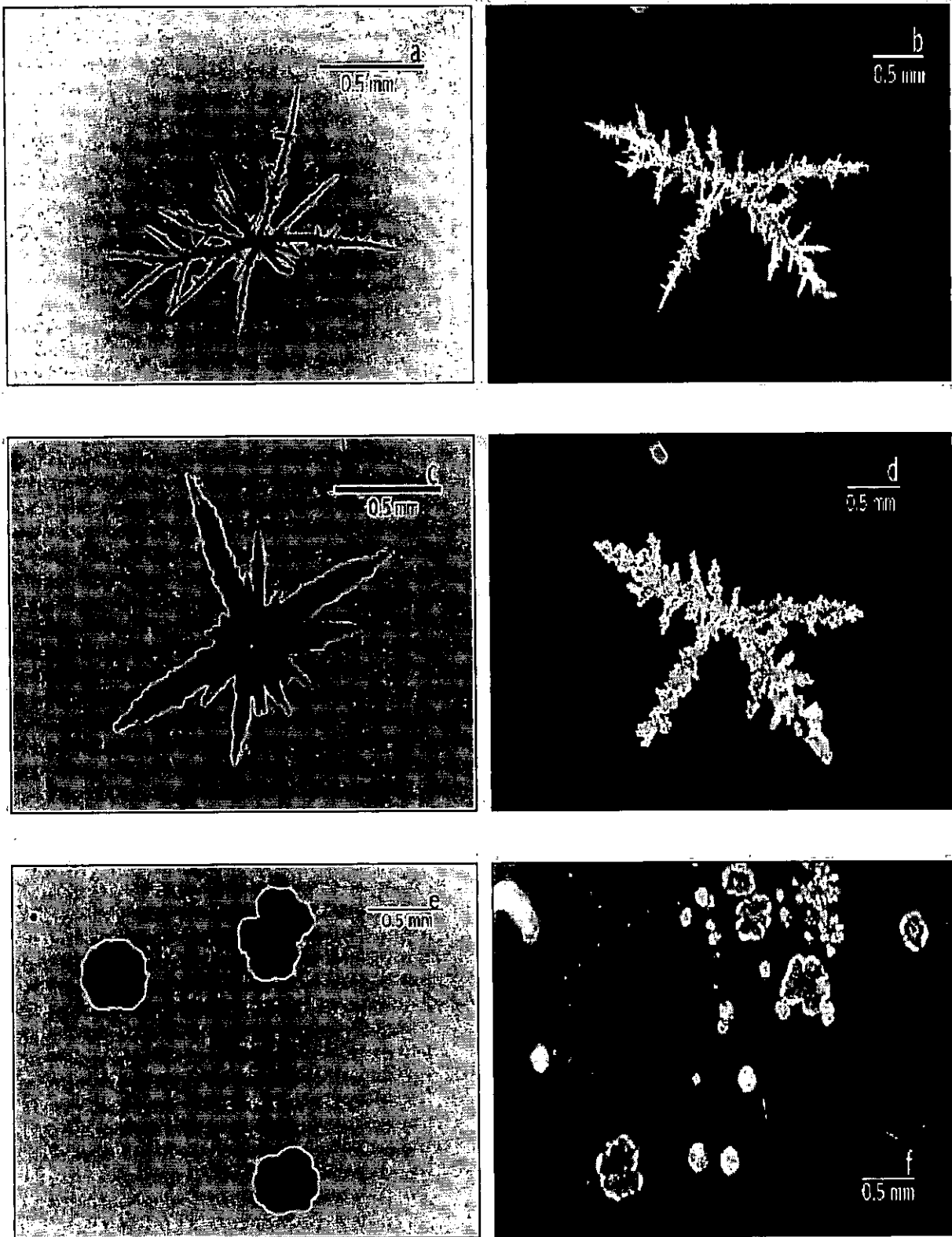


Fig. 13. Patrón morfogenético observado en presencia de aminoácidos con grupos R polares y sin carga neta a pH 8. a, b y d) Thr. c) Gln. e, f) Cys



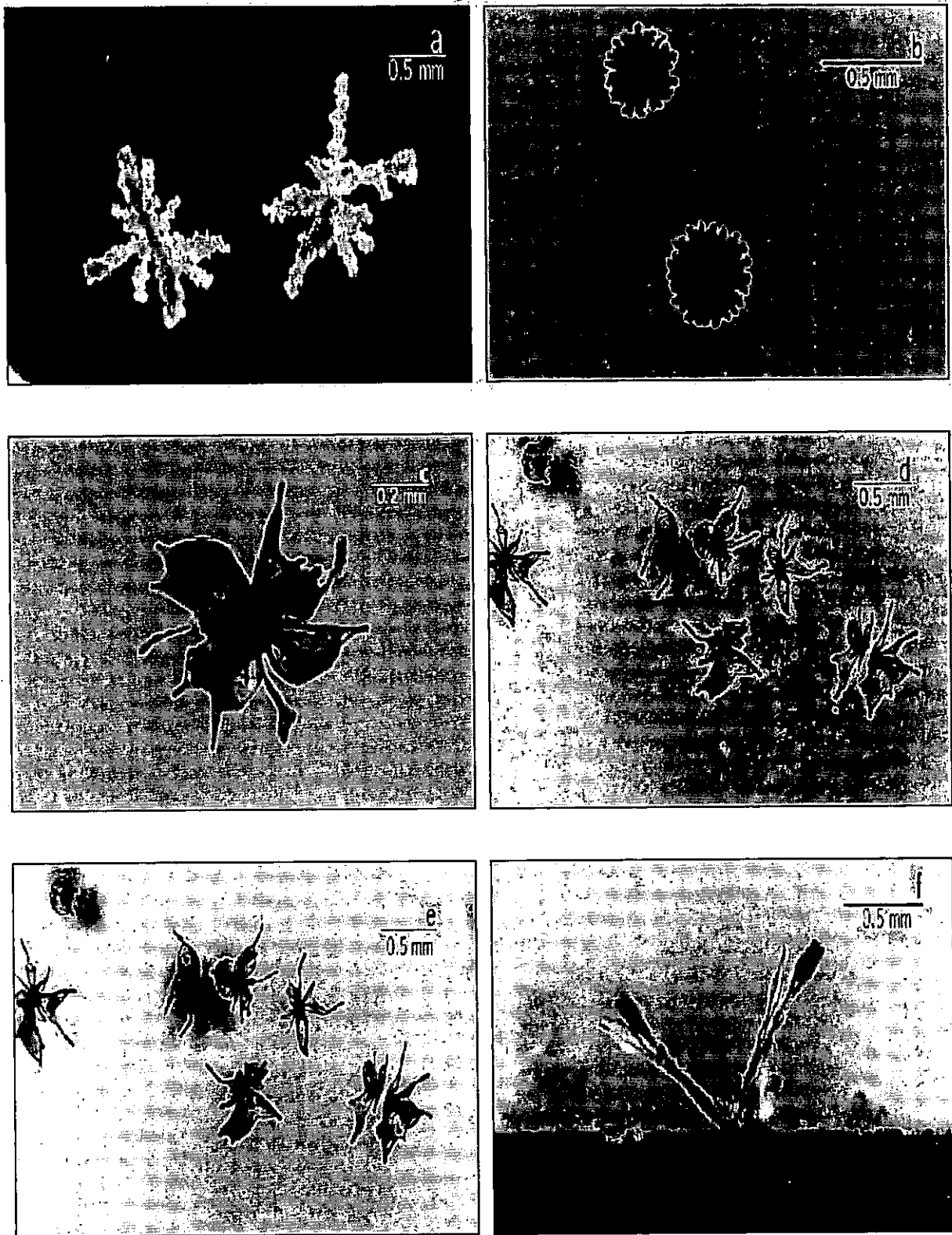


Fig. 14. Patrón morfogenético observado en presencia de aminoácidos con grupos R polares y sin carga neta a pH 9. a) Gly. b) Tyr. c, d y e) Cys. f) Ser.



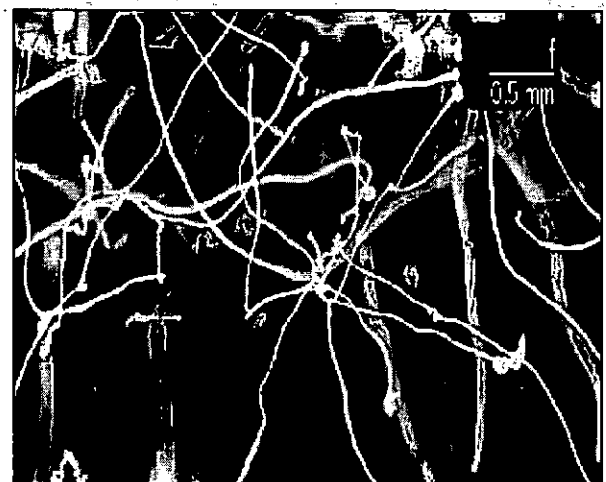
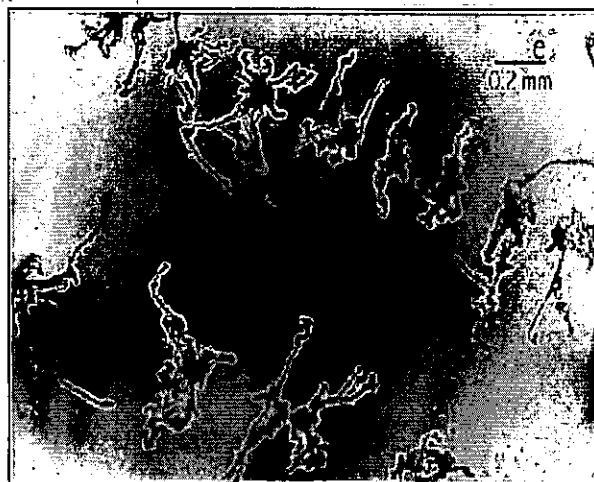
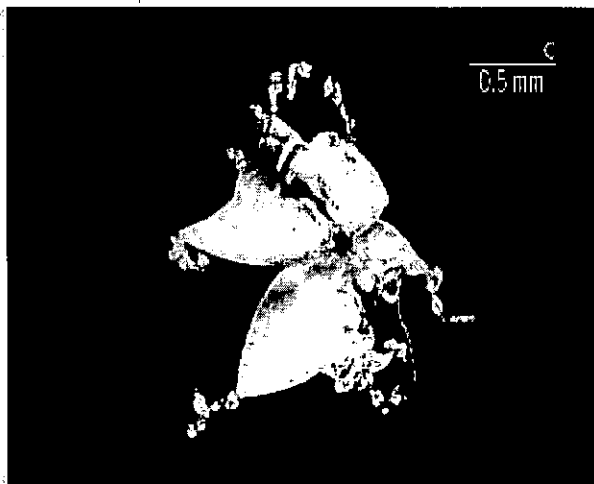
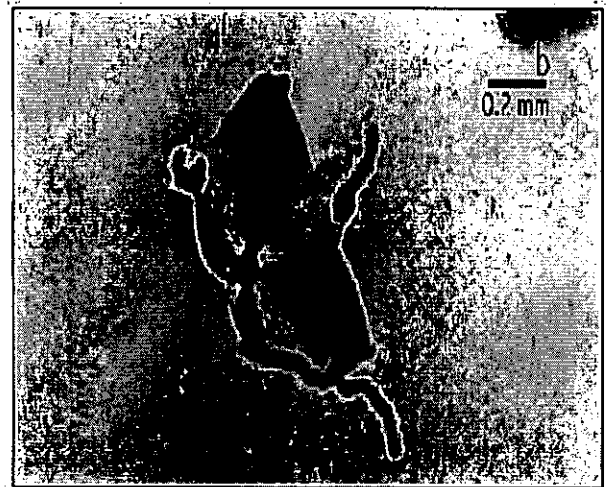


Fig. 15. Patrón morfogenético observado en presencia de aminoácidos con grupos R polares y sin carga neta a pH 10. a) Gln. b) Ser. c, d) Gly. e) Cys. f) Thr.



