

# Caracterización Fisicoquímica de Biominaerales de Moluscos

2018

Katari Pablo Rocha



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización Físicoquímica de Biominerales de Moluscos**

Tesis para optar al título de Licenciado en Bioquímica

por

**Katari Pablo Rocha**

Tutor: Dr. Eduardo Méndez

Co-tutor: Dr. Santiago Botasini

Realizado en Laboratorio de Biomateriales del Instituto de Química  
Biológica de la Facultad de Ciencias (UdelaR)

Montevideo, República Oriental del Uruguay

-2018-

## Contenido

Resumen.....	4
1. Introducción .....	5
1.1. ¿Qué es un biomineral? .....	5
1.2. Características de los biominerales .....	7
1.3. ¿Por qué estudiar moluscos que sufren biomineralización?.....	8
1.4. Estructura y ultraestructura de la concha de los moluscos.....	9
1.4.1. Estructura jerárquica del nácar .....	9
1.4.2. Encastre entre plaquetas de aragonita.....	10
1.4.3. Formación de las capas prismática y nacarada de los moluscos .....	11
1.5. Descripción de las proteínas responsables de la biomineralización.....	12
1.5.1. Proteínas de la capa de nácar .....	13
1.5.2. Proteínas de la capa prismática.....	15
1.5.3. Proteínas comunes a ambas capas .....	15
2. Técnicas utilizadas para la caracterización de biominerales.....	17
2.1. Difracción de rayos X .....	17
2.1.1. Carbonatos geológicos y sintéticos .....	17
2.1.2. Carbonatos biogénicos.....	19
2.2. Espectroscopía infrarroja (FTIR) .....	20
2.2.1. Carbonatos geológicos y sintéticos .....	20
2.2.2. Carbonatos biogénicos.....	23
2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	24
Objetivo general.....	25
Objetivos específicos .....	25
3. Desarrollo experimental.....	26
3.1. Selección de las muestras .....	26
3.2. Preparación de las muestras .....	26
3.3. Difracción de rayos X (XRD) .....	27
3.4. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	27
3.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	27
3.6. Tratamiento de datos .....	28
3.6.1. Deconvolución de banda amida I en FTIR .....	28

3.6.2. Tratamiento de imágenes SEM .....	28
3.6.3. Tamaño de las cristalitas .....	28
3.6.4. Contenido de aragonita y calcita en las muestras analizadas .....	29
4. Resultados .....	30
4.1 <i>Pinctada máxima</i> .....	30
4.1.1. Identificación de los componentes del nácar y de la capa prismática .....	30
4.1.2. Matriz inorgánica.....	31
4.1.3. Matriz orgánica.....	33
4.1.4. Análisis SEM del nácar .....	34
4.2. <i>Haliotis fulgens</i> .....	34
4.2.1. Identificación de los componentes del nácar y de la capa prismática .....	34
4.2.2. Matriz inorgánica.....	35
4.2.3. Matriz orgánica.....	37
4.2.4. Análisis SEM del nácar .....	38
4.3. <i>Turbo marmoratus</i> .....	38
4.3.1. Identificación de los componentes del nácar y de la capa prismática .....	38
4.3.2. Matriz inorgánica.....	39
4.3.3. Matriz orgánica.....	40
4.3.4. Análisis SEM del nácar .....	41
5. Discusión .....	43
5.1. Análisis por XRD .....	43
5.2. Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR) .....	45
5.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	50
5.4. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas.....	50
5.5. Aspectos biológicos de la estructura de los carbonatos biogénicos .....	52
6. Conclusiones .....	54
Agradecimientos .....	55
7. Referencias.....	56
ANEXO .....	62
Detección y cuantificación de las señales en XRD .....	63

## Resumen

Los biominerales son compuestos sintetizados por seres vivos, principalmente provenientes del ambiente marino. Están formados por una matriz mineral inorgánica y en menor cantidad por una parte orgánica, la cual le confiere características bien diferentes de los minerales geológicos, en términos de forma, tamaño, cristalinidad, dureza y composición.

El presente trabajo se centra en la caracterización de la capa prismática y del nácar de las conchas de tres moluscos: *Pinctada máxima*, *Haliotis fulgens* y *Turbo marmoratus* mediante espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido. Los resultados mostraron la presencia de carbonato de calcio como componente principal, bajo la forma de aragonita y calcita, y en menor proporción por proteínas con un alto porcentaje de hoja  $\beta$  en su estructura secundaria. Éstas juegan un papel clave en los procesos de formación del biomineral, además de contar con propiedades osteogénicas.



Madreperla blanca de labio dorado (*Pinctada máxima*) (a), Abalón verde (*Haliotis fulgens*) (b) y Turbante verde (*Turbo marmoratus*) (c).

La estructura jerárquica del nácar y la capa prismática está dispuesta en tres niveles. Dentro del segundo, mediante microscopía electrónica, se evidenció la presencia de nanoestructuras laminares, autoensambladas en disposición paralela, lo cual sugiere una posible explicación de porqué el nácar de *Haliotis fulgens* o *Pinctada máxima* tienen, respectivamente, una dureza 1000 y 3000 veces mayor que la aragonita de origen geológico. Dentro de la industria joyera, estos materiales se encuentran considerados en la misma categoría que las gemas preciosas. El conocimiento de este tipo de estructuras permite entender el origen de las características tan particulares del biomineral, pudiéndose, en el futuro, crear compuestos bioanálogos con propiedades fisicoquímicas similares.

# 1. Introducción

## 1.1. ¿Qué es un biomineral?

Como su nombre lo indica, es un tipo de mineral formado por componentes inorgánicos y orgánicos, sintetizado en condiciones controladas por un organismo vivo. Los biominerales se diferencian del resto de los minerales terrestres, de naturaleza inorgánica, por presentar propiedades características diferenciadas de forma, tamaño, cristalinidad, composición isotópica y de elementos traza [1].

Hace miles de millones de años, la superficie de la Tierra primordial estaba compuesta de minerales, principalmente carbonatos, silicatos y cantidades más pequeñas de fosfatos. Éstos se encontraban principalmente disueltos en los océanos, ríos, lagos, que luego mediante lluvias llegaron a formar parte de las rocas sedimentarias. Dentro de la corteza terrestre, la estructura de estos minerales se fue transformando mediante el proceso conocido como diagénesis<sup>1</sup> pasiva, contribuyendo a la amplia gama de variantes polimorfos que hoy conocemos [2].

La aparición de la vida en los ambientes marinos añadió un componente significativo al procesamiento de los minerales, donde tanto los organismos procariotas como eucariotas tenían la habilidad de producir compuestos orgánicos, que pasaron a formar parte de los minerales de origen biogénico (biominerales). La principal reserva de los biominerales se encuentra en las conchas marinas constituyendo un gran reservorio de carbonatos, silicatos y fosfatos. Los primeros aparecen en su mayoría como calcita o aragonita, producidos principalmente por el plancton y algunos animales invertebrados. Por su parte, los fosfatos bajo la forma de hidroxiapatita son generados por animales vertebrados [2].

Los procesos básicos de la biomineralización se dividen en dos grupos según su grado de control biológico: aquellos inducidos biológicamente y aquellos mediados por una matriz orgánica [1]. En ambos casos, es requisito para la nucleación y crecimiento del cristal la existencia de una zona en condiciones de supersaturación de minerales. La nucleación del biomineral a menudo sucede en las paredes celulares. La precipitación secundaria de minerales, que surge como resultado de la interacción entre la actividad biológica y el

---

<sup>1</sup> Etapa final del ciclo sedimentario en la que una vez depositados los materiales sufren una alteración química y física que provoca, generalmente, su compactación.

medio ambiente, es llamada mineralización inducida biológicamente, siendo la heterogeneidad su sello distintivo [3], [4].

En la mineralización controlada biológicamente, el organismo usa actividades celulares para dirigir la nucleación, crecimiento, morfología y ubicación final del mineral que es depositado. El proceso de mineralización sucede en un medioambiente aislado. Esta aislación puede ser pasiva, cómo en el caso de la formación de espacios intercelulares por simple apilamiento de células; o activa donde existen vesículas capaces de crear medioambientes compartimentalizados que permiten una mejor regulación de la composición del mineral [1]. De acuerdo a la ubicación en donde ocurre la deposición se clasifican como intercelulares, intracelulares o extracelulares.

Existen dos mecanismos por los cuales la célula puede transferir constituyentes a la matriz orgánica donde se forma el biomineral. En el primero, la célula es capaz de bombear cationes a la región circundante, de manera de generar un nivel de supersaturación en el fluido extracelular que es posteriormente mantenido por difusión de iones a distancias relativamente grandes de la matriz orgánica. El segundo mecanismo involucra la concentración de los cationes en vesículas dentro de la célula, exportadas a través de la membrana y luego rotas por compuestos precursores en la matriz orgánica exterior. Algunos ejemplos de biomineralización mediante este tipo de proceso incluyen internos ciertos foraminíferos, estatolitos de cefalópodos, conchas de moluscos, exoesqueletos de briozoos, corales escleractinios, huesos y dientes [1].

Poco se conoce acerca de las etapas tempranas del proceso de cristalización del carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ). Las fases precursoras identificadas corresponden a estructuras amorfas. Algunos autores [5], [6] destacaron el rol esencial del ion magnesio en los procesos de mineralización estabilizando la formación de los cristales de carbonato y fosfato. Los iones magnesio son principalmente responsables de controlar la cinética y la termodinámica del proceso de precipitación de carbonato de calcio, especialmente inhibiendo la formación de calcita. La precipitación de calcita a temperatura ambiente es termodinámica y cinéticamente favorable en soluciones conteniendo bajas cantidades de iones magnesio. Estos últimos, también influyen en la generación de aragonita en el proceso de cristalización.

