



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Biomineralizzazione

Aspetti cinetici e termodinamici

Laurea Triennale in Scienze dei Materiali - A.A. 2022-2023

Studentessa: Laura Bettinzoli
Matricola n°: 2000451

Relatrice: Prof.ssa Antonella Glisenti



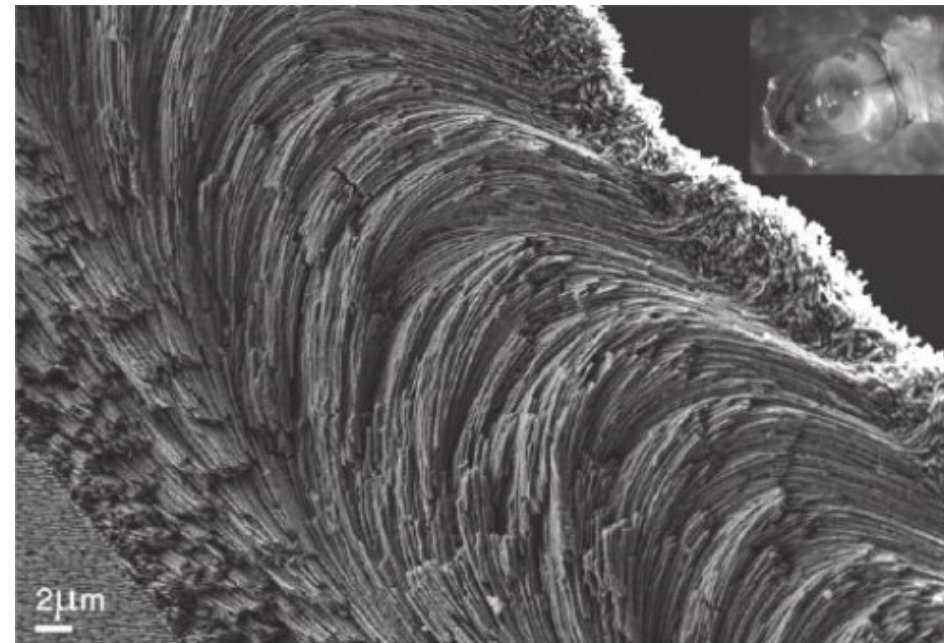
Biominerizzazione

Insieme dei processi attraverso cui gli organismi viventi influenzano la precipitazione di materiali minerali. [1]

I biominerali prodotti

- possono avere forma amorfa, policristallina o monocristallina;
- sono generalmente formati da ioni metallici quali Ca, Fe, Mg e Mn, e anioni quali carbonati, fosfati, ossalati, solfati, ossidi e solfuri. [2]

Due terzi dei biominerali conosciuti contengono Ca [3], il più noto di questi è il CaCO_3 .



Sezione trasversale della conchiglia di *Diacria quadridentata* adulta. Strati costituiti da monocristalli curvi di aragonite (CaCO_3)^[4].



Prodotti e processi

Interesse per la scienza dei materiali

- I minerali sintetizzati hanno **forma, orientazione, grado di cristallinità e composizione controllate**
- Condizioni di processo: temperatura ambiente e pH vicino alla neutralità

Caratteristiche generali dei processi

- Avvengono in **soluzioni sovrassature**
- Prevedono **meccanismi multistadio** a partire da fasi amorfe
- Prevedono **nucleazione eterogenea** in presenza di macromolecole organiche

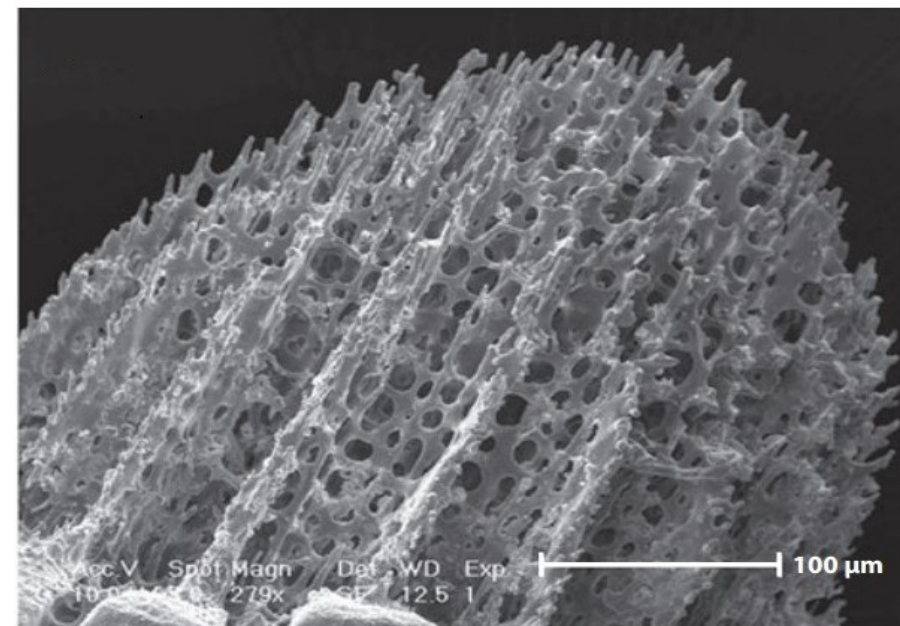


Immagine di un cristallo singolo di calcite (CaCO_3) in una spina di riccio di mare. La morfologia del cristallo non riflette l'organizzazione atomica^[5].