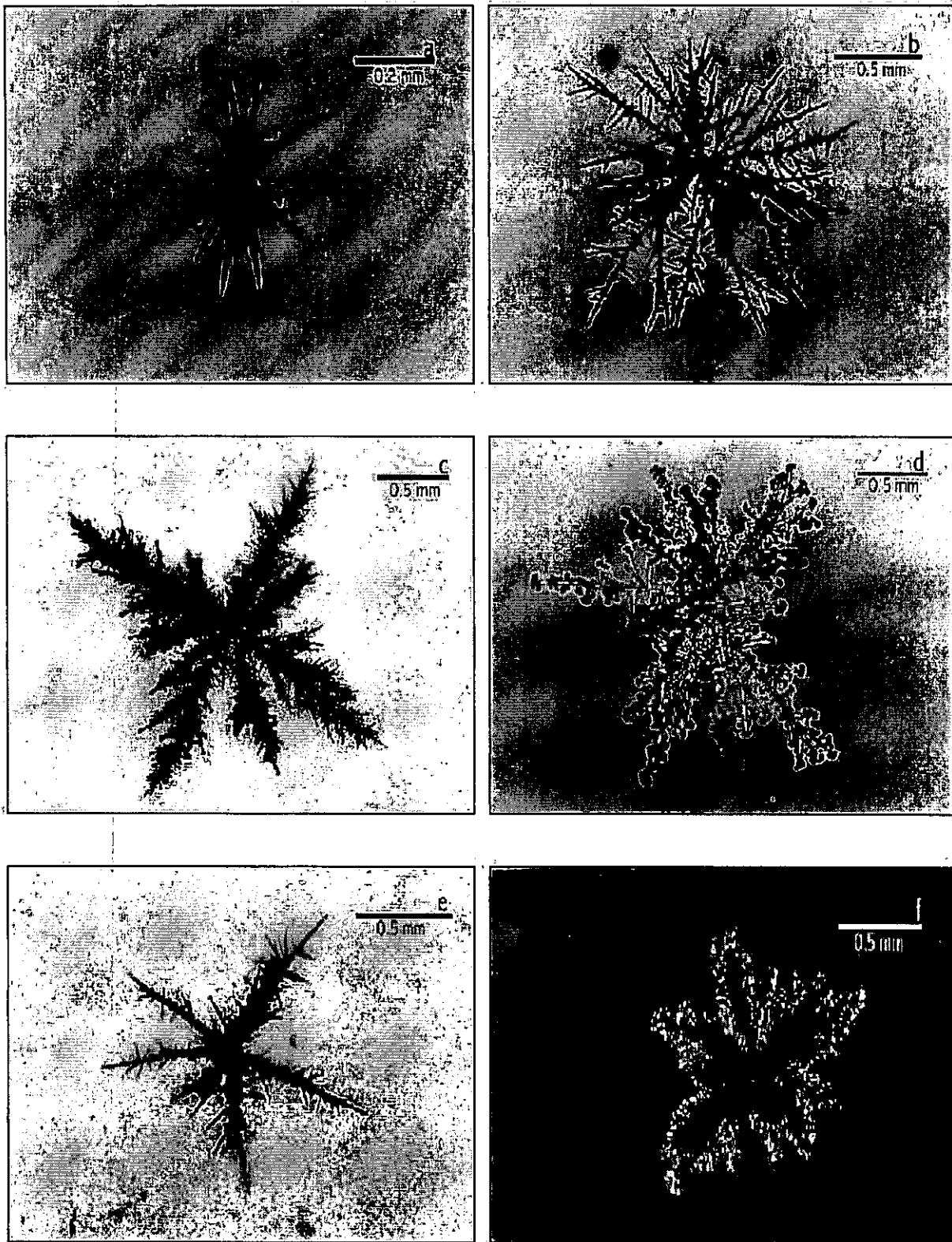


Fig. 16. Patrón morfogenético observado en presencia de aminoácidos con grupos R apolares y sin carga neta a pH 8. a) Met. b, d) Ile. c) Pro. e) Val. f) Trp.



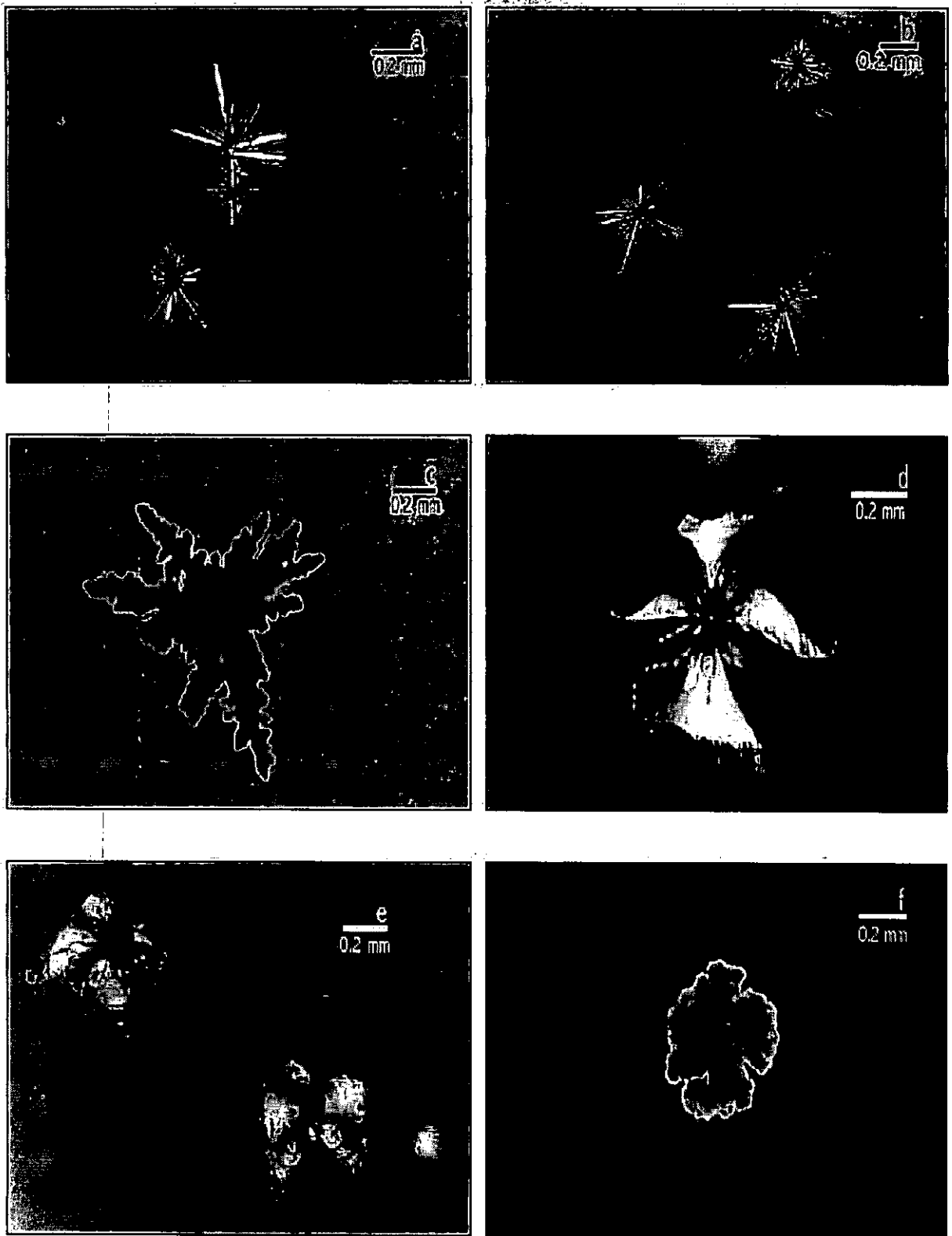


Fig. 17. Patrón morfológico observado en presencia de aminoácidos con grupos R apolares y sin carga neta a pH 9: a, b y c) Phe. d, e) Trp. f) Ile.



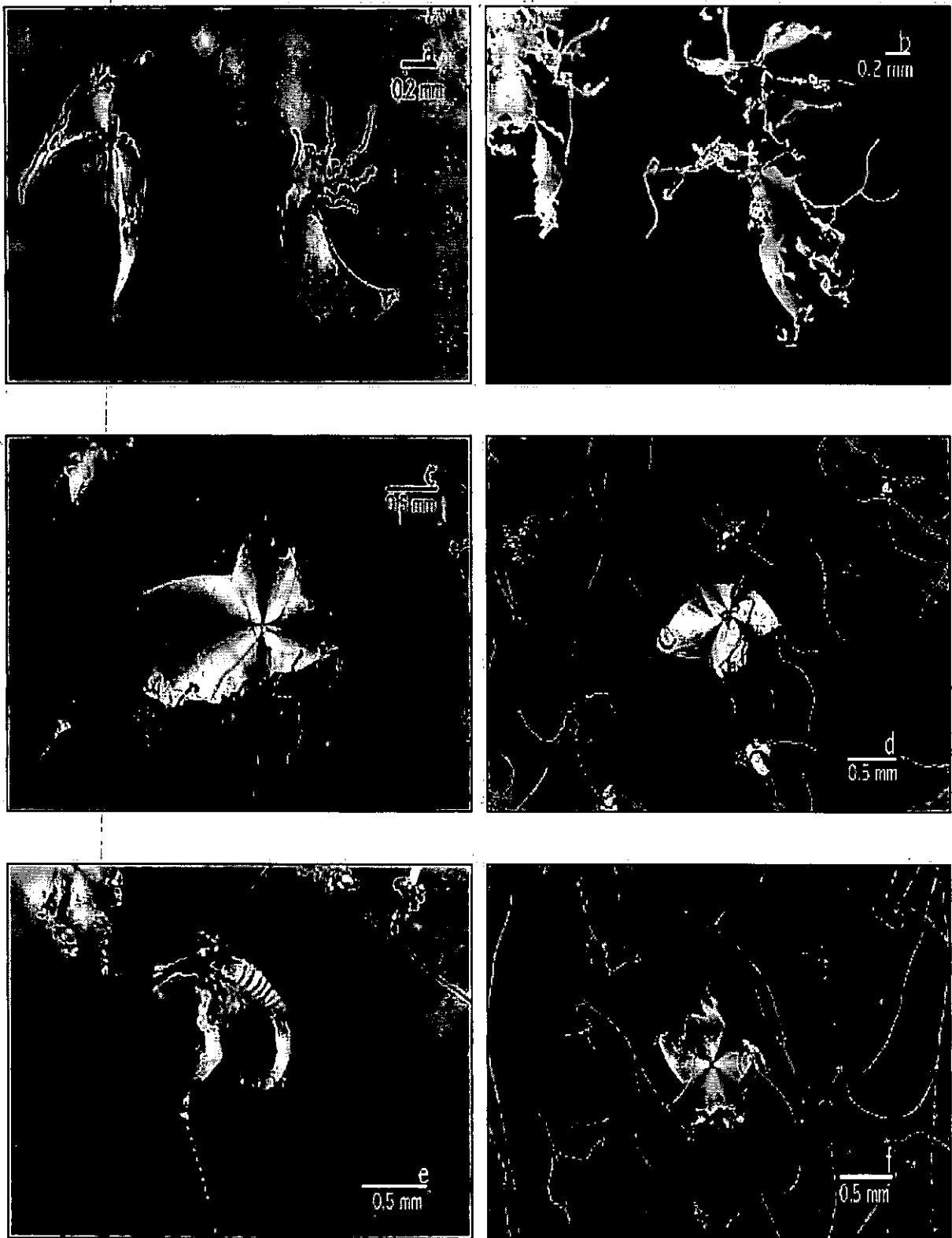


Fig. 18. Patrón morfogenético observado en presencia de aminoácidos con grupos R apolares y sin carga neta a pH 10. a, b) Trp. c) Ala. d,) Ile. e) Phe f) Val.