## 1.2. Características de los biominerales

El 50 % de los biominerales conocidos contienen calcio<sup>2</sup>. El 25% de los biominerales son amorfos y por tanto no pueden ser caracterizados por difracción de rayos X. Ejemplos de éstos son los gránulos de fosfato de hierro hidratado depositados en la piel de las holoturias<sup>3</sup> [1].

De los ocho polimorfos conocidos de carbonato de calcio, siete son cristalinos y el restante es amorfo. Tres de los polimorfos, calcita, aragonita y vaterita, son carbonato de calcio puro, mientras dos de ellos, la monohidrocalcita y las formas estables de carbonato de calcio amorfo, contienen una molécula de agua por carbonato de calcio. Por su parte, las formas transitorias de carbonato de calcio amorfo no contienen agua [1].

Existen ligeras diferencias a nivel atómico entre los polimorfos de carbonato de calcio geológico y biogénico. Estudios de difracción de rayos X muestran la existencia de ligeras distorsiones anisotrópicas de la red cristalina del mineral biogénico de hasta 0.25 % de diferencia respecto al mineral geológico. Esto permite distinguir el origen (biogénico o abiótico) del carbonato de calcio. Las distorsiones estarían vinculadas a la presencia de interacciones fuertes entre las interfaces orgánica e inorgánica, características de los biominerales [7].

La aragonita biogénica presenta una alta estabilidad térmica. Se necesitan temperaturas entre 300 y 400 °C para convertir el polimorfo de aragonita en calcita, mientras que la matriz orgánica es capaz de resistir temperaturas de hasta 550 °C [8].

Los fosfatos comprenden cerca de 25 % de los tipos de minerales biogénicos. La mayoría de los minerales fosfato son producidos por mineralización controlada. El mineral fosfato producido más abundante es la hidroxiapatita carbonatada, también llamada *dahlita*, es el mineral presente en los huesos de los vertebrados y dientes, así también como en las capas de los braquiópodos [1].

Cada una de las clases de minerales incluye una o más fases que contienen grupos hidroxilo y/o moléculas de agua. Todos los biominerales de sílice son hidratados y hay evidencia de que muchos biominerales de carbonato cristalino primero se forman como

---

<sup>2</sup> Hecho por el cual antiguamente la formación de minerales se denominaba simplemente calcificación.

<sup>3</sup> Organismo marino, vulgarmente conocido como pepino de mar, de la familia *Echinodermata*.



fases hidratadas. Éstas son favorecidas sobre sus contrapartes anhidras por bajar significativamente la barrera energética para la nucleación y el crecimiento desde la solución acuosa. Los organismos favorecen la precipitación de las fases de energía más bajas [1].

Los biominerales de hierro aparecen como óxidos, hidróxidos y sulfuros. Comprenden aproximadamente el 40 % de todos los minerales formados por los organismos. Existen también los minerales puramente orgánicos como el DNA (ácido desoxirribonucleico) cristalizado por bacterias sujetas a *stress*.

### 1.3. ¿Por qué estudiar moluscos que sufren biomineralización?

El nácar es 3000 veces más duro que la aragonita de origen geológico. Estudiar este biomineral en profundidad puede dar lugar en el futuro a la creación de compuestos con propiedades fisicoquímicas similares al nácar, que pueda ser usado en áreas tan diversas como la joyería o la creación de materiales ultrarresistentes al impacto. En el área de la biomedicina, el nácar puede ser empleado para producir implantes óseos, dado que posee una alta biocompatibilidad y resistencia mecánica. Además es una fuente de sustancias bioactivas, como en el caso del nácar de *Pinctada máxima*, cuya matriz orgánica es capaz de activar las células osteogénicas, que contribuirían en la reparación de huesos dañados [9], [10].

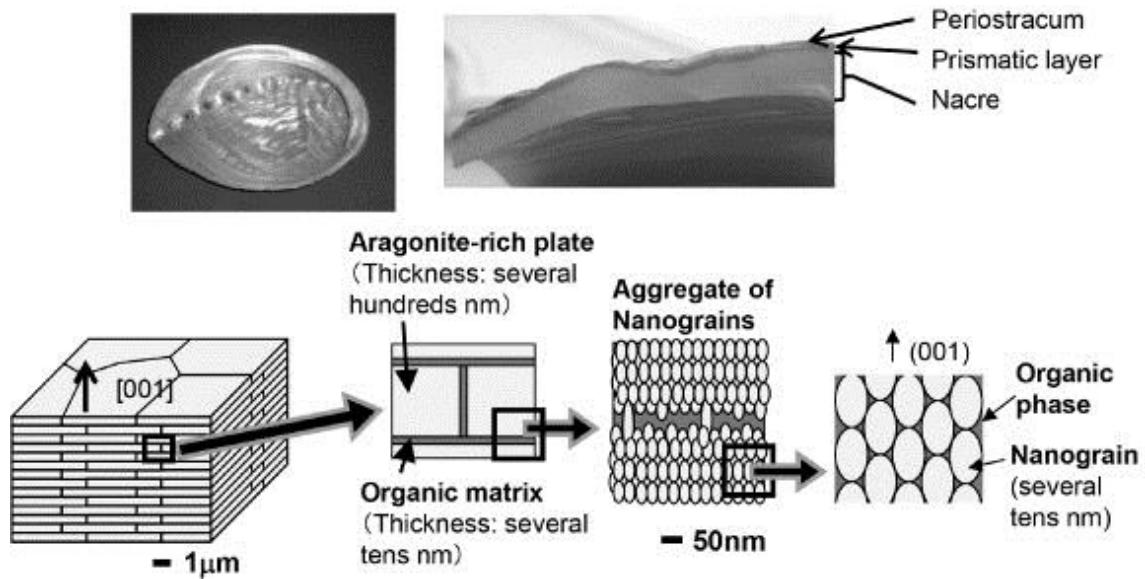
Si bien la alta resistencia mecánica, es una de las grandes ventajas del material, en la generación de implantes óseos es también una desventaja en el moldeado de piezas y en la lenta biodegradación que sufre el material, especialmente afectando la fabricación de implantes de gran tamaño. Sin embargo, se han desarrollados compositos biomiméticos [11] compuestos de nácar y materiales poliméricos, que permiten mejorar el armado de implantes, pero mantienen las propiedades osteogénicas características del nácar [8]. Otra alternativa es emplear las partículas del nácar como revestimiento de implantes de titanio, brindando una mayor adhesión, proliferación y diferenciación de los osteoblastos [12]. Al día de hoy, si bien aún hace falta seguir estudiando los biominerales de los moluscos en profundidad, existen algunas aplicaciones en marcha, enfocadas en la producción de biominerales a partir de bacterias, para la remoción de metales pesados [13], [14], radionucleídos [15], biodegradación de compuestos tóxicos, captura del CO<sub>2</sub> atmosférico, remediación de materiales de la construcción y como aditivos de gomas y plásticos [4].

## 1.4. Estructura y ultraestructura de la concha de los moluscos

La Naturaleza ha usado mecanismos de construcción tipo *bottom-up* para el diseño de estructuras de alta complejidad a través del proceso de autoensamblado (*self-assembly*) [1]. Un ejemplo claro de este tipo de construcción es el nácar, un nanocompósito natural formado por un 95 % de una fase mineral (aragonita) y un 5 % de una fase orgánica, pero que comparado con la aragonita pura, posee una fortaleza al quiebre 3000 veces mayor [16]. Esta construcción *bottom-up* determina una estructura jerárquica para el nácar que se expande en varios órdenes de magnitud, abarcando desde la nanoescala a la macroescala.

### 1.4.1. Estructura jerárquica del nácar

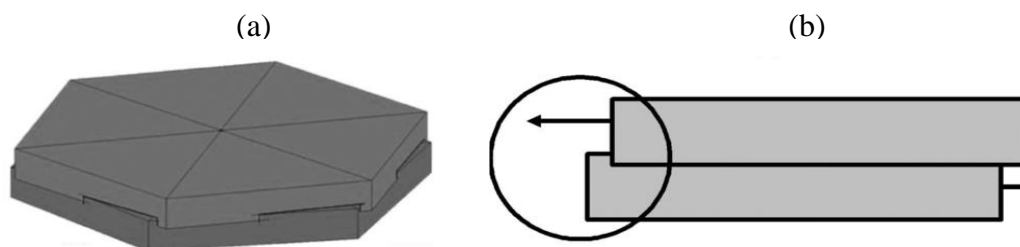
La estructura jerárquica del nácar se extiende en tres niveles (Figura 1). El nivel 1 es la capa de nácar propiamente dicha, con un espesor de *ca.* 1  $\mu\text{m}$ , formado por el autoensamblado de plaquetas de aragonita de entre 5 – 15  $\mu\text{m}$  de largo y 200 – 900 nm de espesor [17], [18]. Las plaquetas de aragonita, que definen el nivel 2 de la estructura, se encuentran apiladas de forma perpendicular al eje *c* del cristal de aragonita, siendo este último a su vez perpendicular a la superficie del molusco. Los ejes *a* y *b* no están perfectamente alineados en todas las capas del nivel 2, tal y como se deduce de las imágenes de microscopía electrónica de transmisión [2]. Entre las placas de aragonita, existe un espacio formado por proteínas y polisacáridos como la  $\beta$ -quitina, que dan cuenta de 1 – 5 % de la composición global del nácar. En este espacio de 30 – 300 nm de espesor [19], [20], y que es donde se produce la nucleación y cristalización de la aragonita. Existen también puentes minerales de 25 – 34 nm entre las plaquetas que pasan a través de poros en la matriz orgánica inter-plaquetaria. Además, las plaquetas pueden presentar nano asperezas de 30 – 100 nm de diámetro, que colaboran con la dureza del nácar. En el nivel 3 de la estructura, se encuentran los nanogranos de aragonita, de pocas decenas de nm de diámetro, que se encuentran embebidos en la fase orgánica.