Teoria di nucleazione classica

- La **nucleazione** avviene attraverso l'**addizione** di **specie monomeriche** (atomi, complessi molecolari, colloidali) ad una **particella** in crescita, causata dalle **fluttuazioni locali** di **concentrazione** della soluzione.
- **Non** avviene **coalescenza** tra le particelle.

In una **soluzione sovrassatura** l'**accrescimento** della particella è favorito dal potenziale chimico

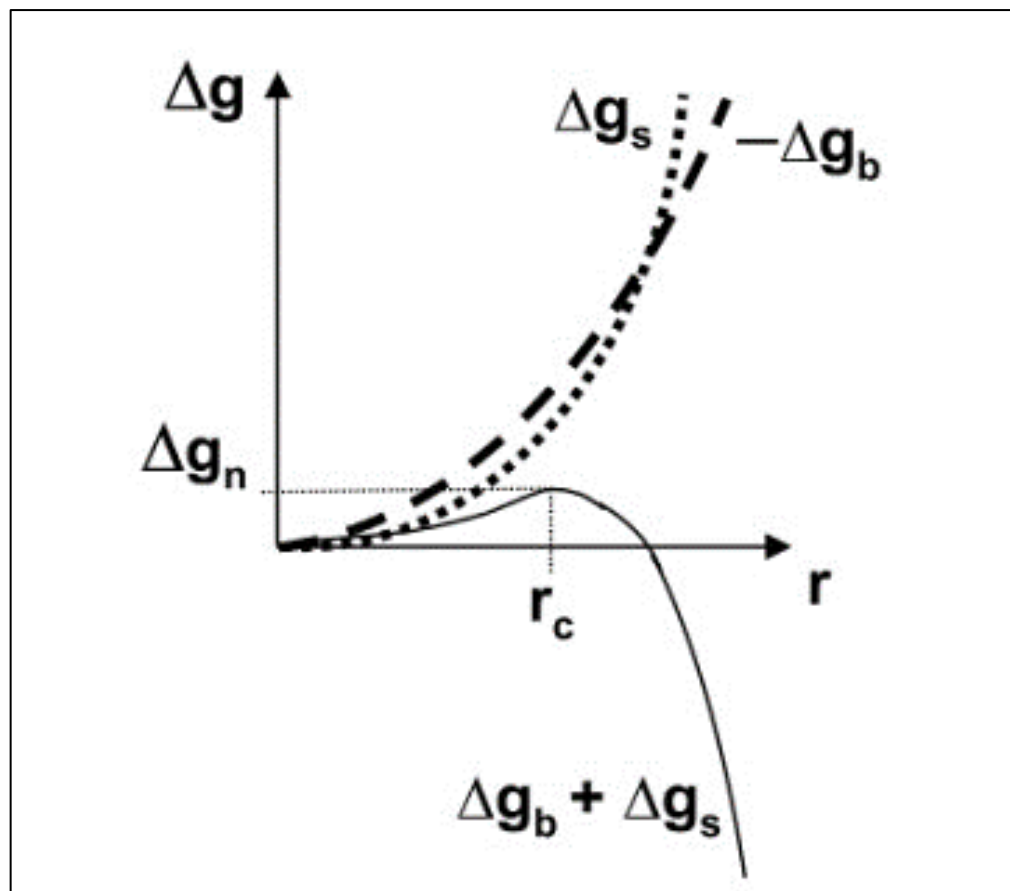
$$\begin{aligned}\mu_{\text{solido}} &< \mu_{\text{soluzione}} \\ \Delta\mu &= \mu_{\text{solido}} - \mu_{\text{soluzione}} < 0\end{aligned}$$

La formazione di una particella comporta la formazione di un'**interfaccia solido-liquido**
⇒ penalità dovuta alla **tensione superficiale** γ

$$\begin{aligned}\Delta g_b &\propto -\Delta\mu r^3 \\ \Delta g_s &\propto \gamma r^2\end{aligned}$$



Barriera di energia libera
corrispondente ad un **raggio**
critico r_c



[6]

Barriera di energia libera

Condizione per la crescita di una particella: $r > r_c$
(r = raggio della particella)

