

# Biologisch „inspiriertes“ Design von mikrostrukturierten Einkristallen\*\*

Dario Braga\*

## Stichwörter:

Amorphe Stoffe · Calciumcarbonat · Kristall-Engineering · Kristallzüchtung · Mikrostrukturierung

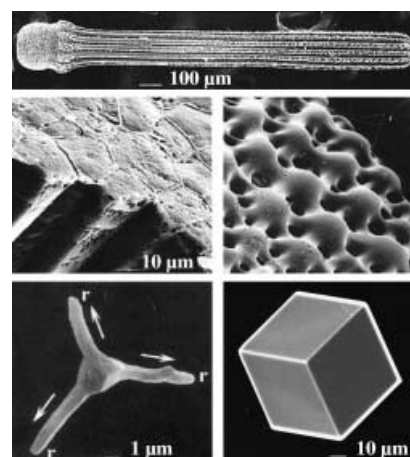
**K**ristalle faszinieren uns seit jeher,<sup>[1]</sup> und dennoch ist die Kristallisation, der eigentliche Prozess der Kristallbildung also, noch weitgehend rätselhaft.<sup>[2]</sup> Es gibt kein „Rezept“ um vorherzusagen, welche Form, Größe oder Symmetrieklasse Kristalle haben werden, die etwa aus einer Lösung einer neuen Verbindung kristallisieren. Genauso wenig lässt sich angeben, ob ein Kristall thermodynamisch stabil oder metastabil sein wird, ob er bei Temperatur- oder Druckänderungen Phasenübergänge zeigt oder ob er bei der Kristallisation Lösungsmittelmoleküle einschließt. In den meisten Fällen können wir nicht einmal sagen, ob ein Pulver oder Einkristalle, ein amorphes Material oder alles zusammen entstehen wird.

Viele der interessantesten Feststoffe sind amorph (und somit auch schwierig zu charakterisieren),<sup>[3]</sup> was dem guten Glauben vieler Wissenschaftler, mich eingeschlossen, an das molekulare Design von Kristallen zuwiderläuft.<sup>[4]</sup> Natürlich kann man Kristalle durch Wahl der Bausteine und/oder der Kristallisationsbedingungen gezielt entwerfen – um aber einen Kristall zu erhalten, der auch einen praktischen Nutzen hat, müssen seine Größe, Form und häufig auch seine Orientierung so gesteuert werden, wie es die gewünschte Funktion

erfordert. Kristalline Stoffe finden zurzeit wichtige Anwendungen in der Optik, Mikroelektronik, für biomedizinische Implantate, Gassensoren, -fallen und -reservoirs, für Trenntechniken und in der Katalyse. Die Anforderungen an ein Kristall-Engineering schließen eine hohe Übertragbarkeit und genaueste Reproduzierbarkeit ein; selbst das kleinste Fragment, sichtbar nur unter dem Mikroskop, verlangt eine gegenseitige Erkennung und Organisation von Milliarden von Molekülen oder Ionen.

In der Natur finden sich hoch spezialisierte Materialien, die so gezielt konstruiert sind, dass sie spezielle biologische Funktionen erfüllen können; dafür müssen die Kristalle vielleicht spezielle Formen oder kristallographische Orientierungen<sup>[5]</sup> annehmen oder bestimmte Abmessungen aufweisen. Zum Beispiel sind Knochen und Molluskenschalen aus polykristallinem Material aufgebaut, während etwa das gesamte Skelettelement von Stacheln und Platten des Seeigels ein einziger großer Kristall ist. Eine faszinierende Vorstellung, dass die eigentümlichen Formen vieler Biomineralien perfekten Einkristallen entsprechen (Abbildung 1)! Können wir vielleicht von der Natur lernen, wie man maßgeschneiderte Kristalle baut? Dieses Highlight erzählt von einer Erfolgsgeschichte: der gezielten Herstellung von mikrostrukturierten Einkristallen mithilfe einer biologisch inspirierten Strategie.