**Figura 1.** Representación de la estructura jerárquica del nácar a distintos aumentos. El nivel 1 corresponde a la capa de nácar propiamente dicha, de varias micras de espesor. Al aumentar el tamaño de la imagen se aprecia el nivel 2 de la estructura, compuesto de las placas de aragonita, con un espesor en el orden de los cientos de nanómetros (200-900nm). Si se sigue amplificando la imagen, se llega al nivel 3 definido por unidades nanométricas, dispuestas en forma de granos, con un tamaño del orden de las decenas de nm. Adaptado de Ref. [17].

#### 1.4.2. Encastre entre plaquetas de aragonita

Existen algunos detalles particulares en la estructura que dan cuenta de las propiedades físicas de la misma y que explican su resistencia mecánica. Uno de ellos es el encastre entre plaquetas de aragonita [21]. Cuando dos plaquetas se encuentran apiladas (Figura 2), y rotadas un pequeño ángulo entre ellas, la plaqueta de encima envuelve a la plaqueta de abajo, penetrando de tal forma que produce un encastre. Este encastre aumenta la resistencia a la fuerza aplicada en forma paralela a las placas, y la materia orgánica que queda entre las placas aporta la elasticidad necesaria para la resistencia mecánica.

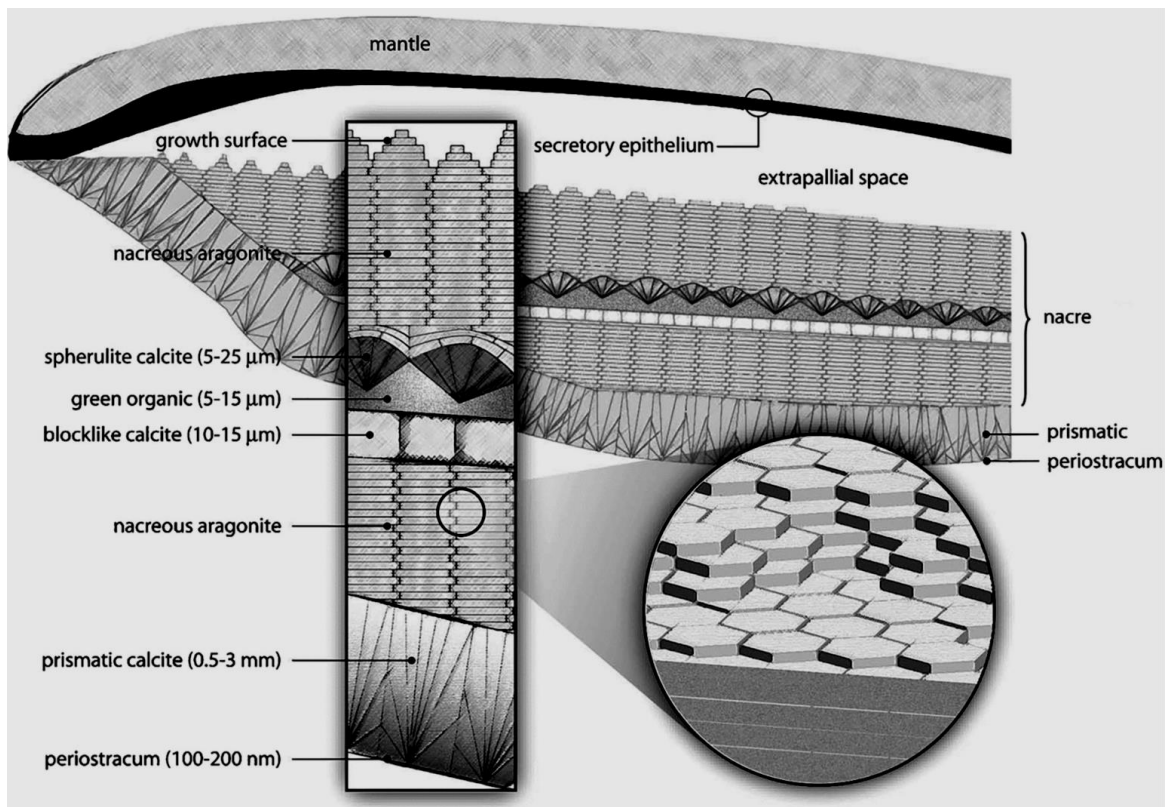


**Figura 2.** Esquema ilustrando el encastre entre plaquetas de aragonita. (a) Las plaquetas deben estar ubicadas en forma paralela entre sí, con un ligero ángulo de giro entre ambas. (b) Detalle del encastre. Adaptado de Ref [22].

### 1.4.3. Formación de las capas prismática y nacarada de los moluscos

La formación de la concha de los moluscos tiene lugar en dos fases. La primera, involucra los procesos celulares de transporte de iones y síntesis de la matriz orgánica, los cuales suceden en diferentes compartimentos del sistema de mineralización del molusco. La segunda fase consiste en una serie de procesos de nucleación y crecimiento del cristal que tiene lugar en un compartimento de mineralización especializado llamado *espacio extrapaleal* [19].

La síntesis de las capas minerales se forma a partir de los fluidos extrapaleales, una capa de proteína de entramado cruzado (*periostracum*) y las células epiteliales del manto. Los fluidos extrapaleales están en el espacio entre el epitelio secretorio del manto y la superficie de crecimiento del biomineral de aragonita. El periostracum se encuentra en el exterior de la concha adulta, y el manto está ubicado en el interior (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de la estructura interna de una ostra, detallando las estructuras de las capas prismática y de nácar. Adaptado de Ref. [3].

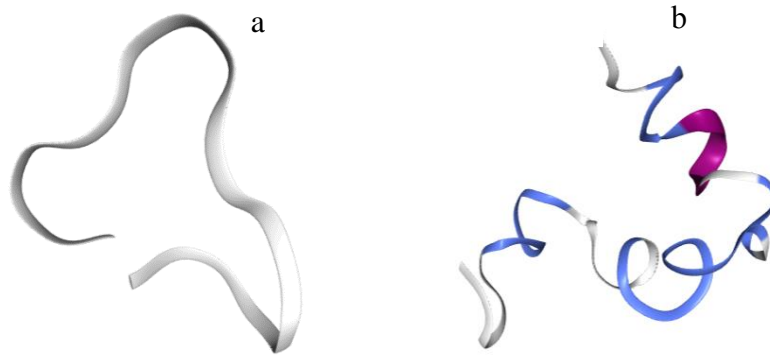
En la parte exterior del molusco se encuentra la capa prismática formada por calcita, la cual se dispone en forma de columnas perpendiculares a la superficie de la concha, y está constituida por cristales de  $\text{CaCO}_3$ . Por debajo de ésta se encuentra la capa de aragonita llamada también capa de nácar, dispuesta en conformación laminar paralela a la superficie de la concha [22].

Las células del manto producen una matriz macromolecular por fuera de la célula, en el área donde tiene lugar el proceso de mineralización. La matriz orgánica interlaminar del nácar se encuentra entre las plaquetas de aragonita, y consiste de capas finas de  $\beta$ -quitina atrapada entre capas más gruesas de una proteína de estructura similar a la fibroína de seda. Estas últimas tienen una superficie altamente regular e hidrofóbica sobre la cual se adsorben oligopéptidos ácidos. Éstos están formados por cadenas de secuencia  $[\text{Asp-X}]_n$ , ( $\text{X} = \text{Gly, Ser}$ ), las cuales tienen una tendencia a plegarse dando lugar a una conformación de hoja  $\beta$  en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Si bien la evidencia es escasa, estas glicoproteínas estarían estrechamente vinculadas en la nucleación y crecimiento de los cristales de  $\text{CaCO}_3$  en el proceso de biomineralización. [1], [19].

### 1.5. Descripción de las proteínas responsables de la biomineralización

La familia de proteínas involucradas en biomineralización son frecuentemente de estructura extendida y desordenada, de donde deriva su nombre: “proteínas desordenadas intrínsecamente” (IDPs). Presentan dominios mayoritariamente de tipo hoja  $\beta$  (Figura 4) y de ovillo estadístico. Las secuencias que tienen baja complejidad contienen grupos ácidos y/o son modificadas post-transduccionalmente formando grupos fosfatos o glicosilos. La conformación extendida de las IDPs provee una superficie de unión mucho mayor en comparación a la conformación compacta de proteínas globulares. Muchas de estas proteínas, *in vitro*, actúan como inhibidores del crecimiento de cristalino del  $\text{CaCO}_3$ , al interactuar con el retículo y bloquear los sitios de nucleación.

La conformación extendida y el carácter ácido de las proteínas facilita interacciones con contraiones como el calcio. La unión del contraión parece ser crucial en el debilitamiento de repulsión electrostática, permitiendo la formación de hojas  $\beta$ . Las proteínas involucradas en biomineralización tienen que unir muchos blancos para llevar a cabo sus funciones completamente [26].



**Figura 4.** Representación de algunas de las proteínas purificadas del Abalón *Haliotis rufescens*: Lustrina A (a) y la proteína 7 de la aragonita (b). En varios casos se destaca la predominancia de una conformación extendida plana u hoja  $\beta$ . Adaptado de Refs. [23]–[25].

Varias de las proteínas de la matriz orgánica de las conchas de los moluscos se encuentran unidas a polisacáridos (como por ejemplo la  $\beta$ -quitina) cuya función estaría vinculada al control de la formación de los polimorfos del  $\text{CaCO}_3$  al regular los procesos de nucleación y crecimiento de los cristales [27].