Velocità di crescita per unità di volume

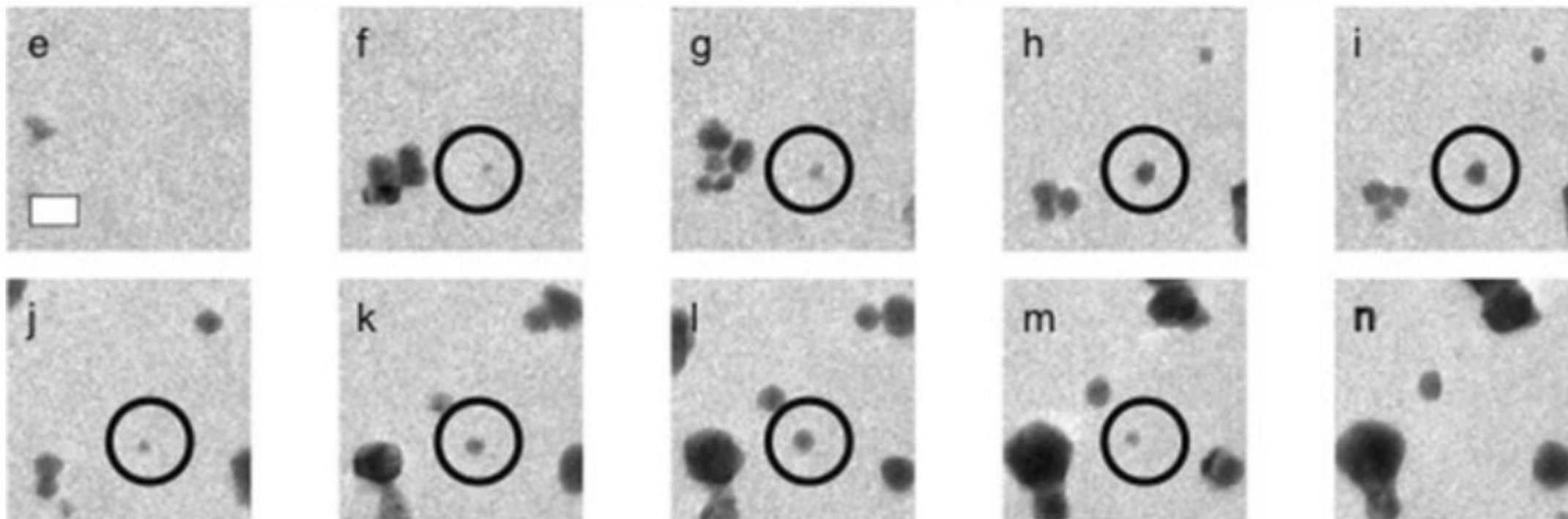
$$J = A e^{\frac{-E_A}{k_B T}} e^{-\frac{\Delta g_n}{k_B T}}$$

Altezza della barriera energetica $\Delta g_n = \frac{B\gamma^3}{\sigma^2}$

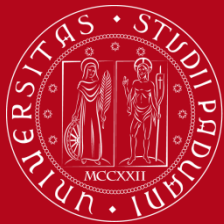
Sovrasaturazione $\sigma = -\frac{\Delta\mu}{k_B T}$

Energia di attivazione dei processi atomici E_A
(desolvatazione, attaccamento, possibili riarrangiamenti strutturali)

Fluttuazioni della soluzione



Sequenza di immagini LP-TEM ottenute per una soluzione di Au_2Cl_6 contenente citrato. Nel cerchio nero è visibile il nucleo nascente di una particella di Au che non riesce a raggiungere le dimensioni necessarie per la crescita spontanea: esso subisce fluttuazioni nelle dimensioni ed infine scompare. Barra di scala 200 nm [7].



Meccanismi multistadio

Vengono riportate numerose esempi di meccanismi multistadio nella formazione di cristalli

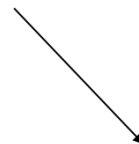
Formazione di una **fase amorfa** e/o **metastabile**

- Limitazioni cinetiche
- Inversione di stabilità a basse dimensioni



Formazione diretta:

- Crescita sotto la superficie della particella
- La fase più stabile crescendo consuma quella meno stabile



Formazione indiretta:

- Dissoluzione e crescita nella soluzione
- Avviene secondo i rispettivi prodotti di attività delle fasi

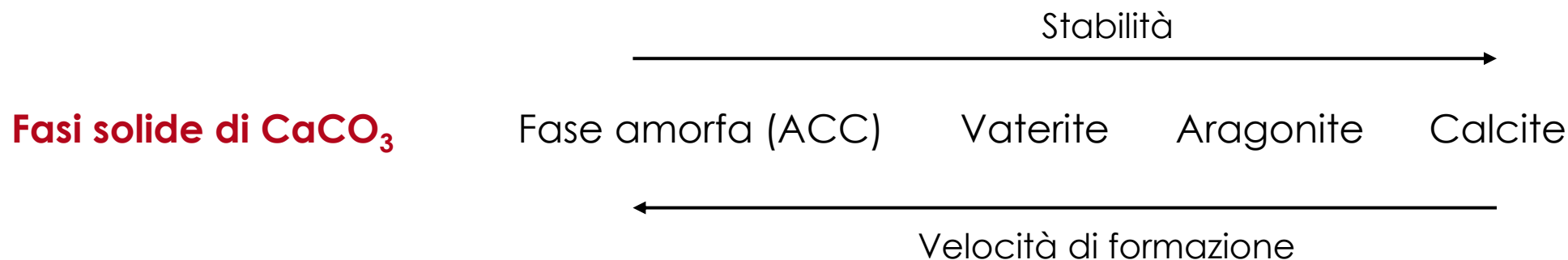


Accrescimento per meccanismo indiretto di CaCO_3

In una soluzione altamente sovrasatura i **prodotti di attività** di **tutte le fasi solide** sono **oltre il limite di solubilità**, quindi tutte le fasi iniziano a formarsi ma a **velocità diverse**:

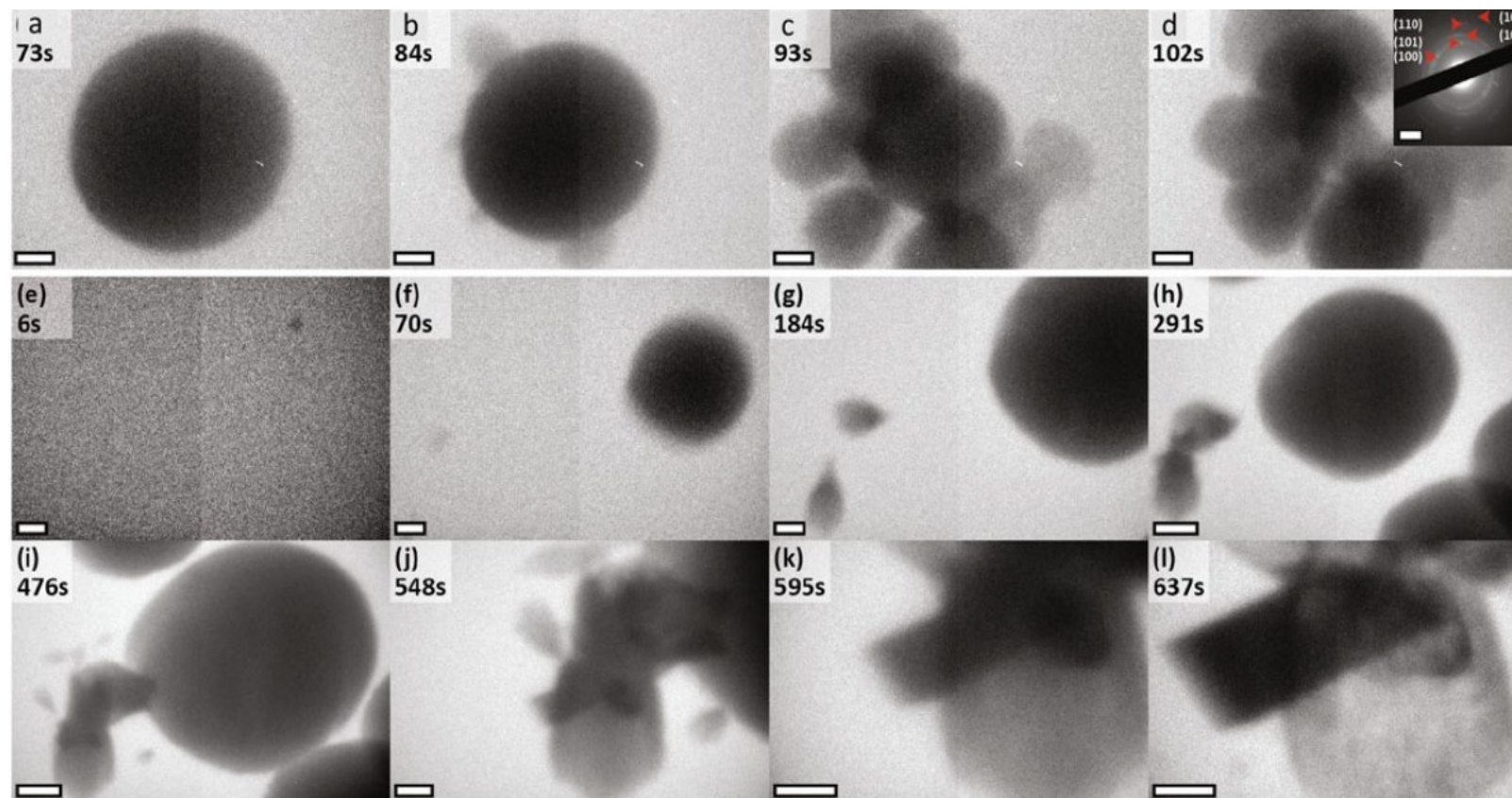
- La solubilità $\sigma = -\frac{\Delta\mu}{k_B T}$ è maggiore per le fasi più stabili
- Il fattore cinetico E_A e l'energia superficiale γ sono inferiori per le fasi metastabili, soprattutto se amorfe o idrate

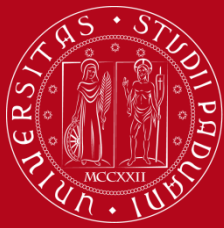
Ostwald step rule: la formazione di fasi metastabili avviene più rapidamente di quelle stabili



Accrescimento per meccanismo diretto e indiretto di CaCO_3

(a-d) Nucleazione e crescita diretta di vaterite con consumo di ACC, (e-i) Nucleazione e crescita di vaterite e aragonite. (i-l) Crescita indiretta di calcite e contemporanea dissoluzione dell'aragonite. Immagini ottenute tramite LP-TEM. Barre di scala (a-g, j-l) 500 nm, (h-i) 1 μm [12].





Nucleazione eterogenea

In ambiente biologico la nucleazione avviene prevalentemente come eterogenea su **substrati stabilizzanti e templanti**.

Energia effettiva dell'interfaccia [6]

L'interfaccia cristallo-liquido (cl) è parzialmente sostituita da quella cristallo-substrato (cs),
l'energia superficiale dell'interfaccia può essere espressa come