In der Natur dienen amorphe Stoffe häufig als Reservoir für ein kristallines Material. Zum Beispiel entstehen biogene Calciumcarbonat-Einkristalle (in den drei Formen Calcit, Aragonit und Vaterit) meist durch Umwandlung von



**Abbildung 1.** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von biogenen und synthetischen Calcitkristallen. Oben: Stachel eines Seeigels (Calcit-Einkristall), Mitte links: Molluskenschale (kristallin-organisches Komposit), Mitte rechts: Mikrolinsensystem eines Schlängensterns (Calcit-Einkristall), unten links: Spiculum einer Seeigellarve (Amorph-kristallin-Umwandlung), unten rechts: synthetisch gezüchteter Calcitkristall.

amorphem Calciumcarbonat (ACC).<sup>[6]</sup> Eine amorphe Form von Calciumcarbonat-hydrat kann in vitro aus hochgesättigten Lösungen erhalten werden.<sup>[7]</sup> Diese Phase ist metastabil und verwandelt sich schnell in kristallines Calciumcarbonat (in Form von Calcit, Vaterit oder Aragonit), wenn nicht mit Additiven stabilisiert wird.<sup>[8]</sup> In biologischen Umgebungen wird ACC durch Makromoleküle stabilisiert, die Hydroxyminosäure-, Glycin-, Glutamat-, Phosphat- oder Polysaccharidgruppen enthalten.<sup>[3b,9]</sup>

Ein kristalliner Zustand definiert sich durch eine geordnete Verteilung von Molekülen und Ionen im Kristallvolumen, wohingegen ein amorphes Material keinerlei Periodizität aufweist.

[\*] Prof. D. Braga  
Department of Chemistry  
The University of Bologna  
Via F. Selmi 2, 40126 Bologna (Italien)  
Fax: (+39) 051-209-9456  
E-mail: dbraga@ciam.unibo.it

[\*\*] Ich danke Prof. L. Addadi und F. Grepioni für wertvolle Hinweise. Die hier verwendeten Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. J. Aizenberg zur Verfügung gestellt.

Ein amorpher Feststoff erscheint unter dem polarisierten Licht isotrop und erzeugt im Unterschied zu Kristallen keine charakteristischen Röntgenbeugungsmuster. Wegen dieses Mangels an Strukturinformation ist die vollständige Charakterisierung einer amorphen Phase schwierig. Im Falle von ACC wurde mithilfe von EXAFS-Experimenten (EXAFS (= erweiterte Röntgenabsorptionsfeinstruktur) liefert Informationen über die lokale Ordnung in der Umgebung ausgewählter Atome) nachgewiesen, dass biogenes amorphes ACC nicht aus einer einzelnen Phase besteht, sondern aus einer Familie von wenigstens drei unterschiedlichen Formen. Sie haben ungefähr die gleiche Zusammensetzung wie Monohydrocalcit und unterscheiden sich untereinander hauptsächlich durch die Zahl der Calciumatome in der ersten, zweiten und dritten Koordinationssphäre.<sup>[10]</sup> Die Unterschiede zwischen den amorphen Phasen hängen vom produzierenden Organismus ab und scheinen genetisch bedingt zu sein. Jeder Hinweis über die Faktoren, die die Biogenese von ACC und die anschließende Kristallisation zu einer funktionalen Struktur steuern, wäre für die gezielte biomimetische Konstruktion kristalliner Funktionsmaterialien fundamental wichtig.

Whitesides und Aizenberg et al. haben gezeigt, wie mithilfe geordneter funktionalisierter Template eine kontrollierte Kristallisation möglich ist. Zum Beispiel können selbstorganisierte Monoschichten (SAMs) aus  $\omega$ -terminierten Alkanthiolen auf Gold- oder Silberträgern<sup>[11a]</sup> als Template zur Bildung von Calcitkeimen in unterschiedlichen kristallographischen Orientierungen genutzt werden.<sup>[11b]</sup> Eine weit bessere Kontrolle wurde durch eine Kombination von SAMs und Mikrostrukturierung erreicht. Durch Variation der SAM, der Konzentration der Lösung und/oder der Eigenschaften der Abscheidungsfläche gelang es, hochaufgelöste Muster und multikristalline Anordnungen von Calciumcarbonat-Mikrokristallen mit maßgeschneiderter Größe, kristallographischer Orientierung und Kristallisationskeimdichte zu erzeugen.<sup>[12]</sup>