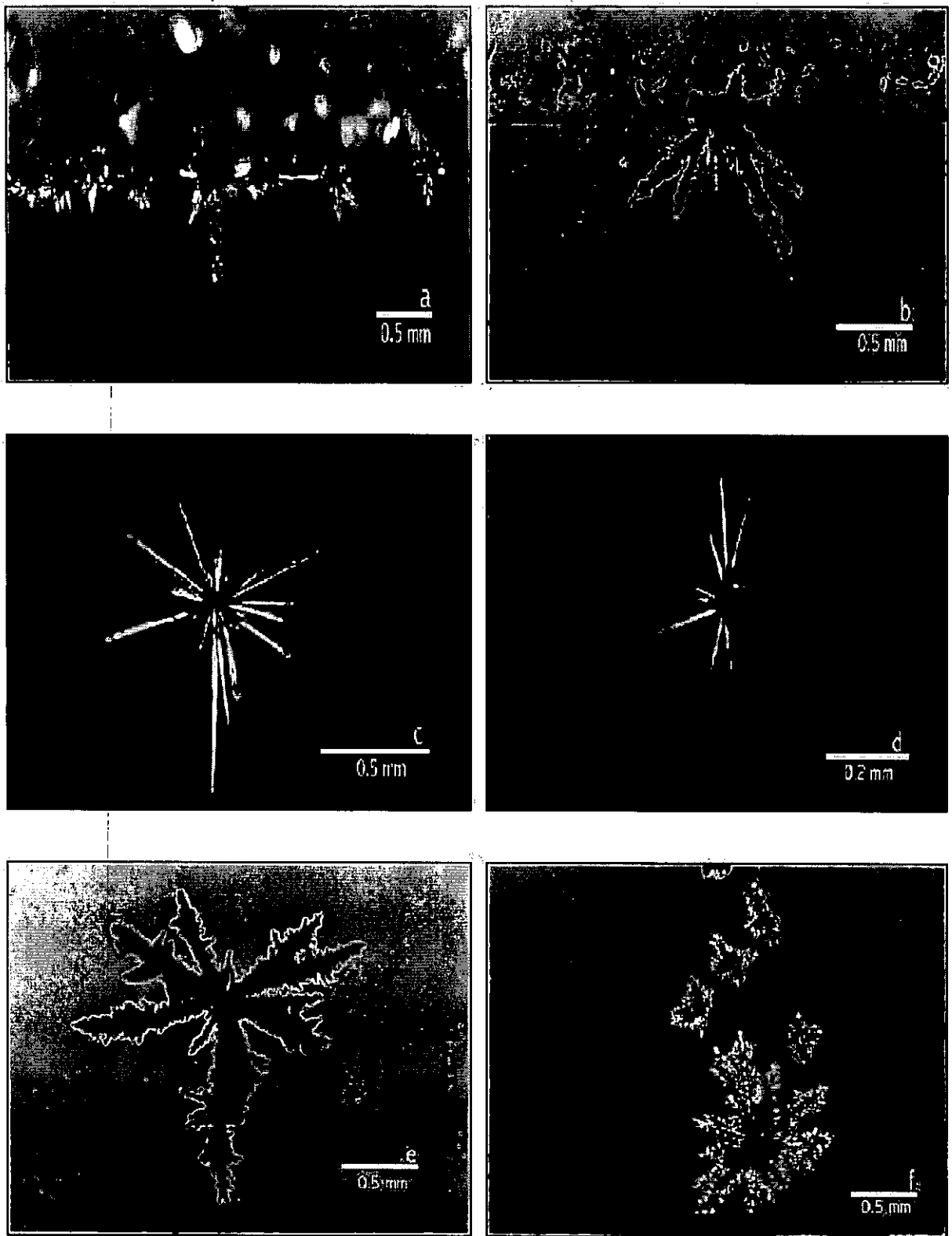


Fig. 19. Patrón morfo-genético observado en presencia de aminoácidos cargados negativamente. pH. 8. a, b) Asp. c, d, e, f) Glu.



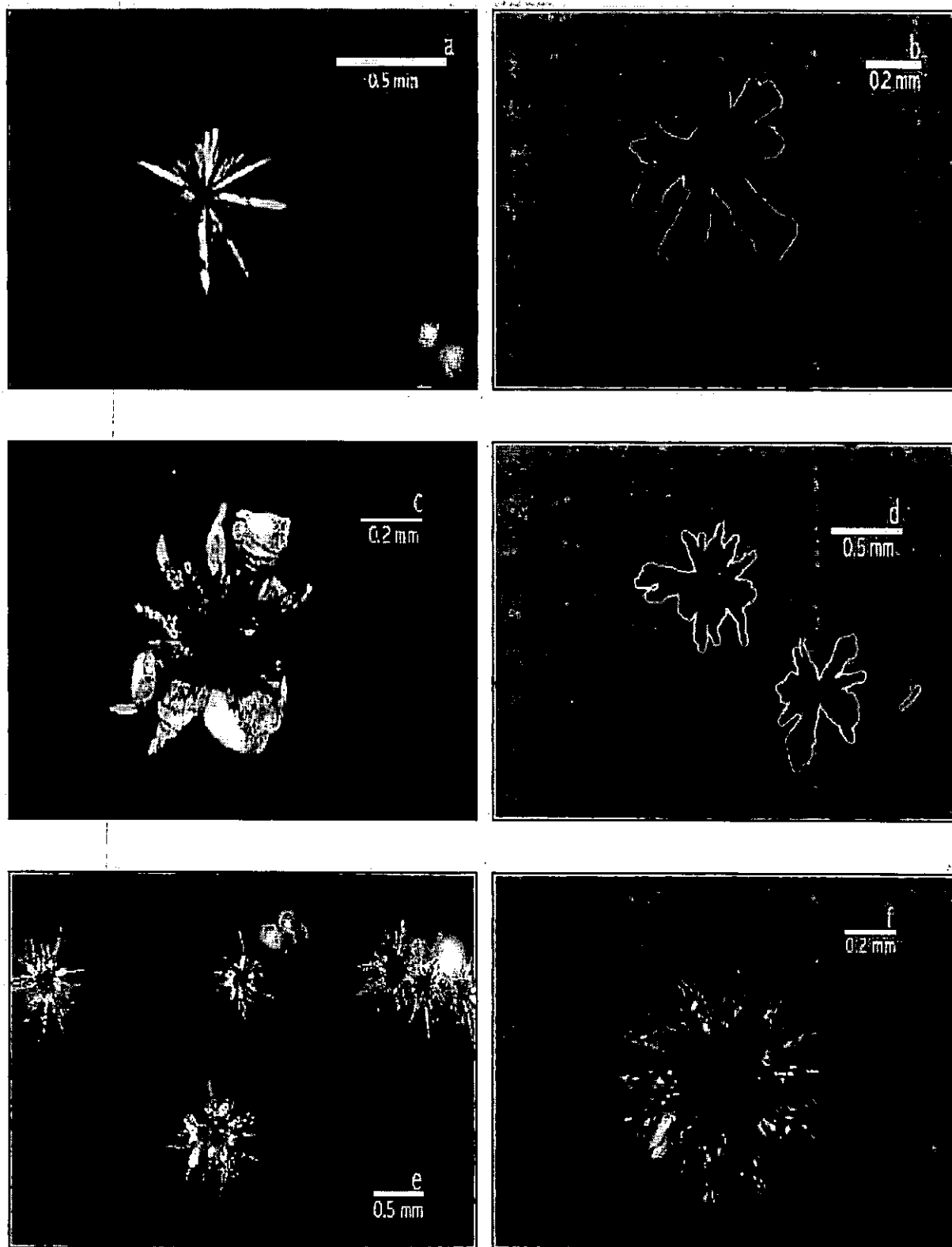


Fig. 20. Patrón morfogenético observado en presencia de aminoácidos cargados negativamente. pH. 9. a, b, c, d) Asp. e, f) Glu.



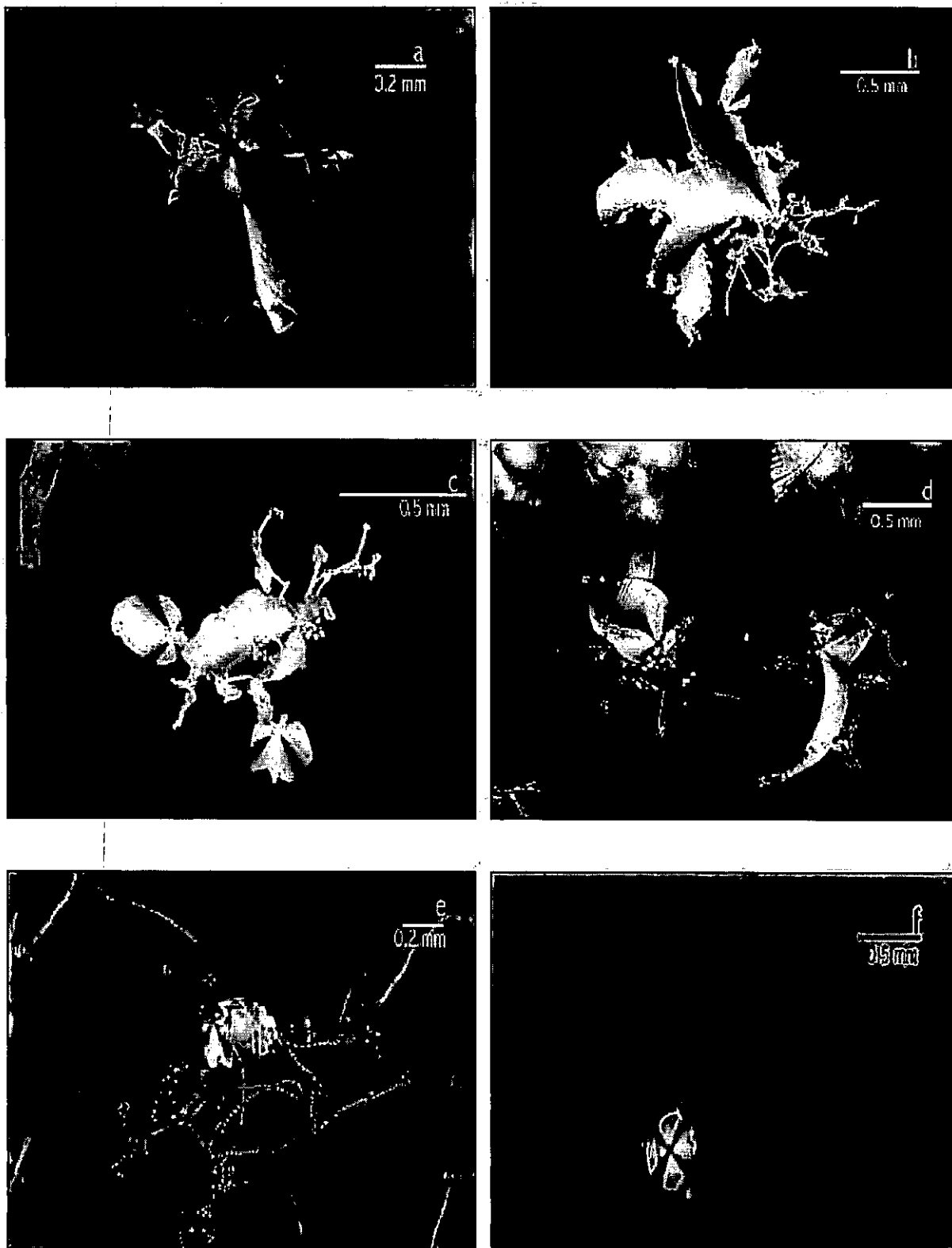


Fig. 21. Patrón morfo-genético observado en presencia de aminoácidos cargados negativamente. pH. 10. a, b, d, f) Glu. c y e) Asp.