Las proteínas de la matriz se clasifican en base a su solubilidad después de su extracción y descalcificación empleando un ácido débil (normalmente ácido acético) o mediante un agente quelante (como el EDTA). La matriz orgánica insoluble se la conoce como conquiolina [28].

Si bien pueden existir variaciones entre especies, a continuación, se describen algunas de las familias de proteínas más comunes, vinculadas a los procesos de biomineralización de la capa de calcita y aragonita.

#### 1.5.1. Proteínas de la capa de nácar

**Lustrina A:** Fue identificada de *Haliotis rufescens*. Es una proteína multifuncional. Tiene dominios similares a los inhibidores de proteasas que protegen de la degradación de los componentes proteicos de la matriz. Tiene una estructura particular definida mayoritariamente en forma de hoja  $\beta$  y presenta un dominio de glicina y serina que le confieren propiedades elásticas. También posee una región rica en lisina y arginina, por

lo cual es capaz de interactuar con moléculas aniónicas durante formación de la concha [29], [30].

**Familia N16:** Purificada de la matriz insoluble de *Pinctada fucata*, es expresada en la región dorsal del manto y contribuye a la mineralización de la capa nacarada. La estructura secundaria contiene un alto grado de hoja  $\beta$ , de giro  $\beta$  y bajo contenido de  $\alpha$  hélices [31]. Dentro de esta familia de proteínas se destaca la proteína *perlina*, cuya estructura se encuentra formada por varios grupos sulfato unidos a mucopolisacáridos. Esta proteína tiene la capacidad de acomplejar al ion  $\text{Ca}^{2+}$  e inducir la formación de los cristales de aragonita [32].

**Familia N14:** Purificada de la capa nacarada de *Pinctada máxima*. Es expresada en la región dorsal del manto. Tiene una repetición Asn-Gly más larga que N16. Si bien la evidencia es al día de hoy escasa, su función se encontraría asociada a la formación de las capas laminares de aragonita [31].

**AP7 y AP24:** Se encuentran en la especie *Haliotis rufescens* y se caracterizan por poseer sitios de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . AP7 posee una estructura similar a la de la poliprolina tipo II, dispuesta en hebras extendidas en forma de hojas  $\beta$ , y otra región de ovrillo estadístico. AP24 también posee una estructura de tipo ovrillo estadístico y zonas elastoméricas similares a la proteína *Lustrina A*. Estas dos proteínas inhiben *in vitro* el crecimiento del  $\text{CaCO}_3$  [33].

**Perlucina:** Purificada de *Haliotis laevigata*. Es una familia de proteínas complejas cuya función está vinculada a la aceleración de la precipitación del  $\text{CaCO}_3$  y cambios en la morfología del cristal. Tiene un dominio de reconocimiento similar a la Lectina C. Tiene especificidad de unión a carbohidratos y a otras glicoproteínas en presencia de iones divalentes [28].

**Perlustrina:** Purificada de *Haliotis laevigata*. Su función estaría vinculada a las proteínas de crecimiento, como la insulina, y a la unión de hidroxiapatitas [34].

**MSI60:** Fue aislada de *Pinctada fucata*, es una proteína de matriz, y es expresada en el epitelio exterior del *pallium* del manto. Participa en la formación del nácar. Tiene repeticiones en su secuencia aminoacídica igual a la de proteínas de telarañas. Tiene bloques poli-Gly que participan en la formación de hojas  $\beta$  en la capa nacarada y bloques

de poli-Asp capaces de unir iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Además posee residuos de Cys capaces de formar puentes disulfuro intra e inter-moleculares en las capas de nácar [35].

### 1.5.2. Proteínas de la capa prismática

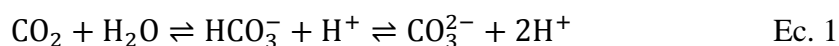
**Prismalina 14:** Fue extraída de la matriz ácida insoluble de *Pinctada fucata*. Su secuencia contiene repeticiones de la secuencia Pro-Ile-Tyr-Arg, las cuales forman una estructura en forma de hoja  $\beta$ . También posee una región rica en Asp capaces de interactuar directamente con los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Su función principal se asocia a la inhibición de la precipitación del  $\text{CaCO}_3$  [36].

**MSI31:** Aislada de *Pinctada fucata*, es una proteína expresada en el borde exterior del manto, donde se encuentra el epitelio. Tiene una región rica en poli-Gly que participa en la formación de hoja  $\beta$  y su carboxilo terminal en la unión de iones calcio [35].

**Caspartina y Calprismina:** Son dos proteínas solubles, ácidas, aisladas de la capa prismática de *Pinctada nobilis*. Si bien ambas comparten algunas características estructurales, posiblemente no pertenezcan a la misma familia de proteínas. La Caspartina es una proteína rica en Asp y su función estaría vinculada a servir de molde para el proceso de nucleación de los cristales de  $\text{CaCO}_3$ . Más aún esta proteína no se une al  $\text{Ca}^{2+}$  pero sí a los cristales de calcita, lo cual refuerza la hipótesis sobre su rol en el proceso de mineralización. Por su parte la Calprimina no muestra homología con ninguna proteína, por lo que se desconoce su función [37].

### 1.5.3. Proteínas comunes a ambas capas

**Nacreína:** Es una proteína de 60 kDa extraída de la capa nácarada de *P. fucata*, expresada en el borde del manto y el pallium. Tiene dos dominios funcionales: uno rico en Gly-X-Asn (X= Asp, Asn o Glu) y en el otro de anhidrasa carbónica. Se ha sugerido que este último sería responsable de catalizar la conversión de dióxido de carbono y agua a bicarbonato:



In vitro se demostró que la repetición Gly-X-Asn podía inhibir la precipitación de carbonato de calcio sugiriendo que este dominio puede ser el sitio de interacción con el  $\text{Ca}^{2+}$  [38].



**N66:** Purificada de *Pinctada máxima* contiene un dominio repetido (Gly-X-Asn) más largo que la nacreína. Esta secuencia es responsable de las excelentes propiedades de calcificación del molusco. Es expresada en la región dorsal y en el borde del manto, lo cual sugiere que N66 contribuye a la mineralización de la ostra entera [39].

**MSI7:** Es una proteína rica en Gly de *P. fucata*. Su secuencia puede ser dividida en tres regiones: una región amino terminal hidrofílica, una región rica en glicina con tres repeticiones GGG y tres GG y una región C-terminal hidrofóbica adoptando conformación de hoja  $\beta$ . Es expresada en la región dorsal y del borde del manto. Su función se asocia a la aceleración de la precipitación del  $\text{CaCO}_3$  y a cambios en la morfología del cristal [40].

## 2. Técnicas utilizadas para la caracterización de biominerales

### 2.1. Difracción de rayos X

La técnica se basa en el análisis del patrón de interferencia de los rayos X difractados por la muestra de estudio, que contienen la información referente a la posición relativa de los átomos que la componen [41]. En otras palabras, los diagramas de difracción permiten caracterizar las sustancias y determinar el tipo de geometría que presentan los cristales analizados. Dado que las distancias interatómicas se encuentran en el rango 0.15 - 0.4 nm, es necesario emplear longitudes de onda del mismo orden de magnitud (0.1 – 10 nm) [42].

Para poder caracterizar una muestra por difracción de rayos X en polvo es necesario que la misma este bajo la forma de cristal. Un cristal puede definirse como una estructura en mosaico formada por la repetición de un mismo patrón básico, que se identifica como celda unidad. Los cristales adoptan distintas formas de acuerdo con el tipo de simetría que presente la celda unidad. Los diagramas de difracción consisten en la representación gráfica de la intensidad de los rayos X difractados vs. el ángulo ( $2\theta$ ) del haz incidente. El número de picos, su posición e intensidad determinan patrones característicos para cada estructura cristalina de un cierto material [43].

La determinación del tamaño promedio de los cristalitas puede estimarse a partir de la ecuación de Scherrer:

$$\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta} \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $\tau$  representa el tamaño de la cristalita,  $K$  es el factor de corrección e igual a 0.95,  $\lambda$  es la longitud de onda de los rayos X (en Ångströms),  $\beta$  es el ancho medio de pico del difractograma y  $\theta$  proviene del ángulo de difracción (expresado en radianes) [44].

#### 2.1.1. Carbonatos geológicos y sintéticos

De todos los posibles polimorfos de  $\text{CaCO}_3$ , la calcita es el más estable. Posee una celda unidad rombohédrica, (grupo puntual  $3m$  y espacial  $R3c$ , N° 167) [7]. Es importante destacar que la geometría de la celda unidad de la calcita es sensible a la presencia de impurezas de Mg, las cuales pueden generar ligeras modificaciones de los parámetros de la red. Por su parte la aragonita geológica presenta una geometría ortorrómbica (grupo

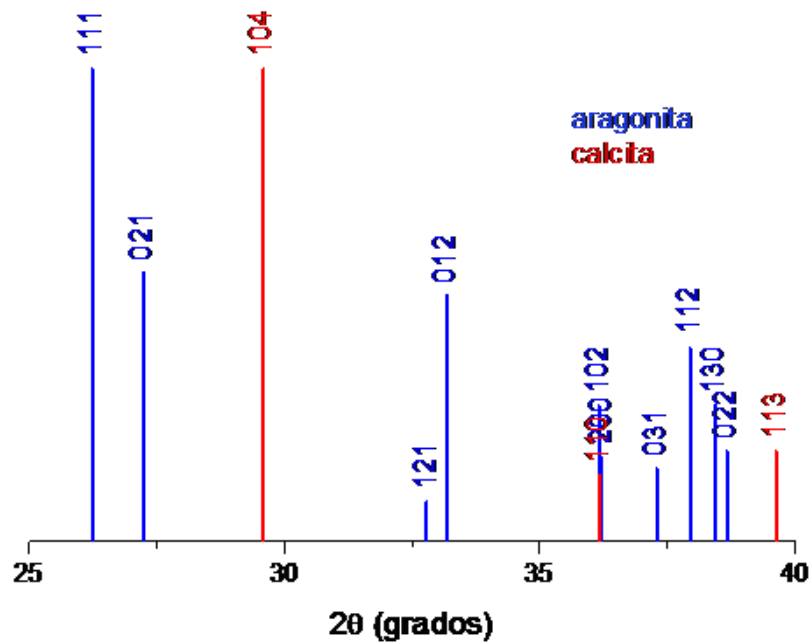
puntual mmm y espacial Pmcn, N° 62). La técnica de XRD permite distinguir claramente entre ambas formas polimórficas (**Error! Reference source not found.**).