Aizenberg et al.<sup>[13]</sup> kombinierten SAMs, Mikrostrukturierung und die kontrollierte Umwandlung von instabi-

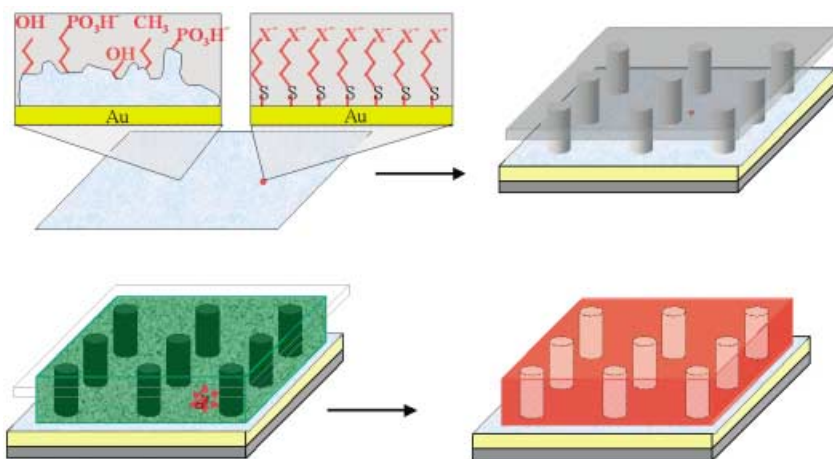
lem ACC zur Herstellung von großen mikrostrukturierten Calcit-Einkristallen ausgehend von einer einzigen Keimbildungsstelle, nämlich einer Nanoregion bestehend aus einer SAM.<sup>[13]</sup> Bei dieser Kristallisationsstrategie wird das mikrostrukturierte Muster durch Photolithographie erzeugt und dient dazu, die Mikrostruktur des metastabilen ACC zu generieren. Diese Mikrostruktur wird in der Einkristallstruktur beibehalten, da der Übergang vom amorphen in den kristallinen Zustand an der SAM-Region einsetzt. Die ACC-Bildung wird durch Funktionalisierung des Substrats mit Methyl-, Phosphat- und Hydroxygruppen gesteuert, während die Amorph-kristallin-Umwandlung dadurch gelenkt wird, dass man auf dem strukturierten Substrat (unter dem späteren ACC-Film) nur eine einzige Calcit-spezifische Keimbildungsstelle einbaut. Abbildung 2 soll dieses Experiment verdeutlichen:

- Zuerst wurde unter Anwendung einer Photoresist-Technik eine Templatestruktur bestehend aus äquidistanten Säulen auf einem Glasobjektträger hergestellt.
- Das Glassubstrat wurde mit einer transparenten, 5–10 nm dicken Schicht aus Gold (oder Silber) überzogen.
- Mit der Spitze eines Rasterkraftmikroskops wurde ein Nanobereich einer SAM aus  $\text{HS}(\text{CH}_2)_n\text{A}$  ( $\text{A} =$

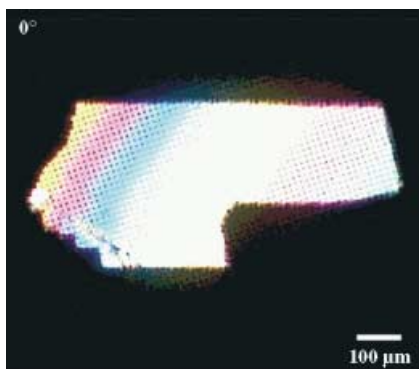
$\text{OH}$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{SO}_3\text{H}$ ) auf der Metalloberfläche abgeschieden; an dieser Stelle setzt später die Calcit-Keimbildung ein.