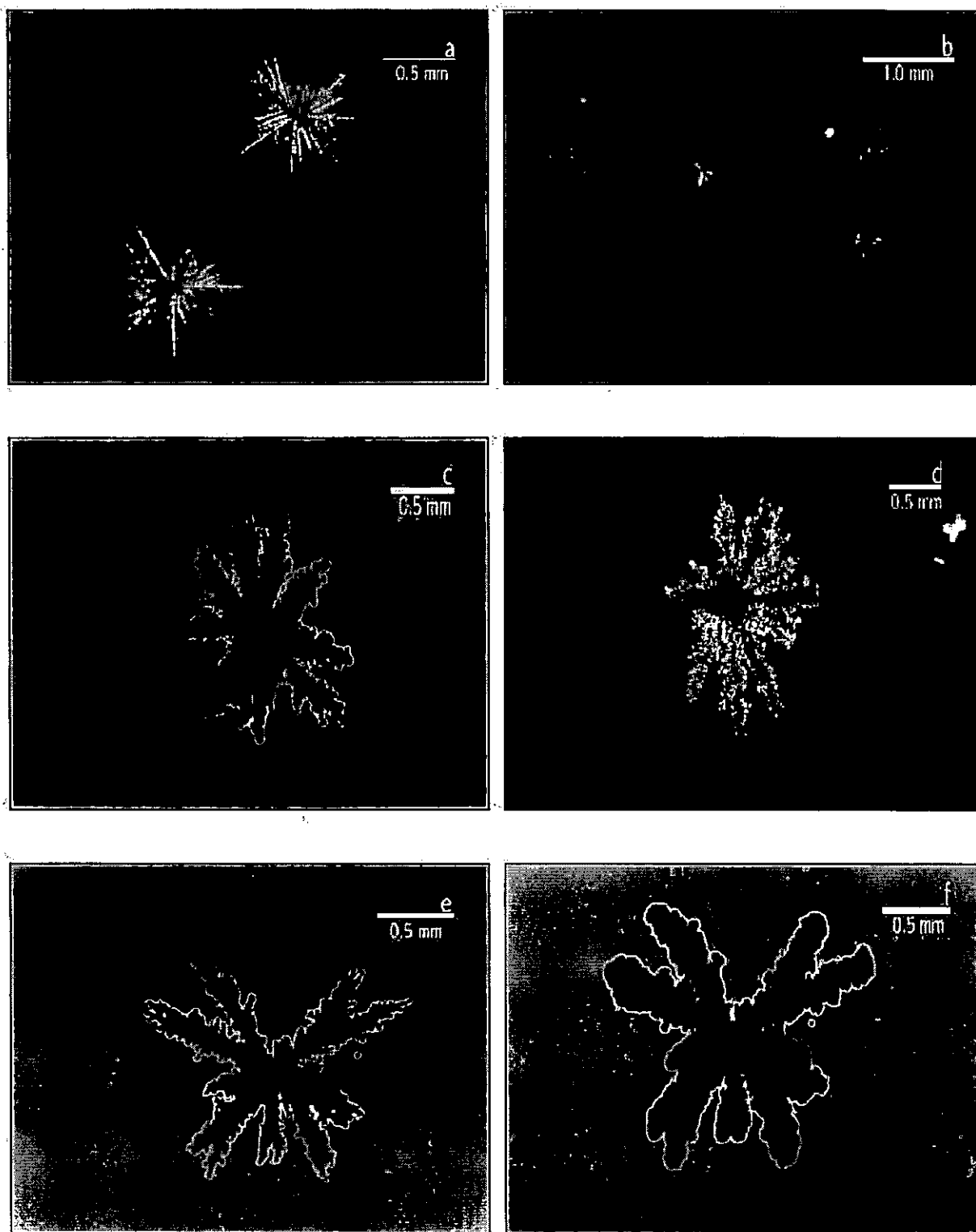


Fig. 22. Patrón morfo genético observado en presencia de aminoácidos cargados positivamente. pH 8. a, b) His. c, d) Arg. e y f) Lys.



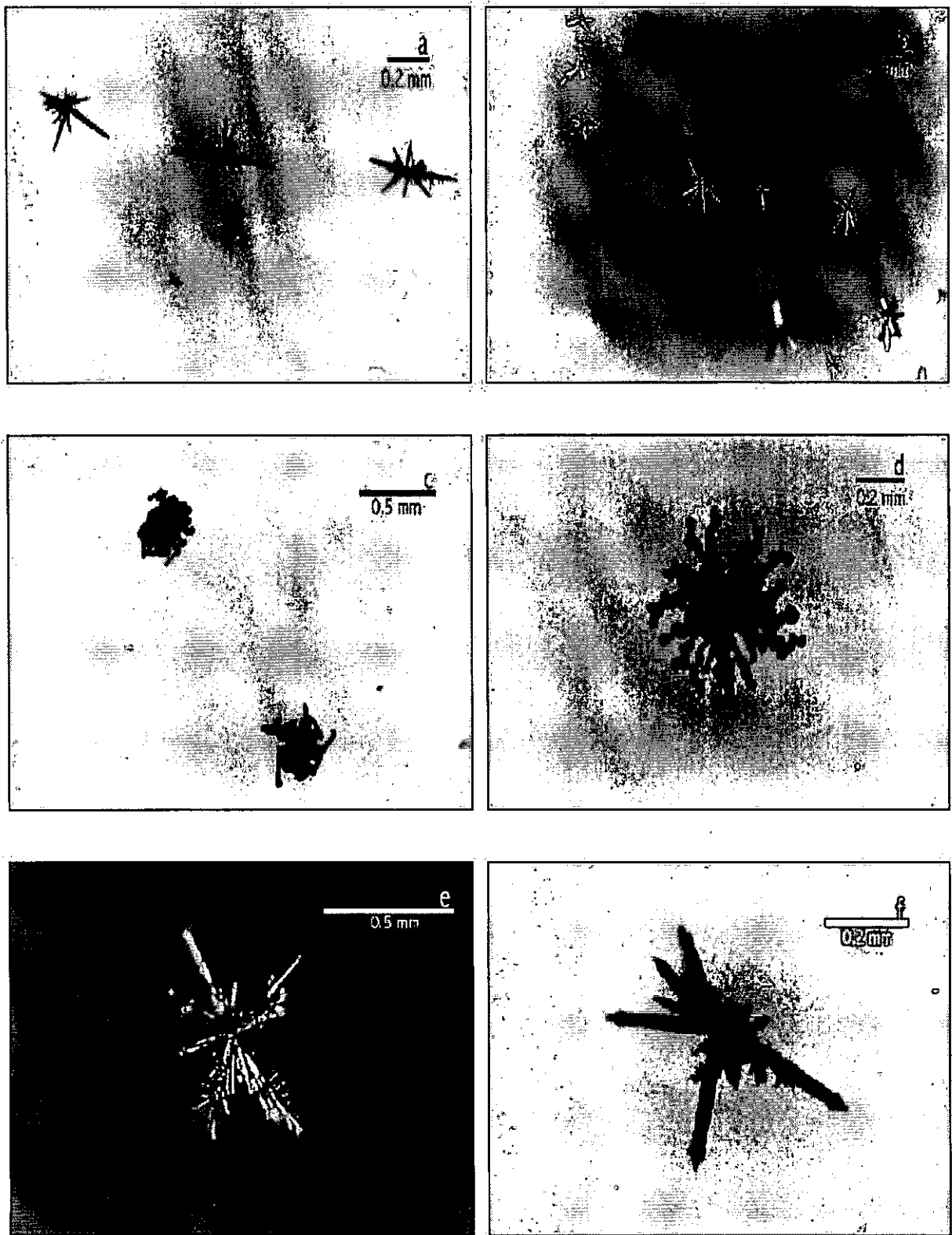


Fig. 23. Patrón morfológico observado en presencia de aminoácidos cargados positivamente. pH 9. a, b, c) His. d) Lys. e y f) Arg.



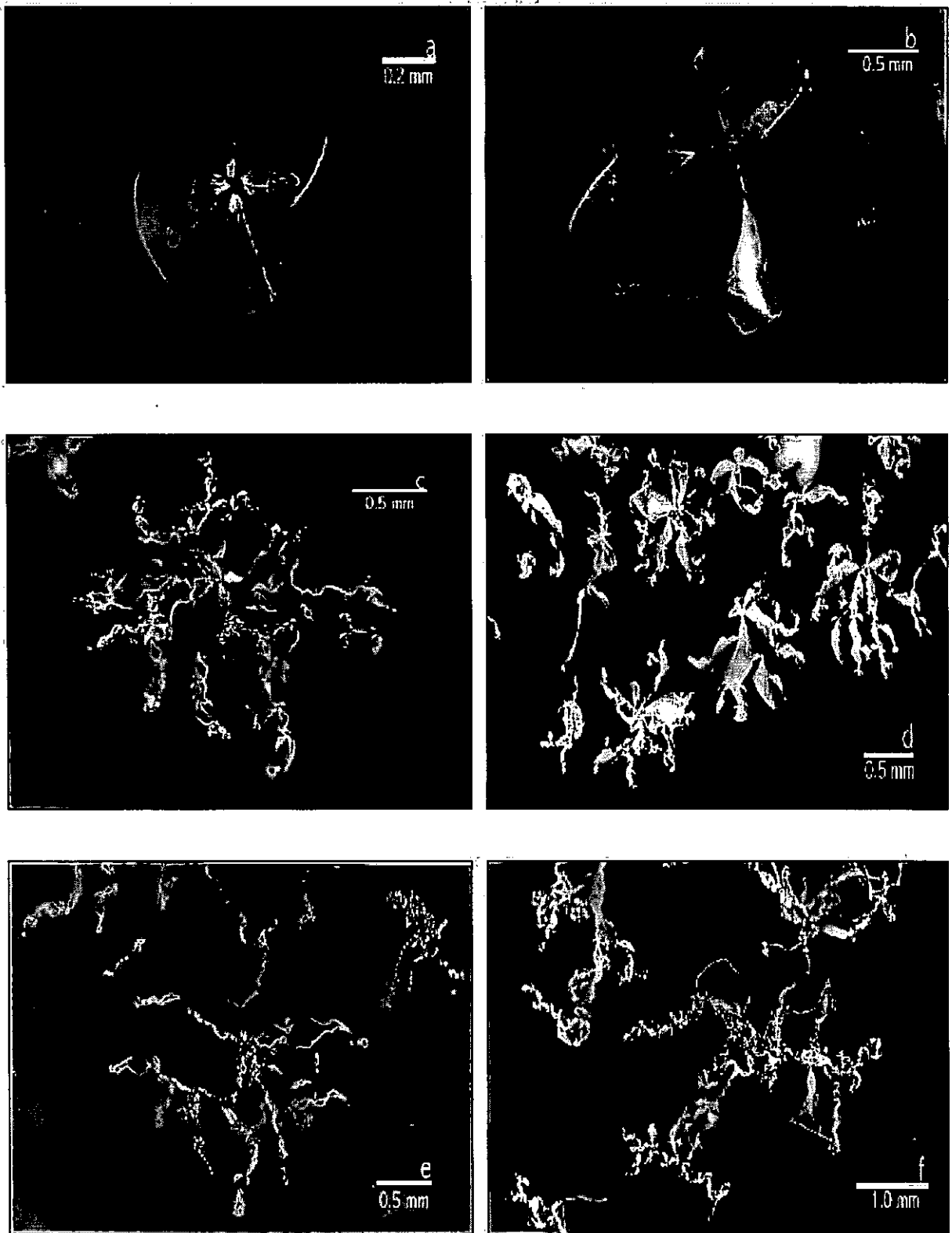


Fig. 24. Patrón morfológico observado en presencia de aminoácidos cargados positivamente. pH 10. a, c) Arg. b) His. d, e, f) Lys



Abreviatura.	Hábito.	Descripción del hábito.
D	Dendrítico.	Crecimiento ramificado con "forma de árbol" de gran complejidad.
D-E	Dendrítico-Esferulítico.	Estructura de transición entre la morfología radial y esferulítica.
E	Esferulítico.	Precipitado de morfología esférica que consiste de pequeños cristales en forma de agujas en un arreglo radial.
LI	Laminar irregular.	Estructuras con una amplia superficie y un bajo grosor, con una serie de irregularidades, semejantes a hojas dispuestas radialmente (con un centro mutuo de crecimiento).
HI	Helicoidal irregular.	Estructuras en forma de "trenza", con diferentes niveles de superenrollamiento, generalmente irregular.
LR	Laminar regular.	Estructuras laminares con gran regularidad en toda la superficie.
HR	Helicoidal regular.	Estructuras en forma de trenza, con una gran uniformidad en su desarrollo y arreglo.
Hrad	Helicoidal radial.	Estructuras en forma de "trenza" con un arreglo radial.
Lrad	Laminar radial.	Estructuras laminares con un centro mutuo de crecimiento.
Est.F	Estructuras fractales.	Estructuras con una gran complejidad geométrica, con un patrón repetitivo.
Mamelonado.	Mamelonado.	Estructuras con morfología en forma de almohadillas.
Espículas.	Espículas.	Estructuras en forma de espigas.
Acicular o ahusado.	Acicular o ahusado.	Estructuras delgadas y alargadas en forma de espigas.
Septado o metamérico.	Septado o metamérico.	Estructuras con marcadas líneas de precipitación.
Pisolítico.	Pisolítico.	Estructura granular mas o menos esférica.

Tabla 4. Abreviaturas utilizadas en el análisis de frecuencias y Glosario.



V.5 Análisis de frecuencias.

La distribución general de las diferentes morfologías a los diferentes valores de pH para los sistemas control (sin aminoácido) en términos de presencia-ausencia se muestran en la figura 25, mientras que para los aminoácidos con grupos R polares y que no tienen carga neta, así como la influencia del pH sobre éstas y el patrón morfogenético de los agregados, puede observarse en la figura 26. De igual manera se muestran éstas distribuciones para los aminoácidos con grupo R apolares y que no tienen carga neta, para los aminoácidos cargados negativamente y para los aminoácidos cargados positivamente, en las figuras 27, 28 y 29 respectivamente, variando en que para los sistemas a los que se les adicionó algún aminoácido, éstas se dan en términos de frecuencia relativa, sin tomar en cuenta el pH, y frecuencia absoluta en la que si se tomó en cuenta ésta variable.