$$\gamma_{het} = \gamma_{cl} + h (\gamma_{cs} - \gamma_{ls})$$

$$\gamma_{cs} \leq \gamma_{cl} \Rightarrow \gamma_{het} \leq \gamma_{homo}$$

γ_{ls} interfaccia liquido-substrato
 h dipende dalle proporzioni del nucleo

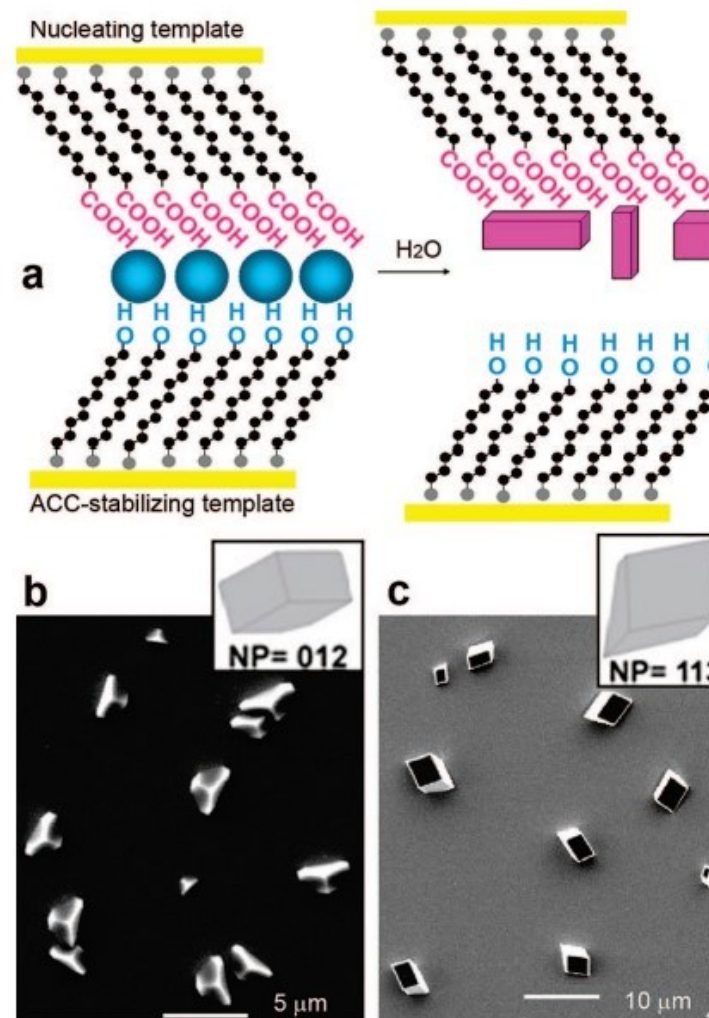
L'interfaccia cristallo-substrato
non genera penalità (=) o riduce l'energia (<) libera di formazione della nuova fase.

Nucleazione eterogenea

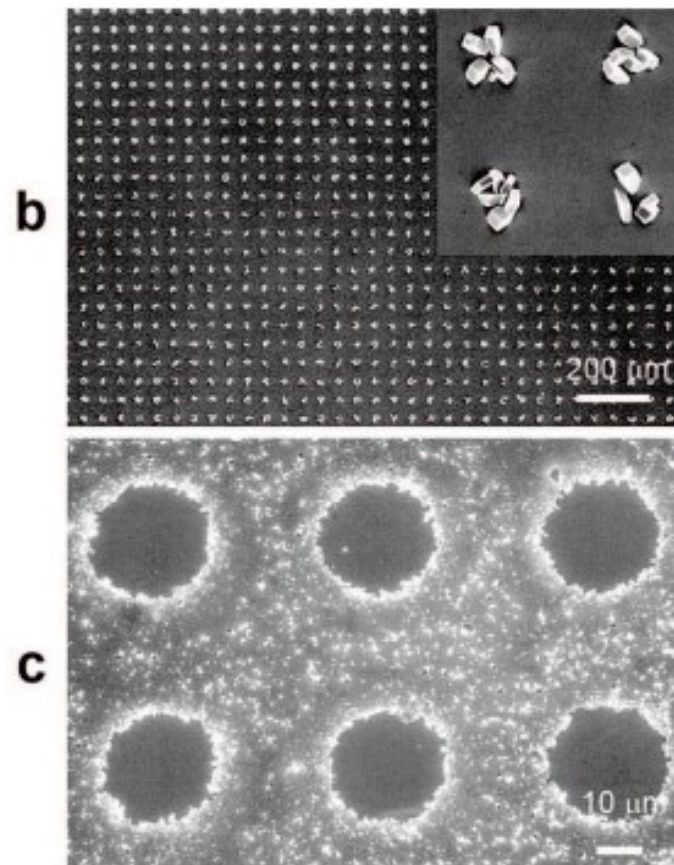
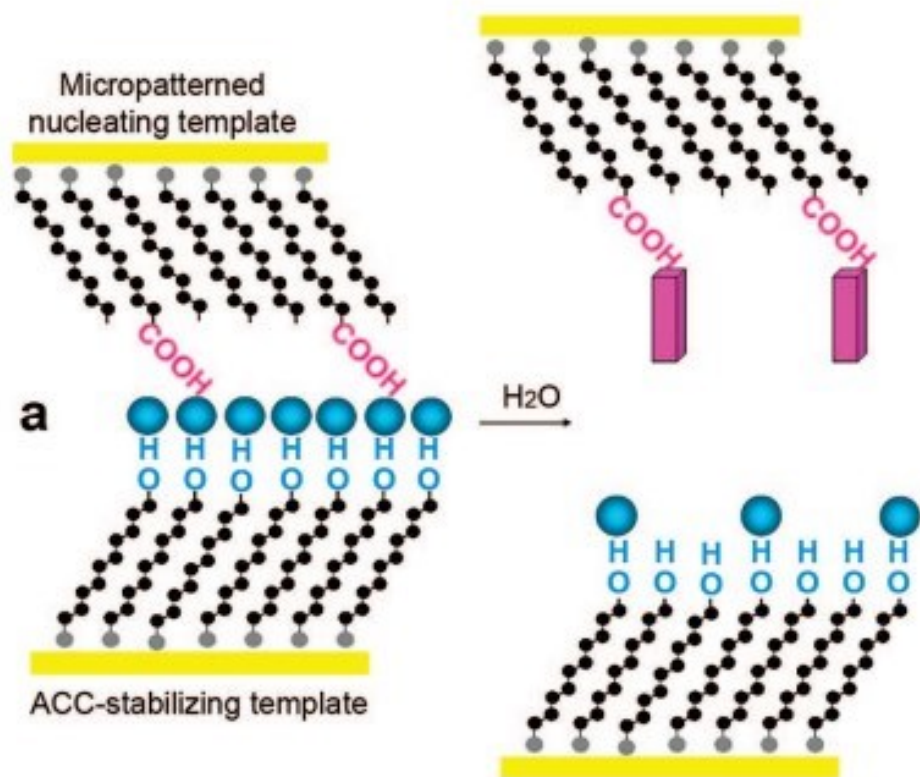
La stabilizzazione di ACC come precursore alla fase cristallina è stata ottenuta attraverso l'introduzione di additivi quali Mg, macromolecole biologiche e polimeri sintetici.