- Die Metalloberfläche in der Umgebung der SAM wurde mit einem Gemisch aus Alkanthiolen unterschiedlicher Länge mit Phosphat-, Methyl- und Hydroxy-Endgruppen bedeckt, wobei eine ungeordnete organische Oberfläche entstand, die die Calcit-Keimbildung hemmt und die Bildung von ACC begünstigt.
- Das funktionalisierte Substrat wurde mit einer dünnen Schicht aus gasdurchlässigem Polydimethylsiloxan (PDMS) bedeckt.
- Zur ACC-Abscheidung wurde das so vorbereitete Substrat in einer 1M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung in einem Exsikkator platziert, der außerdem  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Pulver enthielt, sodass durch Diffusion von  $\text{CO}_2$  durch die PDMS-Schicht metastabiles ACC zwischen den äquidistanten Säulen gebildet wurde.

Nach ungefähr 30 min setzte die Keimbildung von kristallinem Calcit aus dem metastabilen ACC an der SAM-Keimbildungsstelle ein. Das Wachstum des Calcitkristalls erfolgte zwischen den mikrostrukturierten Säulen unter Bildung eines großen (bis zu 1 mm) mikrostrukturierten Calcit-Einkristalls (Abbildung 3).<sup>[13]</sup> Die Porengröße des kristallinen Materials ist grö-



**Abbildung 2.** Versuchsaufbau bei der Kristallisationsstrategie nach Aizenberg et al.<sup>[13]</sup> Oben links: Eine SAM-Keimbildungsstelle wird mit der Spitze eines Rasterkraftmikroskops auf die Gold- oder Silberoberfläche implantiert, anschließend wird die Umgebung mit ACC-stabilisierenden organischen Molekülen bedeckt. Oben rechts: Beschichtung mit permeablem inertem PDMS. Unten links: Abscheidung von ACC; die Keimbildung eines Calcit-Einkristalls setzt am SAM-Keim ein. Unten rechts: Wachstum des mikrostrukturierten Calcit-Einkristalls.



**Abbildung 3.** Aufnahme eines mikrostrukturierten Calcit-Einkristalls im polarisierten Licht.

ber als die des ACC, vermutlich weil überschüssiges Hydratwasser im ACC von Mikrokanälen an den Säulen abgeleitet wird. Es wurde beobachtet, dass Fehler in der Mikrostruktur zum Abbruch des Kristallwachstums in bestimmten Richtungen führten und letztlich die makroskopische Form des Kristalls bestimmten.

Eine zentrale Entdeckung war, dass die Mikrostrukturen mehrere Rollen für das Kristallwachstum spielen, die über die Bestimmung der Form hinausgehen. Dazu gehören die „Drainagewirkung“ bei der Freisetzung von Wasser (und eventuell anderen Verunreinigungen) während der Umwandlung vom amorphen in den kristallinen Zustand und der Abbau von Spannungen, sodass große fehlerfreie Einkristalle gezüchtet werden können.

Bei ihren Kristalldesign-Experimenten griffen Aizenberg et al. auf drei allgemeine Prinzipien der natürlichen Biomineralisation zurück: 1) Biokristalle wachsen gewöhnlich innerhalb organischer Gerüste, die die Mineralabscheidung auf vorbestimmte räumliche Muster einschränken.<sup>[14]</sup> 2) Biogene Calcit-Einkristalle bilden sich häufig durch Umwandlung einer instabilen amorphen ACC-Phase, die durch Phosphat-, Hydroxy- und Methyl-funktionalisierte Moleküle stabilisiert ist (wie oben diskutiert). 3) Die kristallographische Orientierung des Kristallwachstums in lebenden Organismen beruht auf einer orientierten Keimbildung an wohldefinierten chemisch modifizierten, intrazellulären Stellen. Durch Anwendung dieser drei Prinzipien kann die Bildung künstlicher Kristalle auf molekularer

Ebene durch organisierte Systeme ausgewählter organischer Moleküle gesteuert werden.

Die erfolgreiche Züchtung von Makrokristallen mit erwünschter kristallographischer Orientierung und Mikrostruktur beruht auf der Verwendung eines gezielt synthetisierten Templates mit maßgeschneiderten chemischen und strukturellen Eigenschaften. Durch Verwendung geeigneter Reagentien zur Oberflächenstrukturierung ist es möglich, die Bildung einer instabilen amorphen ACC-Phase mit einer längeren Lebensdauer zu steuern sowie die ACC-Phase in einer Weise zu derivatisieren, an die sich die anschließend konstruierten Einkristalle „erinnern“. Dies gelingt, indem auf dem amorphen Substrat an einer geeigneten Stelle ein Keimbildungszentrum platziert wird.