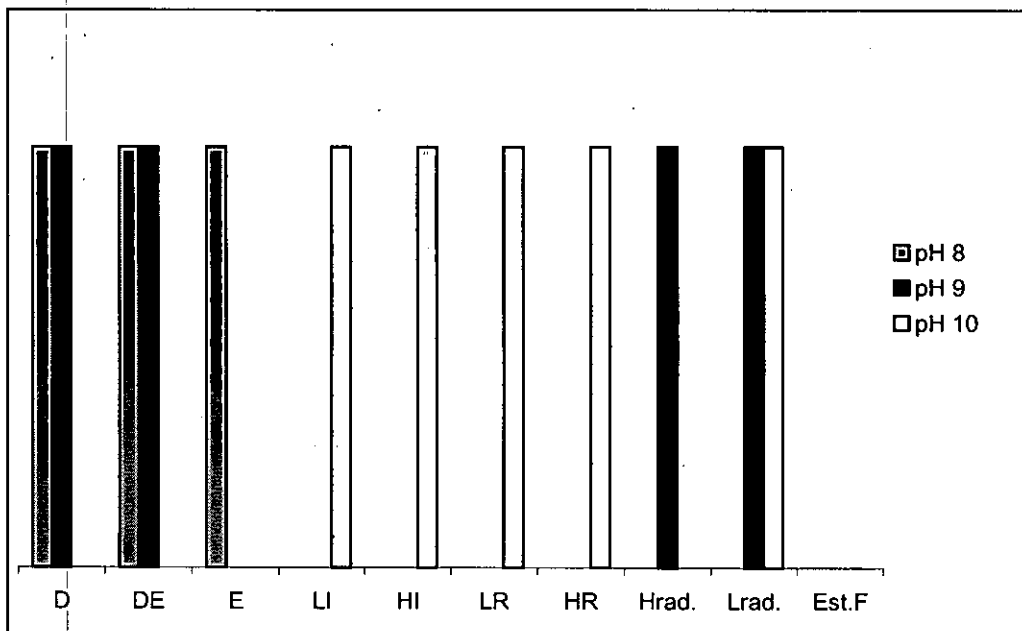


Figura 25. Distribución de las diferentes morfologías a los diferentes valores de pH para los sistemas control (sin aminoácido).



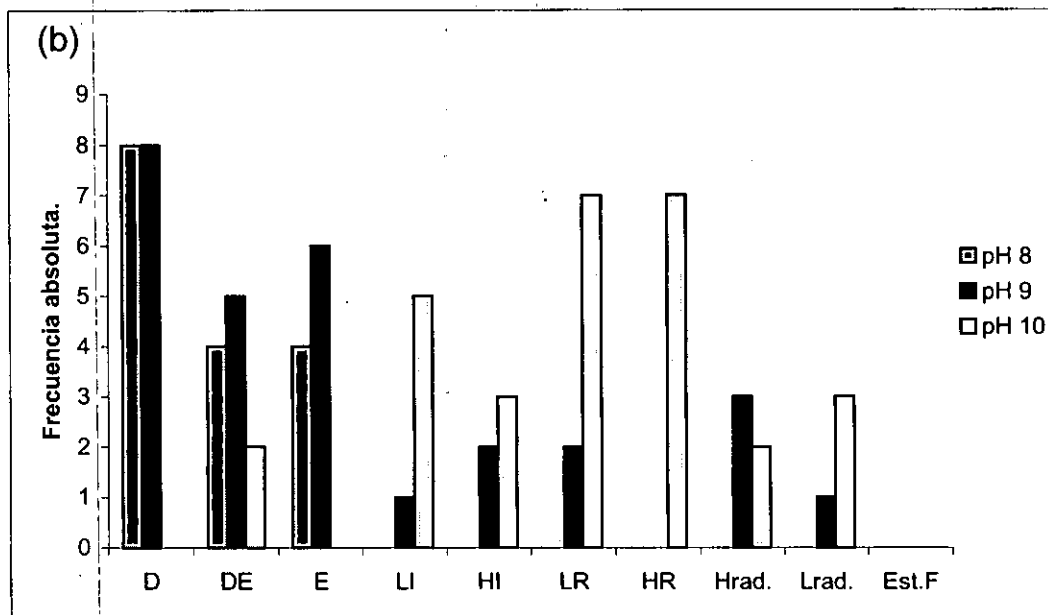
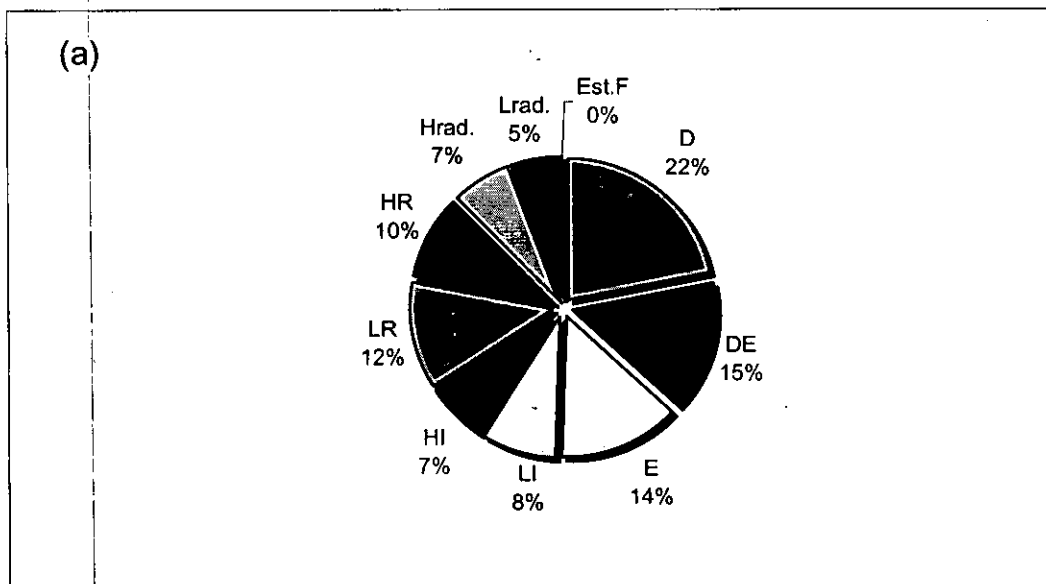


Figura 26. (a) Patrón morfogenético para los aminoácidos con grupos R polares y que no tienen carga neta, en términos de frecuencia relativa, (b) distribución de las diferentes morfologías a los diferentes valores de pH, en términos de frecuencia absoluta.



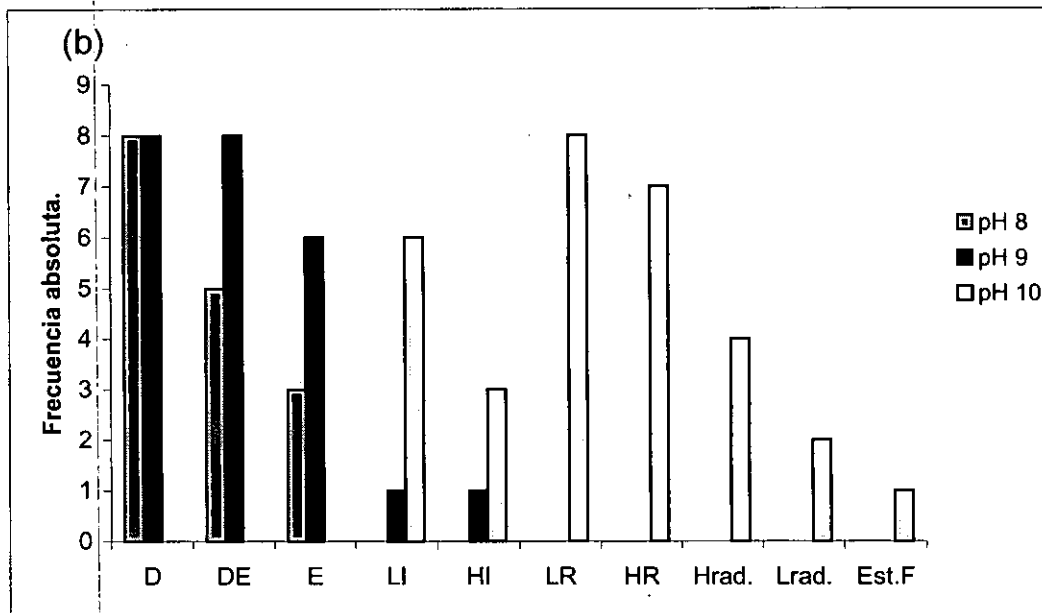
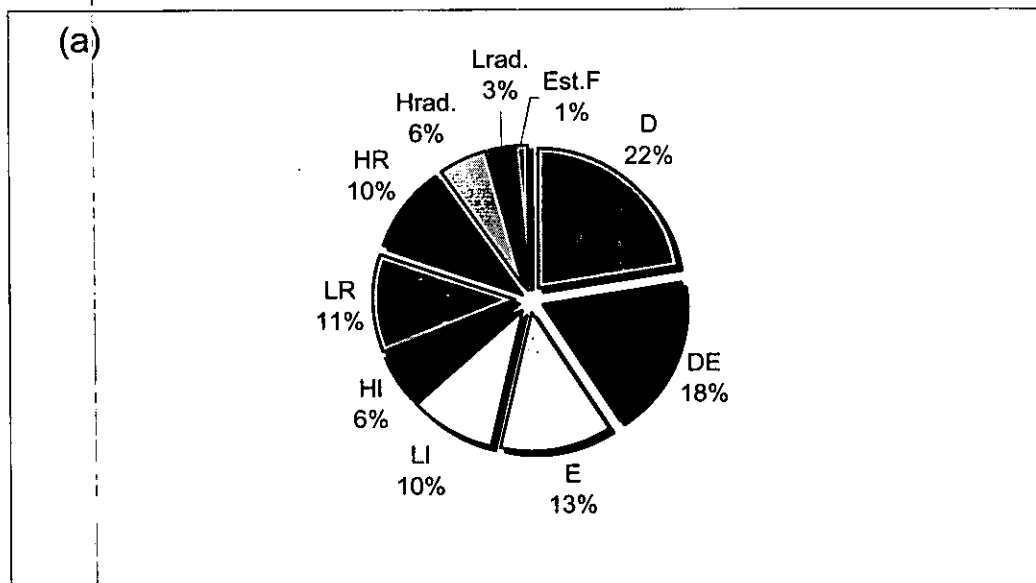


Figura 27. (a) Patrón morfogenético para los aminoácidos con grupos R apolares y que no tienen carga neta, en términos de frecuencia relativa, (b) distribución de las diferentes morfologías a los diferentes valores de pH, en términos de frecuencia absoluta.