**Tabla 1.** Asignación de planos cristalinos a picos del difractograma de aragonita.

<b>Aragonita</b>			<b>Calcita</b>		
<b>2θ (°)</b>	<b>Intensidad relativa</b>	<b>Plano cristalino</b>	<b>2θ (°)</b>	<b>Intensidad relativa</b>	<b>Plano cristalino</b>
26.24	100	111	23.18	7.79	012
27.24	56.97	021	29.58	100	104
32.78	8.39	121			
33.18	52.12	012			
36.16	28.68	102	36.17	14.01	110
36.21	17.84	200			
37.30	15.29	031			
37.94	41.13	112			
38.43	28.75	130			
38.66	19.27	022	39.63	19.04	113
41.23	13.75	211			
42.94	20.62	220	43.40	14.21	202
45.90	71.44	221	47.39	6.37	024
48.35	30.99	041	47.83	19.18	018
48.51	18.95	202	48.81	19.79	116
50.28	29.73	132			
52.54	31.05	113			
52.96	7.07	231			
53.10	14.13	023			
59.29	6,3	311	57.73	9.21	122

Todas las señales se encuentran normalizadas respecto al pico de mayor intensidad a 26.24° y 29.58° para la aragonita y la calcita respectivamente.

Los planos cristalinos (111) de la aragonita y (104) de la calcita, son los más intensos para ambos cristales, y se encuentran bien aislados en los difractogramas (Figura 5), por lo que pueden utilizarse para determinar el tamaño de cristalita usando la ecuación de Scherrer y para estimar el grado de pureza del polimorfo en cada capa.



**Figura 5.** Zoom de la región de  $2\theta$  donde se puede apreciar el aislamiento de los picos de difracción (111) de la aragonita y (104) de la calcita.

### 2.1.2. Carbonatos biogénicos

Los biominerales son un ejemplo de compositos formados por una componente orgánica e inorgánica. A nivel nanométrico presentan una estructura jerárquica bien diferenciada en comparación a los carbonatos geológicos. Más aún, a nivel atómico los polimorfos de aragonita presentan ligeras distorsiones de estiramiento a lo largo del eje a y c, y de contracción a lo largo del eje b de la celda unidad ortorrómbica de la red cristalina. La magnitud de estas distorsiones puede alcanzar un máximo 0.1% a lo largo del eje c, respecto a su contraparte geológica. Estas diferencias pueden observarse mediante difracción de rayos X de alta resolución como ligeros corrimientos sistemáticos de las señales respecto a las muestras geológicas. El origen de las distorsiones se debe al

contenido orgánico de los carbonatos biogénicos que interaccionan con la red cristalina del  $\text{CaCO}_3$  afectando ligeramente su simetría espacial. Si bien la cantidad de materia orgánica es del orden de los 0.1-0.5% (m/m), es suficiente para aumentar de forma significativa las propiedades mecánicas del mineral [7], [45].

## 2.2. Espectroscopía infrarroja (FTIR)

La espectroscopía infrarroja (FTIR) está basada en la absorción de radiación electromagnética asociada a las vibraciones de los átomos que componen las moléculas orgánicas e inorgánicas. Para la caracterización de sustancias químicas se emplea típicamente el rango de números de onda<sup>4</sup> comprendido entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$ , conocido como *región infrarroja media*, donde se encuentran las señales de los grupos funcionales orgánicos. Entre 1200 y 400  $\text{cm}^{-1}$  se define la zona conocida como *huella dactilar (fingerprint)*, ya que contiene señales típicas del compuesto bajo análisis, si bien suele ser una región que sólo puede ser correctamente interpretada con la ayuda de cálculos teóricos complementarios, dada su alta complejidad [46].

Para que una señal sea visible en el espectro infrarrojo, el momento dipolar de la molécula debe cambiar durante la vibración, lo cual se conoce como la *Regla de Selección*<sup>5</sup>. En función de la orientación espacial de las vibraciones, se definen diferentes modos vibracionales:

- $\nu$  = estiramiento (*stretching*). Es el cambio en el largo de un enlace.
- $\delta$  = balanceo (*bending*). Es un cambio en el ángulo de un enlace en un plano.
- $\rho_r$  = doblamiento (*rocking*). Es un cambio en el ángulo entre un grupo de átomos.
- $\rho_w$  = agitación (*wagging*). Es un cambio en el ángulo del plano de un grupo de átomos.
- $\rho_t$  = torsión (*twisting*). Es un cambio en el ángulo entre los planos de dos grupos de átomos.

### 2.2.1. Carbonatos geológicos y sintéticos

La estructura del ion carbonato libre incluye un átomo central de carbono rodeado por tres átomos de oxígeno ubicados en los vértices de un triángulo equilátero, lo que define una estructura con un alto grado de simetría ( $D_{3h}$ ). De las 6 posibles vibraciones, dos pares

---

<sup>4</sup> El número de onda se define como el inverso de la longitud de onda.

<sup>5</sup> La “Regla de Selección” surge de la interpretación cuántica de los modos vibracionales de las moléculas.

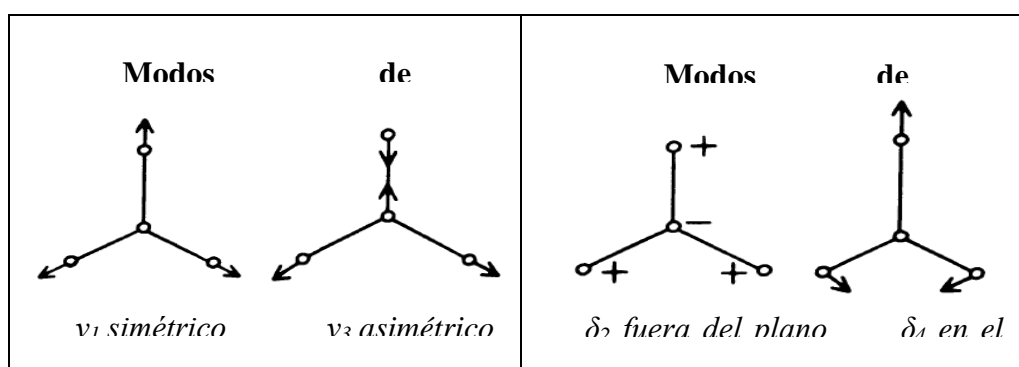
de ellas son degeneradas (presentan la misma energía) por lo que aparecen en el mismo número de onda [4]. De las 2 vibraciones restantes, una de ellas no produce un cambio en el momento dipolar suficiente como para dar una señal detectable, por lo que no aparece en el espectro infrarrojo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Modos vibracionales para el grupo carbonato idealmente simétrico (grupo de simetría  $D_{3h}$ ) \*

$\nu$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	Asignación	Observaciones
711	$\delta_4$ Balanceo OCO en el plano	Doblemente degenerada
882	$\delta_2$ Deformación $\text{CO}_3$ fuera del plano	-----
1432	$\nu_3$ Estiramiento C-O asimétrico	Doblemente degenerada

\* La vibración  $\nu_1$  correspondiente al estiramiento C-O simétrico, es muy débil ya que produce un cambio en el momento dipolar muy pequeño.

Las bandas de absorción correspondientes a los modos vibracionales permitidos del carbonato en simetría  $D_{3h}$  resultan, en consecuencia, ser 3. En orden de energías crecientes, i) el balanceo en el plano  $\delta_4$  del grupo O-C-O, de intensidad baja; ii) la deformación  $\delta_2$  del grupo  $\text{CO}_3$  fuera del plano, de intensidad media, en el que el átomo de C central se desplaza en forma perpendicular al plano formado por los 3 átomos de O; y finalmente iii) el estiramiento asimétrico  $\nu_3$  del enlace C-O, con una señal muy intensa, en el que se produce simultáneamente el acortamiento de uno de los enlaces C-O y el alargamiento de los otros dos enlaces C-O. El estiramiento simétrico  $\nu_1$  del enlace C-O, en el que todos los enlaces C-O se estiran simultáneamente, da lugar a un cambio casi nulo en el momento dipolar de la molécula, por lo que no da una señal medible (Figura 6).



**Figura 6.** Modos vibracionales esperados para la simetría  $D_{3h}$  del carbonato libre.

El ion carbonato obviamente no se encuentra aislado en la naturaleza, y siempre está rodeado por contraiones que compensan su carga negativa. La presencia de estos contraiones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) produce distorsiones en la geometría, lo que conduce a una pérdida en la simetría [5]. Esta pérdida de simetría se traduce en un desdoblamiento de aquellas bandas doblemente degeneradas,  $\nu_3$  y  $\delta_4$ , que se refleja en el espectro infrarrojo. La aragonita y la calcita pertenecen a dos grupos de simetría diferentes,  $C_s$  y  $D_3$ , respectivamente, pero sólo para la aragonita se verifica el levantamiento de la degeneración de las vibraciones  $\nu_3$  y  $\delta_4$  (Tabla 3). Adicionalmente, pueden aparecer bandas surgidas de la combinación de los modos:  $(\nu_1 + \delta_4)$  y  $(\nu_1 + \nu_3)$ .