Sono stati prodotti substrati biomimetici funzionalizzati per ottenere il controllo:

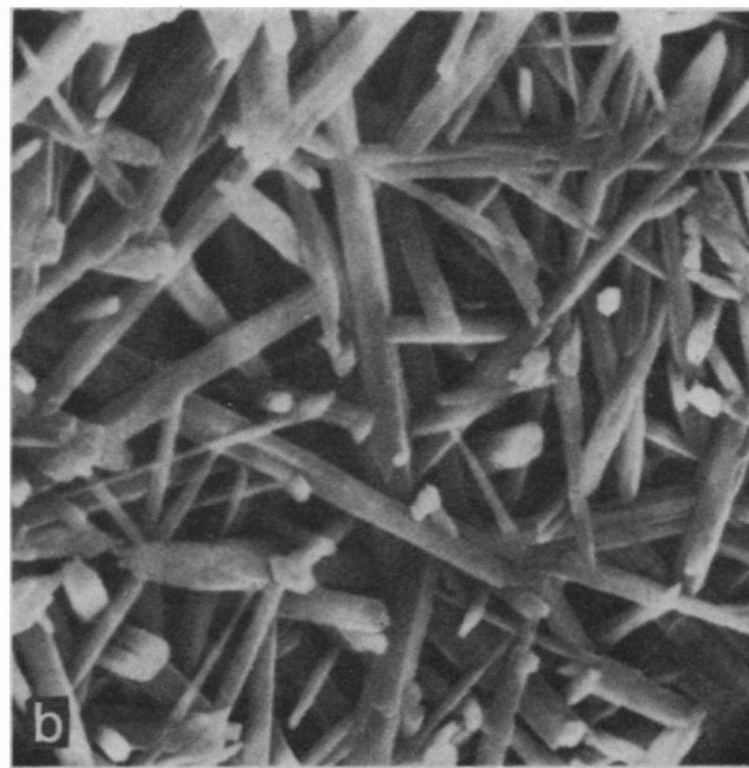
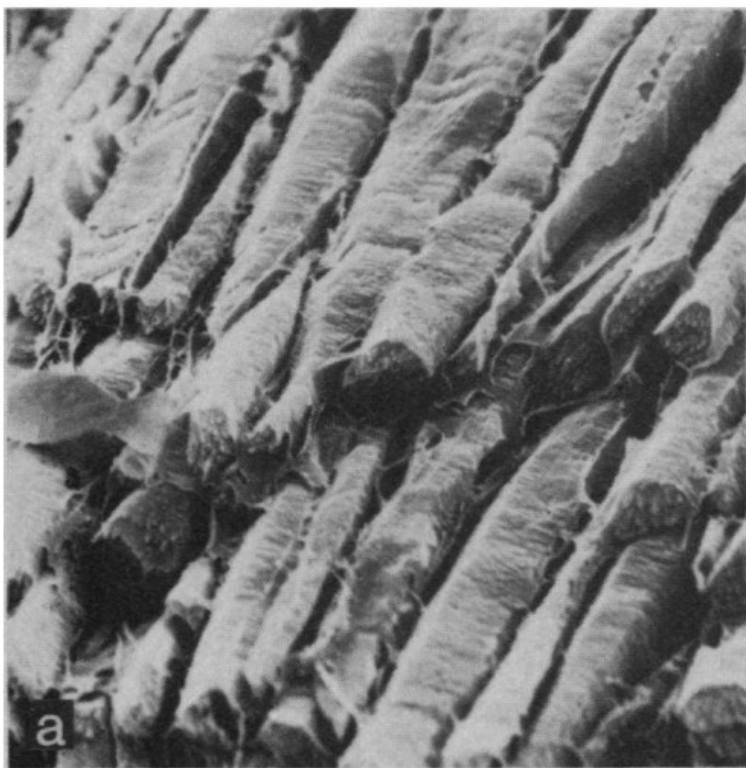
- sull'**orientazione** dei cristalli
- sui **pattern** di cristallizzazione



(a) Rappresentazione schematica della precipitazione di una fase stabile di ACC (azzurro) su un monostrato self-assembled funzionalizzato con gruppi ossidrilici biologicamente rilevanti e cristallizzazione di calcite orientata (rosa) indotta con un secondo layer template terminato con -COOH. (b,c) Immagini SEM della calcite orientata (012) (b) e (113) (c) ^[13].