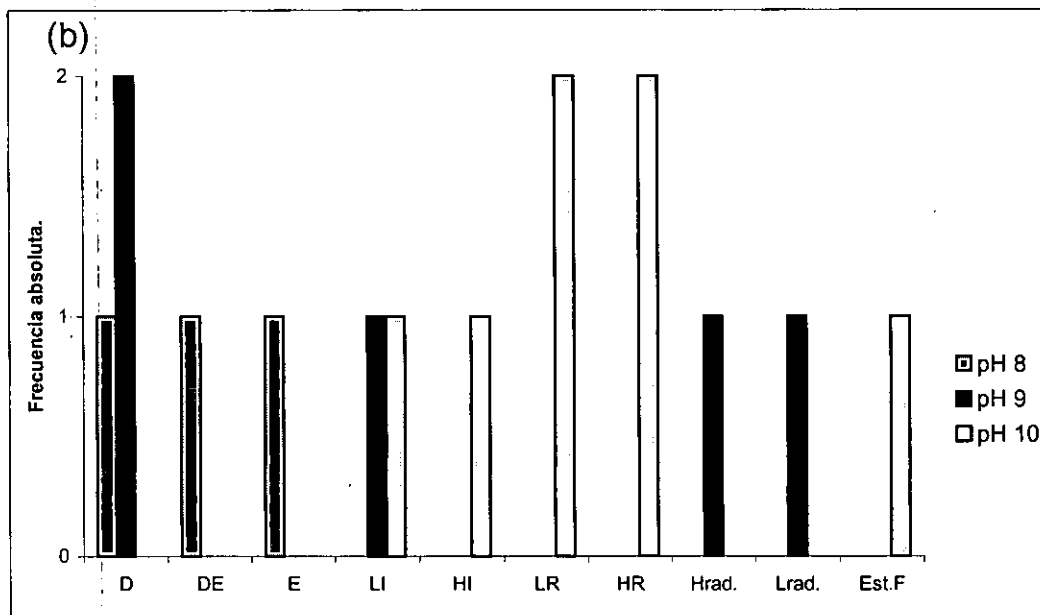
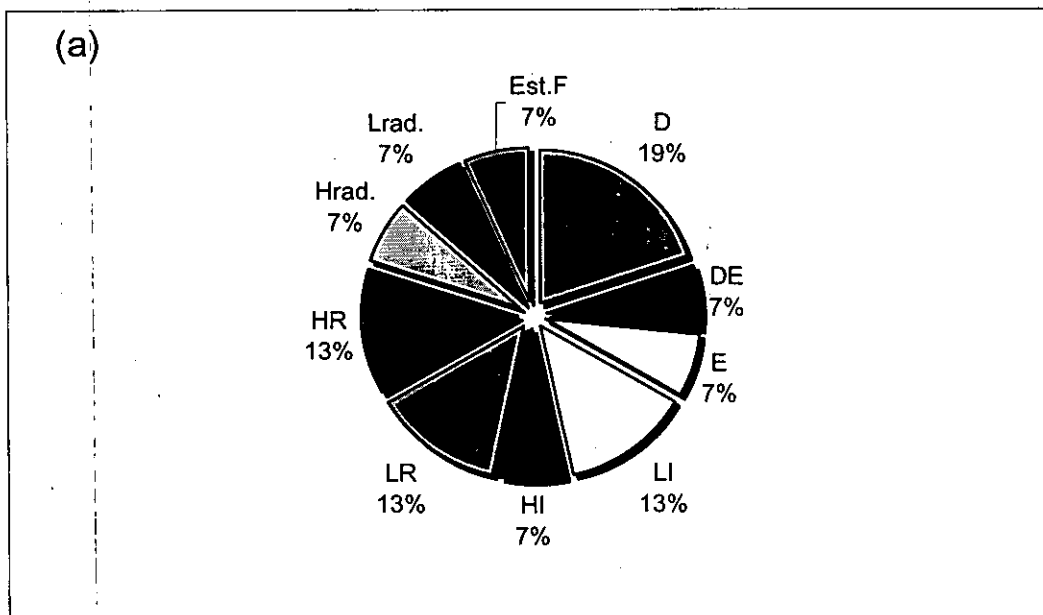


Figura 28. (a) Patrón morfogenético para los aminoácidos cargados negativamente, en términos de frecuencia relativa, (b) distribución de las diferentes morfologías a los diferentes valores de pH, en términos de frecuencia absoluta.



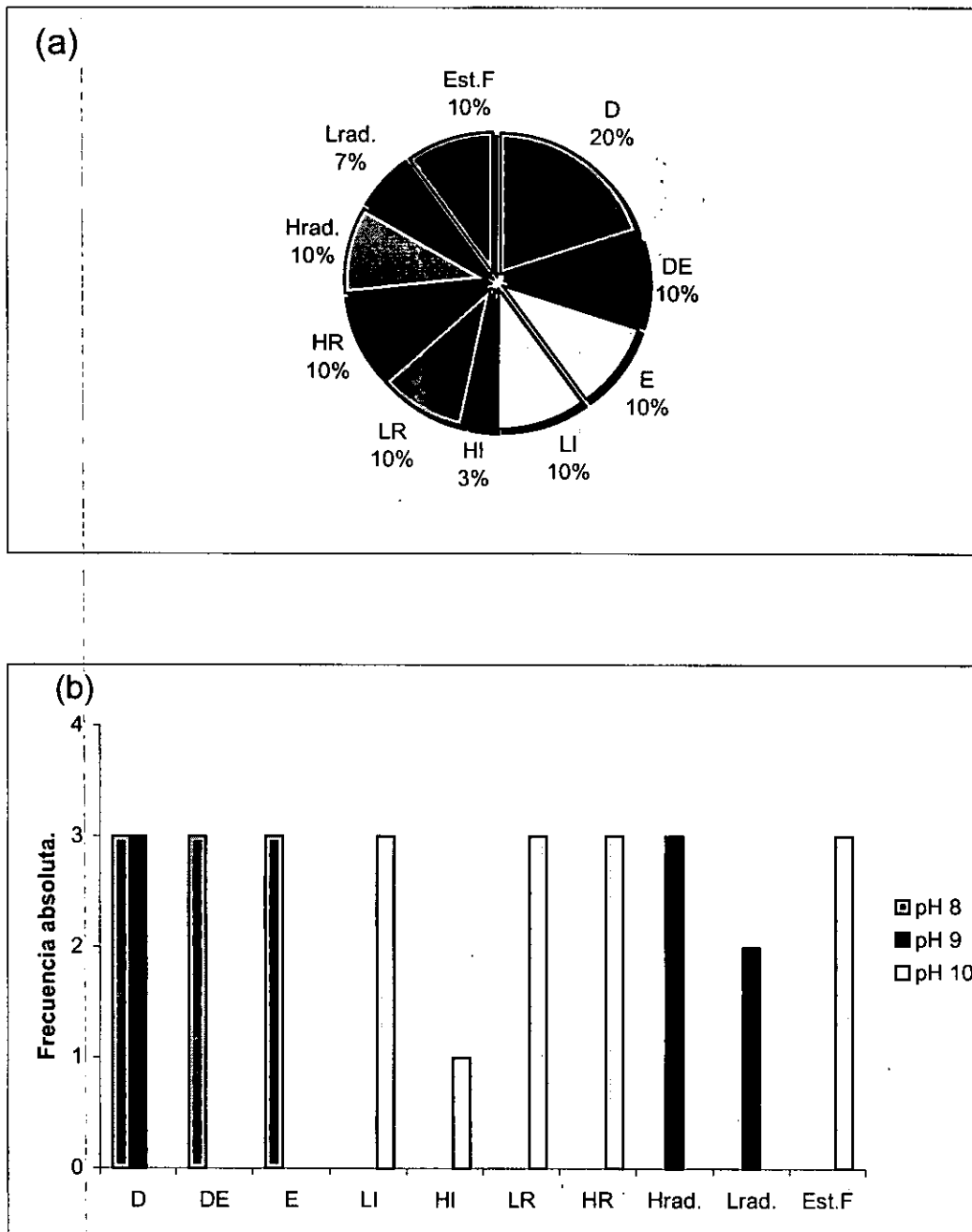


Figura 29. (a) Patrón morfogenético para los aminoácidos cargados positivamente, en términos de frecuencia relativa, (b) distribución de las diferentes morfologías a los diferentes valores de pH, en términos de frecuencia absoluta.



VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES

VI.1 Sobre la influencia del pH.

Basándose en los resultados obtenidos, se observa que la variable que más influyó en el desarrollo y la morfología de los IMCA fue el pH de formación del gel. Así tenemos que la morfología típica a pH 8 fue de dendrítica a dendrítica-esferulítica, destacando que tanto para la Serina como para la Glutamina, las estructuras dendríticas fueron de un mayor grosor asemejando agujas. Para pH 9 en la mayoría de los casos se mantuvo en un principio la estructura dendrítico-esferulítica pero posteriormente predominaron estructuras laminares concéntricas, estructuras helicoidal radial y estructuras de dendrítico-esferulíticas hasta netamente esferulíticas, mientras que la excepción fueron láminas y hélices irregulares. A pH 10 el patrón general fue en un principio de estructuras helicoidal radial y láminas concéntricas, pasando posteriormente a ser de laminar y helicoidal irregular a laminar y helicoidal regular.

VI.2 Sobre la influencia de los aminoácidos.

Aminoácidos con grupos R polares y que no tienen carga neta.

Las estructuras a pH 8 no se vieron fuertemente influenciadas en términos de que, no aparecieron estructuras fuera de lo común, haciendo una comparación con las observadas en los sistemas en los que no se les fue adicionado ningún aminoácido (control), pero es de hacer notar que la Cys, Gly y Gln, produjeron una fuerte inhibición en la precipitación de los agregados, en los primeros lapsos de tiempo. Por otra parte, a pH 9, aunque aparecieron algunas estructuras del tipo laminar y helicoidal irregular y laminar regular, no hubo la formación de estructuras muy diferentes a las observadas con anterioridad, mientras que a pH 10, a excepción de algunas estructuras dendrítico-esferulíticas y helicoidales radiales, el patrón morfogenético no varió drásticamente.

Aminoácidos con grupos R apolares y que no tienen carga neta.

A pH 8, las morfologías de las estructuras, generalmente concordaron con las observadas en los experimentos control, pero tanto la Pro, Phe, Trp y Met inhibieron fuertemente la formación de estructuras, mientras que a pH 9, no pareció haber grandes diferencias, solo la presencia de algunas estructuras laminares y helicoidales irregulares, mientras que para pH 10, la presencia del Trp determinó al parecer la formación de algunas



estructuras, con una morfología laminar inusual, de gran complejidad asemejando estructuras fractales.

Aminoácidos cargados negativamente.

Fue evidente la influencia de éstos aminoácidos en el patrón morfogenético, a pH 8 el Acido Aspártico inhibió fuertemente el desarrollo de los IMCA y el Acido Glutámico a pH 10 propició la formación de estructuras laminares fractales de gran complejidad.

Aminoácidos cargados positivamente.

Los patrones morfogenéticos, presentaron grandes variaciones, a pH 8, tanto la Arg, Lys e His, inhibieron fuertemente el desarrollo de los agregados, mientras que a pH 10, los tres produjeron estructuras de gran complejidad morfológica, asemejando estructuras fractales.

Posibles interpretaciones.

En términos generales parece ser que la inhibición de la precipitación o el crecimiento cristalino es debido a que la especie iónica predominante de los diferentes aminoácidos que la inducen (Pro, Phe, Trp, Met, Arg, Lys, His, Cys, Gln, Gly, Asp) a pH 8, es absorbida selectivamente por los núcleo de carbonato de bario, impidiendo su crecimiento, por lo que se deduce que el tipo de interacción predominante es de tipo electrostático, o bien el aminoácido es absorbido selectivamente en zonas de la red polimérica del gel de sílice impidiendo la depositación de los cristales que forman el agregado.

Por otra parte, las estructuras fractales que se forman a pH 10 en presencia de Trp, Glu, Arg, Lys, His, son formadas de igual manera por acción principal de cargas electrostáticas y la fuerza iónica de las diferentes especies que se encuentran en el gel, diferenciándose en que la absorción selectiva se da en lugares muy bien determinados, afectando el hábito del agregado.

VI.3 Sobre la morfología de los IMCA y sus posibles implicaciones geológicas, paleontológicas y bioquímicas en el origen de la vida.

Los conceptos relacionados con el origen de la vida son derivados en su mayor parte a partir de los experimentos de simulación llevados a cabo en el laboratorio. Estos conceptos son de gran ayuda en la elucidación de los mecanismos y procesos que estuvieron posiblemente involucrados en la formación de los primeros organismos. Sin embargo, los experimentos no pueden respondernos la pregunta de dónde ni cuándo éste evento se llevó a cabo. Este es un



fenómeno histórico y por lo tanto solo puede ser rastreado en el registro que se encuentra preservado en las rocas ancestrales (Pflug, 1984).

La principal evidencia de la vida en el pasado, son los fósiles morfológicos, los cuales se supone son restos estructurales de organismos. Un problema en el estudio de los sedimentos del Arqueano, es que los fósiles que éstos contienen no son más que simples estructuras esféricas y filamentosas pobremente detalladas y con un gran número de defectos.

Debido a esto, se ha debatido frecuentemente el cómo tales estructuras no específicas pueden ser distinguidas de objetos similares de origen no biológico (Pflug, 1984), como los agregados cristalinos, los cuales precipitan mostrando morfologías muy específicas con simetría no cristalográfica (García-Ruíz, 1993), pero si muy similares a morfologías biológicas, por lo que la existencia de éste tipo de precipitados inorgánicos muestra claramente que la distinción entre “simetría orgánica e inorgánica” no se puede considerar como una base sólida o como un criterio de biogenicidad debido a su ambigüedad.