Normalerweise sollte man davon ausgehen, dass die Bildung eines großen Einkristalls aus einer amorphen Phase wegen Dichteunterschieden und der Freisetzung von Verunreinigungen zu mechanischen Spannungen führt. Demgegenüber sorgt die hier vorgestellte dreidimensionale Anordnung von selbstorganisierten biologischen Makromolekülen und/oder Zellen als Templates für einen Abbau von Spannung und die Beseitigung von Verunreinigungen, sodass große mikroporöse Einkristalle entstehen können. Bemerkenswerterweise haben die Kanäle des synthetischen Kristalls einen ähnlichen Durchmesser (< 10 μm) wie die Kanäle biologisch gebildeter Calcit-Einkristalle. Dies legt die interessante These nahe, dass die hier beschriebenen Mechanismen für die Bildung analoger Strukturen in der Natur unmittelbar relevant sind.

Zusammengefasst haben Aizenberg et al. eine neue biologisch inspirierte Strategie zum Kristalldesign beschrieben, die sich unter Verwendung von organisch modifizierten dreidimensionalen Templates mit integrierten Keimbildungsstellen die kontrollierte Umwandlung vom amorphen in den kristallinen Zustand zunutze macht. Die Tauglichkeit dieses Konzept wurde anhand der Kristallisation von Calciumcarbonat demonstriert, wobei die direkte Herstellung millimetergroßer Einkristalle mit maßgeschneidertem μm-Muster und einer kontrollierten kristallographischen

Orientierung gelang. Der diesem Prozess zugrundeliegende Mechanismus kann zu einem allgemeinen Bottom-up-Ansatz für die gezielte Herstellung von orientierten, mikrostrukturierten kristallinen Materialien führen und letztlich zur Klärung der Frage beitragen, wie Organismen im Laufe der Evolution ihre ausgeklügelten mineralisierten Nanostrukturen entwickelt haben. Die in Aussicht stehenden Anwendungen des biologisch inspirierten Kristalldesigns kennen nur eine Grenze: die Fantasie des Forschers!

- [1] G. R. Desiraju, *Nature* **2003**, 423, 485.
- [2] P. Ball, *Nature* **1996**, 381, 648.
- [3] a) L. Addadi, M. Geva, *CrystEngComm* **2003**, 5, 140; b) J. Aizenberg, G. Lambert, S. Weiner, L. Addadi, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 32.
- [4] a) D. Braga, G. R. Desiraju, J. Miller, A. G. Orpen, S. S. Price, *CrystEngComm* **2002**, 4, 500; b) D. Braga, *Chem. Commun.* **2003** (Advance Article, DOI: 10.1039/b306269b).
- [5] a) S. Mann, *New Sci.* **1990**, 42; b) S. Mann, *Biomineralization. Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, **2001**; c) H. Cölfen, S. Mann, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 2452; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 2350.
- [6] a) E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, *Proc. R. Soc. London Ser. B* **1997**, 264, 461; b) L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 959.
- [7] J. Johnston, H. E. Merwin, E. D. Williamson, *Am. J. Sci.* **1916**, 41, 473.
- [8] a) S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, *Adv. Mater.* **2000**, 12, 38; b) E. Loste, F. C. Meldrum, *Chem. Commun.* **2001**, 901.
- [9] J. Aizenberg, G. Lambert, L. Addadi, S. Weiner, *Adv. Mater.* **1996**, 8, 222.
- [10] a) Y. Levi-Kalishman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3977; b) Y. Levi-Kalishman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 43.
- [11] a) A. Kumar, N. L. Abbott, E. Kim, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 219; b) J. Aizenberg, A. J. Black, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4500.
- [12] J. Aizenberg, A. J. Black, G. M. Whitesides, *Nature* **1999**, 398, 495; b) J. Aizenberg, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2000**, 3963.
- [13] J. Aizenberg, D. A. Muller, J. L. Grazul, D. R. Hamann, *Science* **2003**, 299, 1205.
- [14] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralization* Oxford University Press, Oxford, **1989**.