(a) Rappresentazione schematica della cristallizzazione diretta di calcite orientata (012) con consumo di ACC su substrati secondari decorati con un micro-pattern di siti di nucleazione. (b) Immagine del reticolo regolare di calcite orientata (012). (c) Pattern opposto lasciato sul film di ACC [13].



(a) Biomineralizzazione mediata da una matrice nella bivalve *Mytilus californianus*: strati di calcite prismatica circondati dalla matrice organica. (b) Mineralizzazione indotta nell'alga *Galaxura obtusata*: disposizione intracellulare di cristalli di aragonite con orientazione randomica [3].

Matrici macromolecolari

I sistemi di biomineralizzazione negli organismi più evoluti prevedono spesso che **nucleazione** e **accrescimento** avvengano all'interno di **matrici macromolecolari idrate** ricche di **biopolimeri** con **catene laterali cariche**, che:

- stabilizzano la fase amorfa
- inducono cristallizzazione
- determinano l'orientazione dei cristalli

Matrici macromolecolari

Le macromolecole cariche immobilizzate nelle matrici, in particolare i **polisaccaridi**, **concentrano** gli ioni dei minerali tramite **legami ionici**, ottenendo:

- Un **aumento** del fattore cinetico E_A
- Un **aumento** della sovrasaturazione locale σ
- Nucleazione localizzata

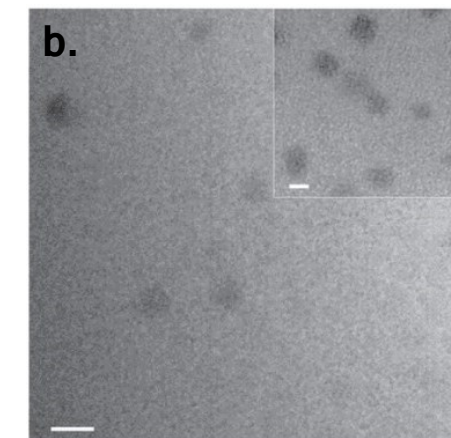
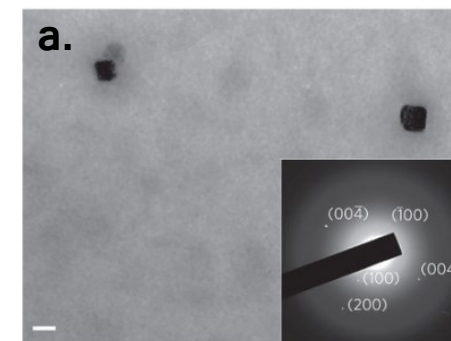
Effetto di macromolecole di polistirene sulfonato (PSS) sulla nucleazione di CaCO_3 ^[15]

Metodo: diffusione di CO_2 in soluzioni di CaCl_2 in celle di Si_3N_4

Risultati: Senza PSS (a.) → Crescita di **vaterite** non controllata

Con PSS (b.) → Formazione di **complessi globulari di Ca^{2+} - PSS**

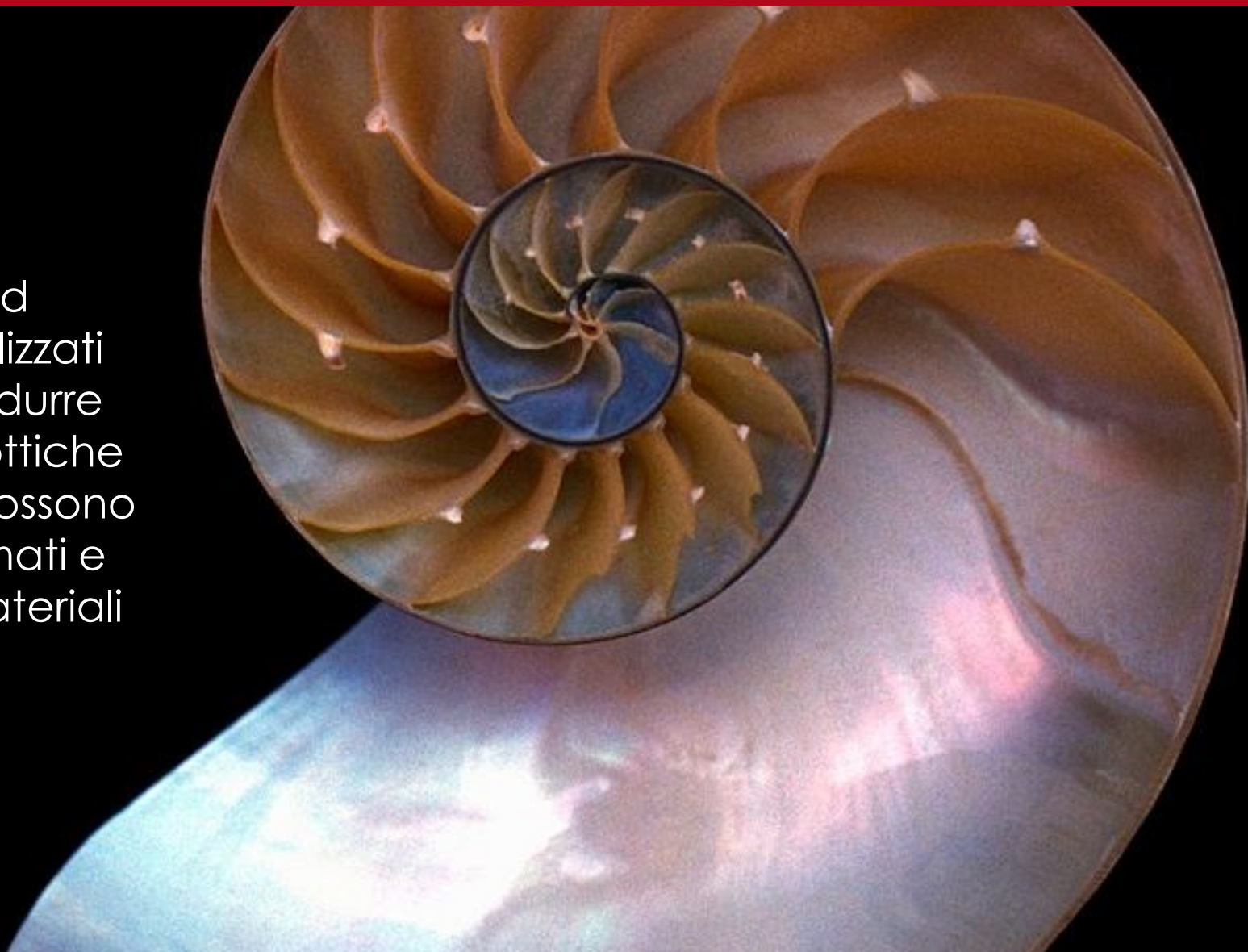
→ Nucleazione di **ACC** solo all'interno dei globuli