Merek (1973) ha puntualizado que ésta similitud morfológica es particularmente relevante cuando se buscan remanentes fósiles de organismos muy simples, donde la ausencia de partes duras y una división funcional, se reduce en la práctica a su identificación por una caracterización morfológica.

Así, algunas estructuras esferoidales del Precámbrico han sido explicadas como microesferas inorgánicas de cuarzo, formadas durante la cristalización de sílice coloidal (Oehler, 1986) o como ensamblajes protobióticos (Fox, 1986). Sin embargo, existe un grupo importante de microfósiles “reales” del Precámbrico que muestran formas esferoidales hechas de material carbonoso y morfologías aun mas complejas como hebras septadas, hélices o filamentos delgados, que claramente son similares en forma y tamaño a organismos modernos.

La biogenicidad de éstos remanentes es algunas veces soportado por su asociación con estromatolitos y restos orgánicos, pero para la interpretación de los microfósiles es necesario demostrar que su morfología parecida a la biológica no puede ser resultado de un proceso no vital. Los IMCA podrían ser una interpretación alternativa a considerar cuando se trata de descifrar la biogenicidad de microbiotas Precámbricas (García-Ruíz, 1994), dadas las condiciones en las que se encuentran preservadas algunas de éstas estructuras, como las descritas por Pflug (1978), encontradas en los cherts de Swartkoppie al sur de África, los cuales son rocas sedimentarias precipitadas químicamente ricas en sílice, datadas radiométricamente con una edad de 3400 millones de años y algunas otras pertenecientes a la



serie de Isua al SW de Groenlandia, con una edad estimada de 3800 millones de años, presentando ambas estructuras y microestructuras carbonosas.

En los agregados cristalinos de morfología inducida, las propiedades morfológicas y de crecimiento no están gobernadas por la relación entre cristal y cristal, sino más bien, por un sustrato externo (la membrana tridimensional del gel de sílice), que actúa como un sitio para el crecimiento progresivo de los cristales que forman el agregado.

Así se ha postulado que es la red polimérica del gel de sílice, la cual funciona como un molde que controla la morfología de éstos agregados, lo cual puede comprobarse disolviendo la fase de carbonatos o la de silicatos, tal como lo hiciera el grupo de García-Ruíz, en donde al disolver la fase de carbonatos, se mantuvo un fino molde con la morfología del agregado.

Por otro lado el arreglo ordenado del material componente de los IMCA, se deduce en base a que, bajo polarizadores cruzados, éstos presentan diferentes patrones de difracción de la luz, así como una cruz de extinción en algunos casos.

También se observó una evolución morfológica, a partir de la posición del primer agregado y hasta el último. Sin embargo, cada una de éstas morfologías evolucionó con el tiempo de acuerdo a diferentes patrones, por lo que se ha deducido que la regularidad o irregularidad de las estructuras depende en gran medida de la sobresaturación de las diferentes zonas o regiones, como lo son las concentraciones de carbonatos, las cuales están directamente relacionadas con las morfologías de los IMCA según estudios realizados por García-Ruíz (1985).

Por lo tanto la formación de estructuras esferulíticas y su transición hacia éstas se debe a la alta concentración de carbonatos libres, así como al pH, ya que la evolución morfológica en función del tiempo determina una gran abundancia de estructuras de éste tipo a pH 8 y un menor número a pH 9, mientras que a pH 10 éstas estructuras nunca aparecen. Esto indica que la mayor parte de los carbonatos libres a pH 10 son utilizados para la formación de estructuras helicoidales y laminares, y que la capacidad de precipitación de éstos se ve influenciada por el pH, así como por la fuerza iónica de los diferentes productos y reactivos de la reacción y su distribución espaciotemporal.

La presencia de aminoácidos promueve la formación de estructuras laminares y helicoidales irregulares a pH 9.



Es evidente que los agregados helicoidales se forman a partir de uno laminar. Aunque no se conocen aún las fuerzas químicas y físicas involucradas en su formación, sí se ha descrito la relación geométrica de las estructuras helicoidales $2:2^\infty$ y $2:4^\infty$ (García-Ruíz, 1981) y sus diferentes interacciones, lo cual es un primer acercamiento a la descripción de éstos sistemas con geometría no cristalográfica.

Lo que sí se tiene bien determinado, es que cuando existen múltiples estructuras helicoidales, aparece una gran variedad de morfologías difíciles de describir en términos de simetría, las cuales son incompatibles con un grupo periódico tridimensional, por lo que la morfología de éstos agregados no puede ser explicada usando las leyes cristalográficas aplicadas a agregados cristalinos clásicos como las descritas por Amorós (1990), como son los agregados anáxicos, uniáxicos, biáxicos y triáxicos, ni tampoco ser caracterizados en términos termodinámicos por tratarse de sistemas fuera del equilibrio.

A causa de la gran complejidad de eventos observados en la precipitación de los IMCA y por la compleja fenomenología asociada con su evolución morfológica, éste proceso no puede ser analizado en términos de los procesos clásicos de crecimiento de cristales, ya que éste es un fenómeno complicado en el cual las diferentes variables actúan conjuntamente, no obstante aún así podemos considerarlo como un proceso análogo a la biomineralización natural en sistemas biológicos.

El problema de las estructuras metamerizadas o con líneas de precipitación puede ser abordado si se considera que se está trabajando con un sistema químico o de transporte-reacción, en el cual las ondas de composición química pueden propagarse formando una gran variedad de estructuras.

Para la generación de estructuras de gran complejidad morfológica, podemos basarnos en la existencia de defectos de rotación (dislocaciones), las cuales son posibles en membranas ordenadas y que éste tipo de defectos puede explicar la generación de estructuras helicoidales, rotaciones de 180° , conos, etc., a partir de superficies bidimensionales, mientras que para las estructuras con morfologías del tipo fractal se deduce que se forman principalmente por acción de cargas dados los aminoácidos involucrados en su formación, dándose principalmente interacciones de naturaleza electrostática (Grases, 1988).



VI.4 Determinación de los posibles tipos de complementariedad en las interfaces orgánicas-inorgánicas (Sílice-BaCO₃, Sílice-aminoácido).

1. Distribución espacial de cargas.

Algunas de las diferentes propiedades de las matrices orgánicas pueden homologarse a las de las matrices inorgánicas como las redes poliméricas del gel de sílice, las cuales al igual que las matrices orgánicas poseen una determinada distribución de cargas, las cuales se encuentran químicamente activas. De igual manera existen cargas parciales distribuidas sobre la red polimérica del gel debido a la interacción aminoácido-sílice, para formar superficies cargadas, las cuales pueden inhibir o promover el desarrollo de los agregados cristalinos. Así mismo, la distribución estereoquímica de éstas cargas es una gran influencia en el desarrollo de los agregados, debido a la estructura porosa del gel de sílice, el cual resulta apropiado para la distribución local de cargas, promoviendo, inhibiendo o alterando la formación de los agregados.

2. Simetría en uniones epitaxiales.

Es de gran importancia a su vez el desarrollo de las diferentes uniones epitaxiales, esto es, que desde el punto de vista estructural, ambas estructuras (sílice-BaCO₃ o sílice-aminoácido, etc.) deben de tener por lo menos periodicidades estructurales semejantes, para que se den los diferentes sitios de unión a la matriz polimérica y los iones en determinada cara u orientación cristalográfica, lo cual es evidente que se da en las diferentes interacciones para que el agregado crezca utilizando la membrana del gel de sílice como "molde", lo cual indica que es ésta la que gobierna la orientación cristalográfica predominante en el agregado.

3. Requerimientos estereoquímicos.

Este tipo de interacciones son primordiales para el desarrollo de los agregados en función de sus complementariedades estereoquímicas en la interacción sílice-BaCO₃. Esto es debido a que estructuralmente debe existir complementariedad para que éstas y otras interacciones se formen y se mantengan para que el agregado pueda seguir creciendo con determinada estructura morfológica, velocidad de crecimiento, etc.



4. Cooperatividad.

Es evidente que este tipo de agregados de gran complejidad no se forman gracias a un solo tipo de interacción, sino más bien es la cooperatividad entre los diferentes tipos de complementariedades (físicas, químicas, estereoquímicas, etc), la que hace posible el desarrollo de los Agregados Cristalinos de Morfología Inducida. Es necesario diseñar experimentos en los cuales cada una quede lo más claramente explicada y determinar si son sus diferentes interacciones las que hacen posible el desarrollo de éstos agregados.

5. Sinergismo.

Este tipo de interacciones que producen patrones colectivos a partir de muchos componentes que interactúan mutuamente, nos introducen nuevamente a los fenómenos de autoorganización, el que de alguna manera refleja los diferentes tipos de complementariedades actuando sobre un mismo sistema, de igual manera se introduce el término de dinámica molecular el cual nos indica que los diferentes flujos de materia y energéticos, estructuras rotaméricas en los aminoácidos, las diferentes estructuras iónicas involucradas, etc., deben de tomarse en cuenta como parte de este gran número de componentes que interactúan mutuamente.

Dadas las características del fenómeno que da origen a los agregados cristalinos de morfología inducida y los diferentes tipos de complementariedades moleculares involucradas en la biomineralización en sistemas naturales, podemos decir que éste sistema cumple en general con los requerimientos necesarios para ser considerado un modelo adecuado para el estudio de la biomineralización, aunque es necesario hacer estudios estereoquímicos y estructurales a un nivel mas fino, con la finalidad de complementar la parte fenomenológica del proceso.



VII. PERSPECTIVAS.

Aunque se ha descrito que todas las estructuras helicoidales frecuentemente encontradas en los IMCA a pH 10 giran hacia la izquierda, esto debe de ser observado a mayor detalle, ya que generalmente esto depende en gran medida del punto de vista del observador, por lo que se tiene contemplado realizar una serie de observaciones basadas en técnicas de videomicroscopía, donde puede seguirse la evolución morfológica en tiempo real, para despejar las dudas en éste sentido, así como observar la influencia de los diferentes aminoácidos y registrar detalladamente la evolución del fenómeno.

Ahora bien para una comprensión adecuado de la morfología de los IMCA y como ésta se ve afectada por la presencia de aminoácidos se tiene contemplado realizar un estudio más a fondo desde el punto de vista de los fenómenos de transporte involucrados en el crecimiento de cristales así como su influencia sobre los patrones de crecimiento mineral, como son la difusión, la convección, la transferencia de masa y calor.

Por otra parte para corroborar y poder evaluar si el sistema utilizado en éste trabajo puede ser utilizado a ciencia cierta como un sistema análogo a la biomineralización natural, se tiene contemplado hacer una comparación a detalle con un sistema natural como los cascarones de huevos de diferentes especies (tanto actuales como fósiles) y sus implicaciones en un aprovechamiento biomimético (Heuer,1992). Se utilizarán técnicas avanzadas de análisis topográfico como la microscopía de fuerza atómica (AFM), tanto en modo contacto ("contact") como intermitente ("tapping"), analizando tanto la fase orgánica de la membrana del cascarón, como la fase inorgánica de carbonato. Se buscara si existe alguna correlación cristalográfica, realizando paralelamente el análisis fisicoquímico y estructural de las proteínas involucradas en el fenómeno, mediante la utilización de técnicas de difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido sobre los diferentes tipos de agregados cristalinos, para poder establecer la correlación estructural cristalográfica entre membrana y cristales.

Otras de las técnicas que pueden ser usadas para un análisis mas detallado de la composición química cualitativa y cuantitativa de éstos agregados sin destruir la muestra, son los microanálisis con rayos-X con equipos JEOL JXA-8900 y pruebas EDAX (Energy Dispersive X-ray Spectrometry System) con equipos DX-95, con los cuales se puede obtener la relación de elementos presentes en concentraciones de hasta 0.1% w/w y sus relaciones texturales en el área analizada. De esta manera podemos determinar el lugar o lugares de unión y las relaciones sílice-



BaCO₃ y sílice-aminoácido de una manera mas detallada, ya que se pueden realizar pruebas independientes para cada elemento (Nanev. 1999).

Esta serie de estudios pueden tener una aplicación potencial en estudios a nivel ecológico, evolutivo y estructural a futuro, basándose en los patrones de crecimiento mineral encontrados en la naturaleza.



APENDICE "A". Tabla de abreviaturas y Glosario.