**Tabla 3.** Modos vibracionales para la aragonita y calcita geológica, pertenecientes a los grupos de simetría  $C_s$  y  $D_3$ , respectivamente.

<b>Modo vibracional</b>	<b>v (cm<sup>-1</sup>)</b>	
	<b>Aragonita (<math>C_s</math>)</b>	<b>Calcita (<math>D_3</math>)</b>
$\nu_1$	1083	---
$\delta_2$	854	877
$\nu_3$	1488	1420
$\nu_{3a}$	1440	
$\nu_{3b}$	713	
$\delta_4$	700	713
	2571	
$\nu_1 + \nu_3$	2523	2503
	1796	
$\nu_1 + \delta_4$		1796
	1783	

La banda de absorción  $\nu_3$  es asimétrica y de naturaleza compleja. En la región 1600 – 1400  $\text{cm}^{-1}$ , se observan varias superpuestas, que para la aragonita se encuentran centradas en 1570, 1525, 1488, 1473 y 1440  $\text{cm}^{-1}$  [6]. De todas estas bandas, las centradas en 1488 y 1440 se asignan a las señales desdobladas  $\nu_{3a}$  y  $\nu_{3b}$ , respectivamente; las restantes surgen de la combinación entre diferentes bandas vibracionales con señales de absorción de la red cristalina que se observan para valores de  $\nu < 400 \text{ cm}^{-1}$  [6].

### 2.2.2. Carbonatos biogénicos

En el análisis de los carbonatos biogénicos, además de la incorporación de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  que producen una disminución en la simetría del ión carbonato, hay que tener en cuenta la presencia de las proteínas. Por un lado, éstas interactúan con los iones calcio y magnesio durante el proceso de biogénesis del carbonato, pero debido a su estructura predominante de hoja  $\beta$ , interactúan con las plaquetas de aragonita. Es de esperar, por lo tanto, que las proteínas afecten principalmente al nácar de los moluscos, más que a la capa prismática.

Para los espectros de los carbonatos biogénicos, se observan las mismas características que para las calcitas y aragonita geológica en lo que tiene que ver con la matriz inorgánica. Adicionalmente, se observan nuevas señales que corresponden a la matriz orgánica y que da cuenta principalmente de la presencia de proteínas. Estas macromoléculas dan señales típicas en la región  $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$  reflejando las vibraciones de la banda Amida I y la estructura secundaria de las proteínas (Tabla 4).

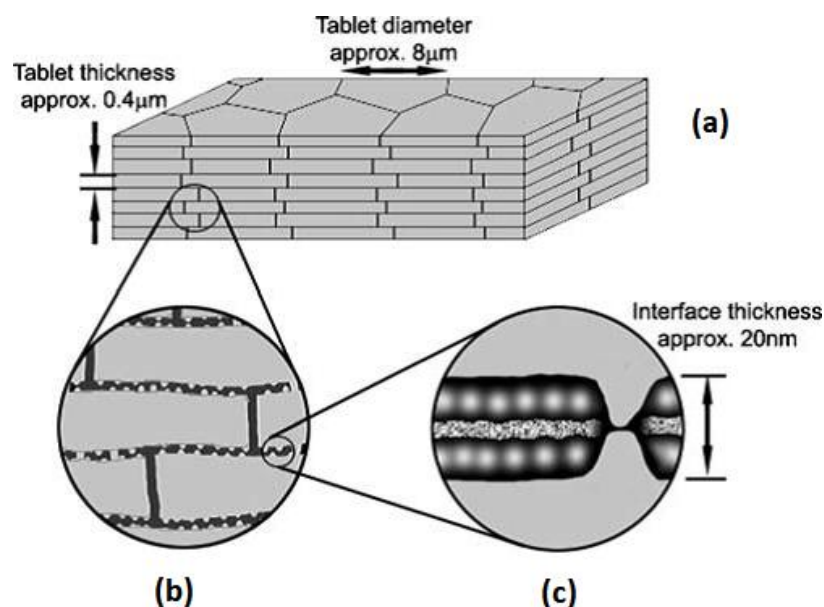
**Tabla 4.** Asignación de estructuras secundarias a la banda amida I. Adaptado de Ref. [47]

$\bar{\nu} (\text{cm}^{-1})$	Asignación
$1624 \pm 1$	hoja $\beta$
$1627 \pm 2$	hoja $\beta$
$1633 \pm 2$	hoja $\beta$
$1638 \pm 2$	hoja $\beta$
$1642 \pm 1$	hoja $\beta$
$1648 \pm 2$	ovillo estadístico
$1656 \pm 2$	$\alpha$ hélice
$1663 \pm 3$	hélice $3_{10}$
$1667 \pm 1$	giro $\beta$
$1675 \pm 1$	giro $\beta$
$1680 \pm 2$	giro $\beta$
$1685 \pm 2$	giro $\beta$
$1691 \pm 2$	hoja $\beta$
$1696 \pm 2$	hoja $\beta$



### 2.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) permite la observación y caracterización de materiales a escala micro y nanométrica. En SEM la imagen se forma a partir de las interacciones entre un haz de electrones, enfocado mediante lentes magnéticas, y la muestra. Los tipos de señales, producidas de la interacción del rayo de electrones con la muestra, incluyen electrones secundarios, de *back-scattering*, rayos X característicos y otros fotones de varias energías. Los componentes básicos del SEM son el sistema de lentes (bobinas), el acelerador de electrones, el colector de electrones, los tubos de rayos catódicos de foto-registro (actualmente pantallas LCD) y los dispositivos electrónicos asociados. Se le puede añadir un detector de rayos X llamado WDS (espectrómetro de dispersión de longitud de onda) y también un espectrómetro de energía dispersiva (EDS) para estudiar la composición de la muestra. El filamento acelerador de electrones más usado es el de tungsteno. Uno de los requisitos necesarios para que una muestra sea observable por SEM es que sea conductora, en caso contrario se realiza un pretratamiento de recubrimiento de la muestra con una fina capa de oro. [42]. Con esta metodología es posible observar directamente algunos aspectos de la estructura jerárquica de los carbonatos biogénicos (Figura 7). En particular, dada la resolución del equipo, será posible observar los niveles 1 y 2 así como los encastres entre plaquetas (ver Sección 1.4.1. Estructura jerárquica del nácar).



**Figura 7.** Niveles jerárquicos observables por diferentes técnicas ultramicroscópicas. (a) Nivel 1 y (b) Nivel 2 son observables por SEM, mientras que (c) el Nivel 3 es observable por Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) o de Fuerza Atómica (AFM). Adaptado de Ref. [7].

## Objetivo general

Estudiar la composición química de las conchas de los moluscos, con particular atención a las limitaciones que presentan las técnicas fisicoquímicas empleadas.

## Objetivos específicos

- Caracterizar por difracción de rayos X, espectroscopía infrarroja y microscopía electrónica de barrido las diferentes capas de los biominerales de los moluscos.
- Comparar los resultados de la caracterización para tres especies de moluscos diferentes.
- Aplicar el proceso de deconvolución gráfica de la señal de absorción infrarroja correspondiente a la amida I ( $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ ), con el fin de establecer su aplicabilidad en la detección de la estructura secundaria de las proteínas de la fase orgánica del biomineral.

### 3. Desarrollo experimental

Para cumplir con los objetivos propuestos se llevó a cabo un trabajo sistemático de caracterización fisicoquímica de tres especies de moluscos.

#### 3.1. Selección de las muestras

Se obtuvo comercialmente ostras de *Pinctada máxima* (madreperla blanca) provenientes de los Casinos del Estado (Uruguay). También fueron obtenidas comercialmente conchas de los caracoles *Haliotis fulgens* (Abalón verde) y *Turbo marmoratus* (Turbante verde) (Tabla 5). Las piezas seleccionadas corresponden a animales adultos.

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica de los moluscos analizados

Clase	Familia	Género	Especie	Nombre vulgar
Bivalvo	Pteriidae	Pinctada	<i>Pinctada máxima</i>	madreperla blanca
Gasterópodo	Haliotidae	Haliotis	<i>Haliotis fulgens</i>	abalón verde
Gasterópodo	Turbinida	Turbo	<i>Turbo marmoratus</i>	turbante verde

#### 3.2. Preparación de las muestras

Las conchas de los moluscos se limpiaron con agua caliente (ca. 50°C) y detergente, enjuagándose varias veces para no dejar residuos. Finalmente se secaron al aire durante 2 días. Las muestras lavadas y secas se pulverizaron utilizando gubias de tallado de punta romboide de doble filo (Nicholson® Providence, RI, USA) hasta formar un polvo brillante similar al talco. En todo momento se trabajó con máscara Survivair (de Honeywell Safety™), para evitar aspirar el material particulado.

De cada muestra de molusco se pulverizó por separado la cara interna, correspondiente a al nácar (rica en aragonita) y la cara externa formada por la capa prismática (rica en calcita). Las muestras pulverizadas fueron almacenadas en frascos de plástico hasta su análisis final.