Conclusioni

I meccanismi di nucleazione ed accrescimento dei minerali utilizzati dagli organismi viventi per produrre strutture solide con proprietà ottiche e meccaniche sorprendenti possono essere presi ad ispirazione, mimati e sfruttati per realizzare nuovi materiali funzionali





Ringraziamenti

Ringrazio la Prof.ssa Alberta Ferrarini per avermi guidata nella stesura di questa tesi e per essersi sempre resa disponibile quando necessario.

Ringrazio la mia famiglia per avermi sostenuta negli studi e per essermi stata vicina nonostante la distanza.

Ringrazio Matteo per essere il mio miglior insegnante e per aver creduto in me più di quanto abbia fatto io.



Bibliografia

- [1] H. D. Holland, K. K. Turekian, 'Treatise on Geochemistry', *Elsevier Sci.*, 105-162 (2014).
- [2] R. R. Crichton, 'Biological Inorganic Chemistry', *Elsevier Sci.*, 359-378 (2012).
- [3] H. A. Lowenstam, 'Minerals Formed by Organisms', *Science* 211, 1126-1131 (1981).
- [4] S. Weiner, L. Addadi, 'Biomineralization: Mineral formation by organisms', *Phys. Scr.* 89, 098003 (2014).
- [5] L. Addadi, S. Weiner, 'Crystallization Pathways in Biomineralization', *Ann. Rev. Mater. Res.* 41, 21-40 (2011).
- [6] P. Vekilov, J. De Yoreo, 'Principles of Crystal Nucleation and Growth', *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 57-93 (2003).
- [7] M. Nielsen, D. Li, H. Zhang, S. Aloni, T. Han, C. Frandsen, J. Seto, J. Banfield, H. Cölfen, J. De Yoreo, 'Investigating Processes of Nanocrystal Formation and Transformation via Liquid Cell TEM', *Microsc. Microanal.* 20, 1-12 (2014a).
- [8] D. A. Porter, K. E. Easterling, M. Y. Sherif, 'Phase Transformations in Metals and Alloys', CRC Press (Boca Raton, 2009).
- [9] D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, 'Stable prenucleation calcium carbonate clusters', *Science* 322, 1819-1822 (2008).



Bibliografia

- [10] D. Gebauer, M. Kellermeier, J. D. Gale, L. Bergström, H. Cölfen, 'Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallization', *Chem. Soc. Rev.* 43, 2348–2371 (2014).
- [11] E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. Goos, P. M. Frederik, G. De With, N. Sommerdijk, 'The initial stages of template-controlled CaCO₃ formation revealed by Cryo-TEM', *Science* 323, 1455–1458 (2009).
- [12] M.H. Nielsen, S. Aloni S, J. De Yoreo, 'In situ TEM imaging of CaCO₃ nucleation reveals coexistence of direct and indirect pathways', *Science* 345, 1158–1162 (2014b).
- [13] J. Aizenberg, T. Y. Han, 'Calcium Carbonate Storage in Amorphous Form and Its Template-Induced Crystallization', *Chem. Mater.* 20, 1064–1068 (2008).
- [14] P. Smeets, K. Cho, R. Kempen, N. Sommerdijk, J. De Yoreo, 'Calcium carbonate nucleation driven by ion binding in a biomimetic matrix revealed by in situ electron microscopy', *Nat. Mater.* 14, 394–399 (2015).
- [15] R. Demichelis, A. Schuitemaker, N.A. Garcia, K.B. Koziara, M. De La Pierre, P. Raiteri, J.D. Gale, 'Simulation of Crystallization of Biominerals', *Ann. Rev. Mater. Res.* 48, 327–352 (2018).
- [16] A.E.S. Van Driessche, M. Kellermeier, L. G. Benning, D. Gebauer, 'New Perspectives on Mineral Nucleation and Growth', *Springer (Cham)*, 2017).