Abreviatura.	Habito.	Descripción del habito.
D	Dendrítico.	Crecimiento ramificado con "forma de árbol" de gran complejidad.
D-E	Dendrítico-Esferulítico.	Estructura de transición entre la morfología radial y esferulítica.
E	Esferulítico.	Precipitado de morfología esférica que consiste de pequeños cristales en forma de agujas en un arreglo radial.
LI	Laminar irregular.	Estructuras con una amplia superficie y un bajo grosor, con una serie de irregularidades, semejantes a hojas dispuestas radialmente (con un centro mutuo de crecimiento).
HI	Helicoidal irregular.	Estructuras en forma de "trenza", con diferentes niveles de superenrollamiento, generalmente irregular.
LR	Laminar regular.	Estructuras laminares con gran regularidad en toda la superficie.
HR	Helicoidal regular.	Estructuras en forma de trenza, con una gran uniformidad en su desarrollo y arreglo.
Hrad	Helicoidal radial.	Estructuras en forma de "trenza" con un arreglo radial.
Lrad	Laminar radial.	Estructuras laminares con un centro mutuo de crecimiento.
Est.F	Estructuras fractales.	Estructuras con una gran complejidad geométrica, con un patrón repetitivo.
Mamelonado.	Mamelonado.	Estructuras con morfología en forma de almohadillas.
Espículas.	Espículas.	Estructuras en forma de espinas.
Acicular o ahusado.	Acicular o ahusado.	Estructuras delgadas y alargadas en forma de espinas.
Septado o metamérico.	Septado o metamérico.	Estructuras con marcadas líneas de precipitación.
Pisolfítico.	Pisolfítico.	Estructura granular mas o menos esférica.



IX. REFERENCIAS.

- Amorós, J.L. 1990. El Cristal, morfología, estructura y propiedades físicas. Atlas. Madrid. Cuarta edición ampliada. pp. 491-537.
- Agladze, K.I. 1982. Nature 296: 424-426.
- Albrecht, G. & R.B. Corey. 1939. J. Amer. Chem. Soc. 61, 1087.
- Baird, T. et al. 1992. Morphology of gel-grown barium carbonate aggregates - pH effect on control by a silicate-carbonate membrane. Mat. Res. Bull. 27: 1031-1040.
- Bath, T. 1976. Acta Cryst. B32, 891.
- Branden, C. & J. Tooze. 1991. Introduction to protein structure. Garland Publishing Inc. N.Y. pp. 269-285
- Campos Salinas Guadalupe & Verónica Zúñiga Rodríguez. 1998. Caracterización fisicoquímica de geles de sílice, sintetizados en escala ácido-base. Posible aplicación en sensores y biosensores electroquímicos. Tesis de Licenciatura en Ingeniería química. UAM Azcapotzalco. 109pp.
- Chow, G-M. & K, Gonsalves. (ed). 1996. Nanotechnology. Molecularly designed materials. ACS Symposium series 622. American Chemical Society. USA. 413pp.
- Cochran, W. 1952. Acta Cryst. 5, 644.
- Creighton, T. 1993. Proteins. Structures and molecular properties. Freeman and company. N.Y. 507pp.
- Dawson, B. 1953. Acta Cryst. 6, 81.
- Deamer, D. & G. Fleischaker. (ed). 1994. Origins of life. Jones and Bartlett publishers. USA. 431pp.
- Derissen, J. 1968. Acta Cryst. B24, 1349.
- Duncan, M. 1993. Practical protein crystallography. Academic Press, Inc. U.K. 386pp.



- Ducruix, A. & R, Giegé. (ed). 1992. Crystallization of nucleic acids and proteins. Oxford University Press. USA. pp.127-143.
- Fasman, G. (ed). 1990. Prediction of protein structure and the principles of protein conformation. Plenum Press. N.Y. 798pp.
- Ferri, F. & D. Cannel. 1991. Structure of silica gel. Physical Review Letters. 67 (25): 3626-3629
- Fox, SW. 1983. Ancient microspheres: abiogenic, protobiogenic, or biogenic?. Precambrian Research. 23: 1-8.
- Friedbacher, G. 1991. Imaging powders with the Atomic Force Microscope: from biominerals to commercial materials. Science. 253:1261-1263.
- García-Ruíz, JM. & JL. Amorós. 1980. Sobre la precipitación polimórfica del carbonato de cálcico. Estudios geológicos. 36: 193-200.
- García-Ruíz, JM & J.L Amorós. 1981. Morphological aspects of some symmetrical crystal aggregates grown by silica gel technique. Journal of crystal growth. 55: 379-383.
- García-Ruíz, JM. 1982. Crystal growth in gels. A laboratory analogous of the natural crystallization. Estudios geológicos. 38: 209-225.
- García-Ruíz, JM. 1985. On the formation of induced morphology crystal aggregates. Journal of Crystal Growth. 73: 251-262.
- García-Ruíz, JM., A. Moreno, C. Viedma & M. Coll. Crystal quality of lysozyme crystals grown by the gel acupuncture method. Mat. Res. Bull. 28: 541-546.
- García-Ruíz, JM. 1994. Inorganic self-organization in Precambrian cherts. Origin of life & evolution of the biosphere. 24:451-467.
- García-Ruíz, JM. & A. Moreno. 1994. Investigations on protein crystal growth by the gel acupuncture method. Acta Cryst D50: 484-490.



- García-Ruíz, JM. & A. Moreno. 1997. Growth behavior of twisted ribbons of barium carbonate/silicate self-assembled ceramics. *Anales de Química*. 93:1-2.
- García-Ruíz, JM. 1998. Carbonate precipitation into alkaline silica-rich environments. *Geology*. 26(9): 843-846.
- Gavira Gallardo, J. A. 2000. *Cristalización de proteínas en geles por métodos contradifusivos*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 230 pp.
- Giegé, R. et al. 1995. Crystallogensis of biological macromolecules biological, microgravity and others physico-chemical aspects. *Prog. Crystal Growth and Charact.* 30: 237-281.
- Grases, F. et al. 1988. The crystallization of calcium oxalate in the presence of aminoacids. *Journal of Crystal Growth*. 87: 299-304.
- Haken, H. 1985. *Sinergetics*. Springer Series. Vol.1. Third edition.
- Haken, H. & F. Schweitzer (ed). 1997. *Self-organization of complex structures. From individual to collective dynamics*. Gordon & Breach science publisher.
- Harding, M. 1968. *Acta Cryst.* B24, 1096.
- Henisch, H. 1988. *Crystals in Gels and Liesegang Rings*. Cambridge University Press. Great Britain. Pp. 29-47.
- Heuer, A.H. et al. 1992. Innovative materials processing strategies: a biomimetic approach. *Science* 255: 1098-1105.
- Herrera, A.L. 1942. A new theory of the origin and nature of life. *Science* 96:14
- Hull, D. 1981. *An introduction to composite materials*. Cambridge University Press. USA. 246pp.
- Juárez Martínez, Gabriela. 1999. *Estudios fisicoquímicos y estructurales de la interacción proteína-proteína en la taumatina de *Thaumatococcus daniellii*, a través de la teoría de la nucleación*. Tesis de Maestría en Investigación biomédica básica. UNAM. 85pp.



- Khawas, B. 1971. Acta Cryst. B27, 1517.
- Khawas, B. 1969. Acta Cryst. B25, 1006.
- Kirov, G.K. 1972. On the diffusion method for growing crystals. Journal of Crystal Growth. 15: 102-106.
- Kurganov, B. 1991. Problems of biomimetic chemistry. Biokhimiya. 56 (11) 1946-1959.
- Lowenstam, H. 1981. Minerals formed by organisms. Science. 211: 1126-1131.
- Madden, J. 1972. Acta Cryst. B28, 2377.
- Mahan, B. 1987. Termodinámica química elemental. Reverté S.A. Barcelona. 149pp.
- Mann, S. et al. 1993. Crystallization at Inorganic-Organic Interfaces: Biominerals and Biomimetic Synthesis. Science. 261: 1286-1292.
- Mann, S., J. Webb & J.P. Williams. (ed). 1989. Biomineralization. Chemical and biochemical perspectives. VCH. N.Y. USA. 541pp.
- Marin, E. 1949. Alfonso L. Herrera y la plasmogonia.
- Mark, J.E. & Y-C, Lee. (ed). 1995. Hybrid organic-inorganic composites. ACS Symposium series 585. American Chemical Society. USA. 378pp.
- McPherson, A. 1990. Current approaches to macromolecular crystallization. Eur. J. Biochem. 189; 1-23.
- Merek, E. L. 1973. Bioscience. 23; 153-159.
- Moreno, A. 1995. Conducta de crecimiento cristalino en sistemas de difusión-reacción. Aplicación a macromoléculas y compuestos de nueva síntesis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 194pp.
- Moreno, A. 1998. Cristalogénesis biomacromolecular y patrones de crecimiento mineral: una nueva línea de investigación en México. Facultad de Ciencias U.N.A.M. y SEMARNAP(ed). Homenaje al pensamiento y obra de Alfonso L. Herrera. Capítulo I. pp.1-17.



- Moreno, A. et al. 1999. Physical and Chemical Properties of Gels. Application to Protein Nucleation Control in the Gel Acupuncture Technique. *Journal of Crystal Growth*. 205: 375-381.
- Nanev, Christo. Personal Communication (1999). Director del instituto de Físicoquímica de la Academia de Ciencias de Bulgaria.
- Nicolis, G. & I. Prigogine. 1977. *Self-Organization in Nonequilibrium Systems*. John Wiley & Sons. USA. 491pp.
- Oehler, J. 1976. Hydrothermal crystallization of silica gel. *Geological Society of America Bulletin*. 87: 1143-1152.
- Orbán, M. 1980. Stationary and moving structures in uncatalyzed oscillatory chemical reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 102: 4311-4314.
- Ouyang, Q. & H.L, Swinney. 1991. *Nature*. 352: 610-612.
- Pearson, J.E. 1993. *Science*. 261: 189-192.
- Pflug, H. 1978. Yeast-like microfossils detected in oldest sediments of the earth. *Naturwissenschaften*. 65: 611-615.
- Pflug, H. 1984. Early geological record and the origin of life. *Naturwissenschaften*. 71: 63-68.
- Ramanadham, M. 1972. *Acta Cryst.* B28, 3000.
- Rao, C. (ed). 1993. *Chemistry of advanced materials*. Blackwell scientific publications. Oxford. 388pp.
- Ruíz-Amil, M. 1992. *Bioquímica estructural*. Tebar Flores.S.L. Madrid. 327pp.
- Sasisekharan, V. 1959. Unit cell and space group of L-proline monohydrate. *Acta Cryst.* 12, 941



- Sarikaya, M. 1994. An introduction to biomimetics: a structural viewpoint. *Microscopy research and technique*. 27: 360-375.
- Scott, R. 1993. *Silica Gel and Bonded Phases*. John Wiley & Sons. England. 261pp.
- Shoemaker, D. 1953. *Acta. Cryst.* 6, 241.
- Showalter, K. 1980. *J. Chem. Phys.* 73: 3735-3742.
- Simpson, H. 1966. *Acta Cryst.* 20, 550.
- Smith & Wood. (ed). 1992. *Biosynthesis*. Chapman & Hall. N.Y. Chapter 6. Aminoacid interconversions. pp.114-136.
- Srinivasan, R. 1974. *Acta Cryst.* B30, 2270.
- Subramanian, E. 1967. The crystal structure of L-Leucine hydrobromide. *Acta Cryst.* 22, 910.
- Torii, K. & Itaka, Y. 1970. The crystal structure of L-Valine. *Acta Cryst.* B26, 1317.
- Torii, K. & Itaka, Y. 1971. The crystal structure of L-isoleucine. *Acta Cryst.* B27, 2237
- Torii, K. *Acta Cryst.* B29, 2799.
- Turing, A.M. 1952. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 327: 37-72.
- Watabe, N. 1974. Crystal growth of calcium carbonate in biological systems. *Journal of Crystal Growth*. 24/25: 116-122.
- Weissbuch, I. & Addadi, L. 1991. Molecular recognition at crystal interfaces. *Science*. 253: 637-645.
- Williams, R. 1986. *Silicon Biochemistry*. Introduction to silicon chemistry and biochemistry. Ciba Foundation Symposium 121. John Wiley & Sons. U.K. pp. 24-39.
- Winfree, A.T. 1974. *Sci. Amer.* 230: 82-90.
- Zhabotinskii, A.M. 1973. *J. Theor. Biol.* 40: 45-61.