### 3.3. Difracción de rayos X (XRD)

Las medidas por difracción de rayos X (XRD) se realizaron mediante un barrido de ángulo rasante,  $2\theta$ , comprendido entre  $10^\circ$  y  $60^\circ$  a temperatura y humedad ambiente. Se usó una radiación  $\text{CuK}\alpha$  (1.54056 y 1.54439 Å) con un voltaje de tubo de 30 kV y una corriente de 40 mA. Los diagramas colectados fueron normalizados y comparados con la base de datos *Crystallographica Search-Match Version 3.1.0.2* para la asignación de bandas. Los difractogramas fueron realizados en el Laboratorio de Cristalografía de Estado Sólido y Materiales de la Facultad de Química (UdelaR), a cargo del Dr. Ricardo Faccio.

### 3.4. Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Para realizar el estudio FTIR de las diferentes muestras se utilizó un equipo Shimadzu modelo IR Prestige 21 (Japón). Se empleó el método de pastilla de bromuro de potasio (KBr, Pike, de alta pureza)[48].

Brevemente, para la preparación de la pastilla se pesó ca. 1.2 gramos de KBr y 5 mg de cada una de las diferentes muestras. Se mezclaron ambos en un mortero de ágata, y se comprimieron a 10 Ton con una prensa hidráulica (Pike, CrushIR).

Las medidas y el procesamiento de la señal, se realizó con el *software* IRsolution 1.4 (Shimadzu), empleando una apodización Happ-Genzel, con 10 barridos y una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ , en el rango de  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$ . Se realizó una corrección atmosférica por software de los espectros, se ajustó de la línea de base, se suavizaron con el algoritmo Savitzky-Golay tomando entre 10 y 15 puntos, y se normalizó la absorbancia entre 0 y 1 tomando como referencia el máximo de mayor absorción. Finalmente, los datos fueron exportados en formato ASCII y procesados con el programa OriginPro® 2015. En todos los casos, se tomó como espectro válido aquel con una absorbancia no mayor de 1.5 unidades, de manera de asegurar la no saturación del detector.

### 3.5. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Las muestras fueron recubiertas por una delgada capa de oro puro, por medio de un equipo de deposición de vapor frío Denton Vacuum Desk II, empleando una corriente de 30 mA durante 120 s. Las medidas de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se realizaron en un equipo JEOL 5900 CD de la empresa Thermo Fisher NORAN System 7. El voltaje de columna aplicado fue de 20 kV.

## 3.6. Tratamiento de datos

### 3.6.1. Deconvolución de banda amida I en FTIR

Teniendo en cuenta que las bandas correspondientes a las vibraciones de la amida I de las proteínas (entre 1700 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ ) se encuentran superpuestas a la caída de la banda más intensa del carbonato (entre 1700 y 1200  $\text{cm}^{-1}$ ); en primer lugar, se ajustó esta banda del carbonato a una curva lorentziana, de manera de obtener una línea de base adecuada para la región de la amida I. Una vez corregida la banda de la amida I, se deconvolucionó la señal usando la subrutina *Peak Analyzer* del software OriginPro® 2015.

La asignación de cada una de las bandas obtenidas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Yang et al.[47]. La deconvolución se efectuó mediante el algoritmo de iteración Levenberg Marquardt, empleando un ajuste de curvas Gaussianas. La línea de base se parametrizó a  $y_0$  menor o igual a el mínimo absoluto de la curva. Como criterio de validación se tomó como parámetro la ausencia de bandas negativas y un índice de correlación (R) mayor a 0.91.

Para probar que el método utilizado era robusto, cada deconvolución se realizó por triplicado. Con los datos de las áreas de las bandas, se calculó el porcentaje de los diferentes tipos de estructura secundaria de las proteínas presentes en el biomineral. Por ejemplo, para el % de hoja  $\beta$ :

$$\% \text{ hoja } \beta = \frac{\sum \text{área de las bandas correspondientes a hoja } \beta}{\text{área total}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

### 3.6.2. Tratamiento de imágenes SEM

Luego de obtenidas las imágenes SEM del nácar, se procedió a procesarlas midiendo el grosor de la plaqueta (más de 300 medidas en cada caso) con el *software* ImageJ.

### 3.6.3. Tamaño de las cristalitas

Para el cálculo del tamaño de las cristalitas, se emplearon los picos de difracción (111) de la aragonita y (104) de la calcita, que no se superponen entre sí y se encuentran bien aislados en los difractogramas. Cada pico experimental se ajustó a una curva lorentziana para determinar el ancho medio de pico y luego se aplicó la ecuación de Scherrer para el cálculo.

### 3.6.4. Contenido de aragonita y calcita en las muestras analizadas

A partir de los picos obtenidos en los análisis por XRD, se tomaron las señales de difracción más intensas correspondientes al plano cristalino (111) de la aragonita (26.24°) y al plano cristalino (104) de la calcita (29.58°) para calcular las cantidades relativas de cada una de ellas en las muestras. Asumiendo que la intensidad de difracción responde linealmente con la fracción de cada componente de la mezcla, se calculó la composición de las muestras como:

$$\% \text{ aragonita} = \frac{I_{(111)\text{aragonita}}}{I_{(111)\text{aragonita}} + I_{(104)\text{calcita}}} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

$$\% \text{ calcita} = \frac{I_{(104)\text{calcita}}}{I_{(111)\text{aragonita}} + I_{(104)\text{calcita}}} \times 100 \quad \text{Ec.4}$$

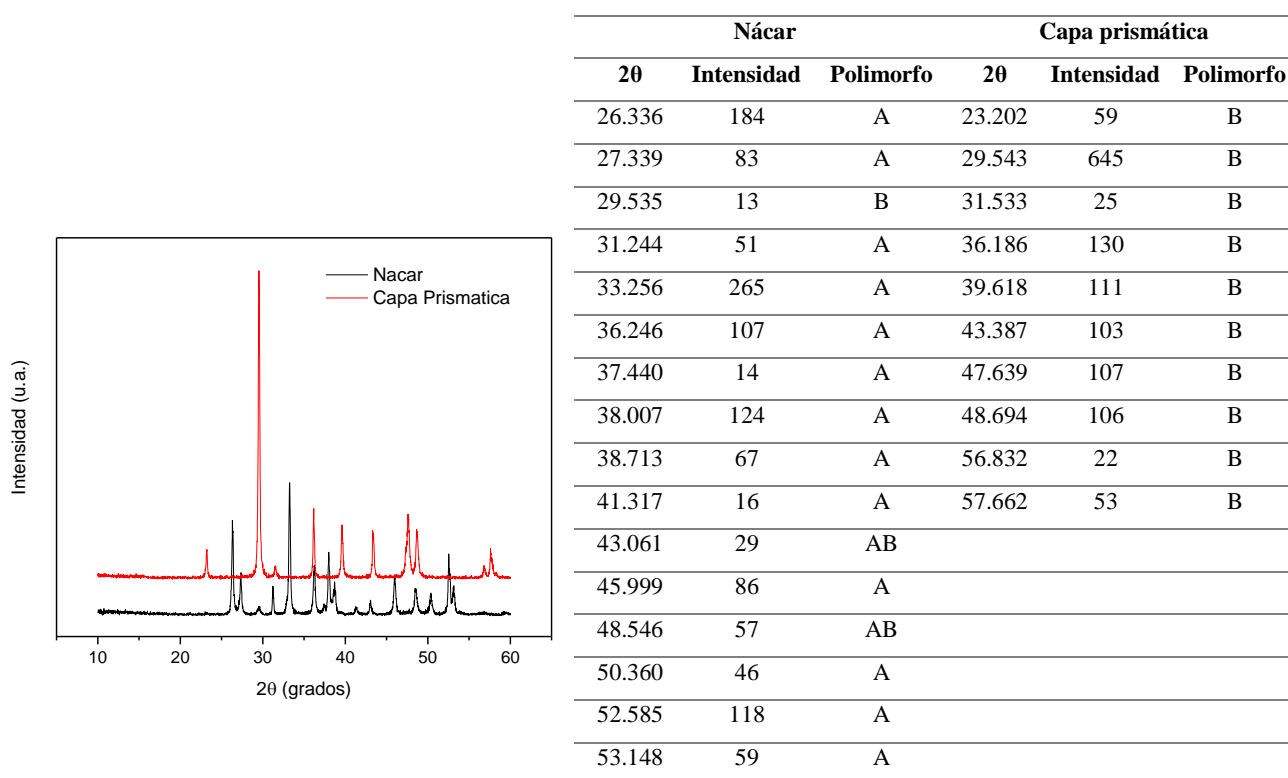
Los límites de detección y de cuantificación estimados por esta metodología son 0.64 % y 2.1 %, respectivamente (ver Detección y cuantificación de las señales en XRD).

## 4. Resultados

### 4.1 *Pinctada máxima*

#### 4.1.1. Identificación de los componentes del nácar y de la capa prismática

Los difractogramas del nácar y de la capa prismática de *Pinctada máxima* presentan picos angostos, y no aparecen evidencias de material amorfo (Figura 8), lo que indica un alto grado de cristalinidad de las muestras a la vez que confirma que proceden de ejemplares adultos [8].



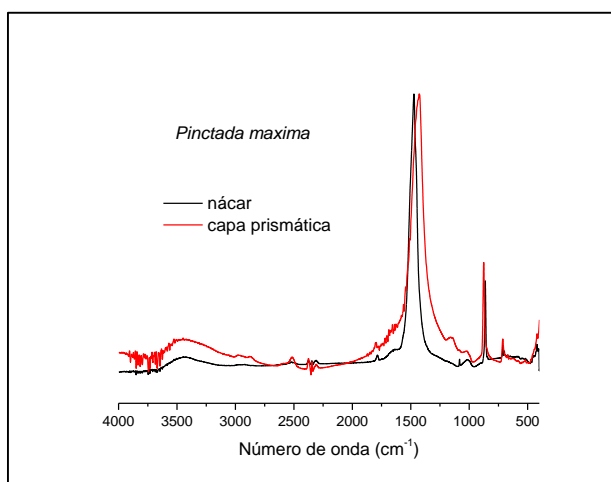
**Figura 8.** Difractogramas de rayos X del nácar y de la capa prismática de *Pinctada máxima*.

Las comparaciones con los patrones identificaron aragonita (93.4 % pura) en el nácar y calcita (100 % pura) en la capa prismática (Figura 8). El nácar se encuentra contaminado con un 6.6 % de calcita, como lo demuestra la presencia del pico de difracción a 29.535° atribuido al plano (104) de la calcita. Este es el pico más intenso de la calcita, por lo que los otros picos de difracción no se distinguen en el difractograma del nácar.

Finalmente, los tamaños medios de las cristalitas, hallados con la ecuación de Scherrer, fueron 39 nm para el nácar y 45 nm para la capa prismática, en buen acuerdo con el valor de  $45 \pm 22$  nm reportado para el nácar de *Pinctada máxima* a partir de estudios por Microscopía de Fuerza Atómica [9].

#### 4.1.2. Matriz inorgánica

Existe un único reporte en la literatura donde se analiza las matrices inorgánica y orgánica por FTIR para *Pinctada máxima* [10]. Los resultados muestran un acuerdo general con ese trabajo, pero discrepa en la asignación de las bandas minoritarias. El nácar de *Pinctada máxima* presenta bandas de absorción infrarroja para la matriz inorgánica similar a los carbonatos geológicos de calcio, pero cabe resaltar algunas diferencias notorias (Figura 9).



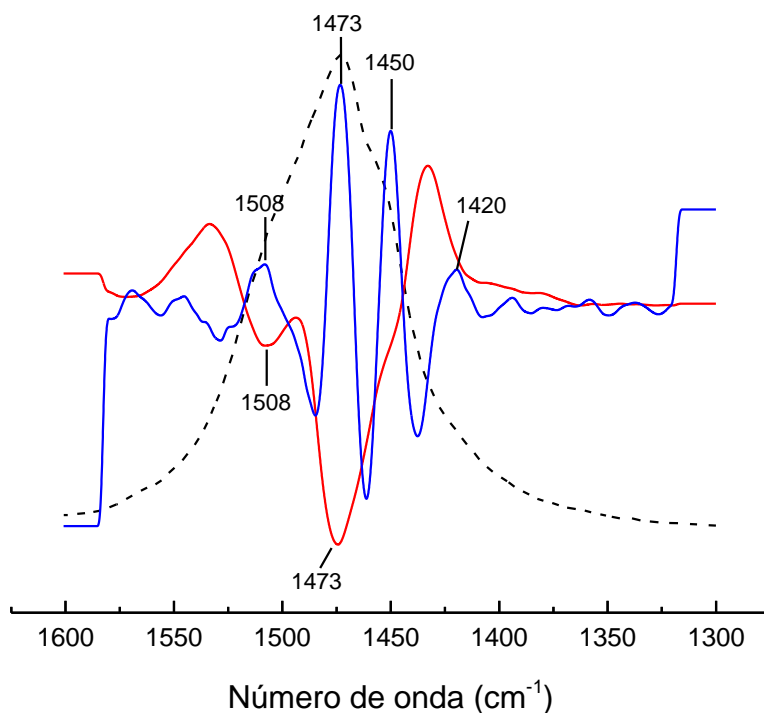
Nácar		Placa prismática	
v (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	v (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
<b>Matriz inorgánica</b>			
700	$\delta_{4b}$	713	$\delta_4$
713	$\delta_{4a}$		
862	$\delta_2$	876	$\delta_2$
1083	$\nu_1$	1083	$\nu_1$
1472	$\nu_3$	1428	$\nu_3$
1783	$\nu_1 + \delta_{4b}$	1796	$\nu_1 + \delta_4$
1796	$\nu_1 + \delta_{4a}$		
2521	$\nu_{OH}$	2515	$\nu_1 + \nu_3$
<b>Matriz orgánica</b>			
1600-1700	Amida I	1600-1700	Amida I
2800-3000	$\nu_{CH}$	2800-3000	$\nu_{CH}$
3000-3500	$\nu_{OH} + \nu_{NH}$	3000-3500	$\nu_{OH} + \nu_{NH}$

**Figura 9.** Espectro FTIR del nácar y la capa prismática de *Pinctada máxima*.

No se observa un desdoblamiento de la banda correspondiente al estiramiento asimétrico  $\nu_3$ , distinguiéndose una única banda de absorción muy intensa a  $1473 \text{ cm}^{-1}$ . El análisis por derivada segunda de la señal no resuelve la superposición de picos, y confirma la absorción a  $1473 \text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, el análisis por derivada cuarta resuelve la banda en 4 contribuciones, centradas en  $1420, 1450, 1473$  y  $1508 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 10). Entre estas 4



bandas se encuentran las dos contribuciones del desdoblamiento del modo vibracional  $\nu_3$ , que se esperan en una muestra constituida por aragonita.



**Figura 10.** Espectroscopía derivada de la banda centrada en  $1473\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento asimétrico  $\nu_3$  del enlace C-O del nácar de *Pinctada máxima*. En línea punteada, la banda original, en línea roja la derivada segunda del espectro, y en línea azul la derivada cuarta del espectro. La localización de las bandas componentes surge de los mínimos de la derivada segunda y de los máximos de la derivada cuarta.

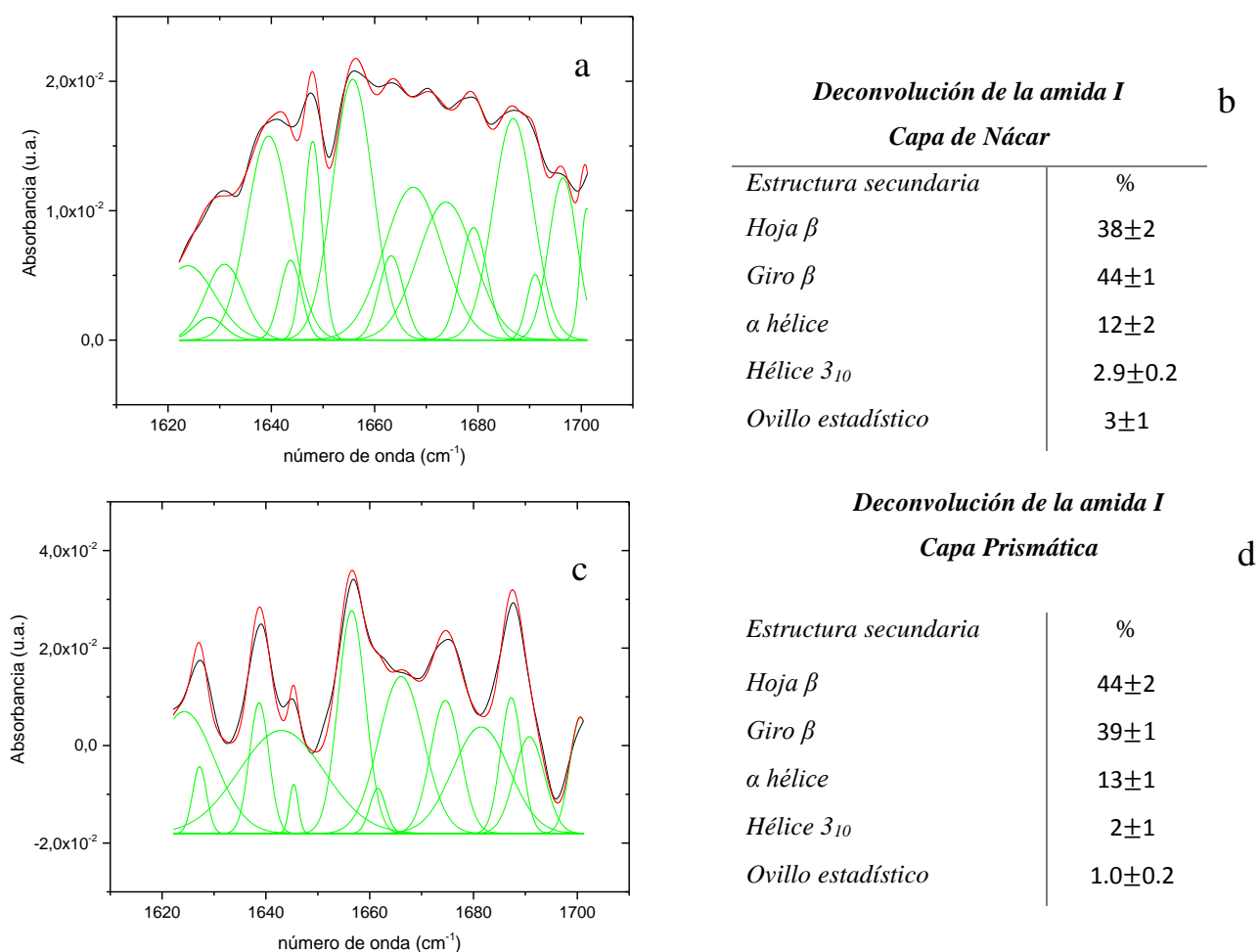
Una señal a  $2521\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento del enlace O-H del ion bicarbonato [10], que es un intermediario en la formación de aragonita. Finalmente aparecen dos contribuciones minoritarias pero bien definidas, que coinciden con la combinación de las vibraciones  $(\nu_1 + \delta_{4b})$  y  $(\nu_1 + \delta_{4a})$ ; en la literatura estas bandas han sido asignadas a la vibración de estiramiento del enlace C=O de las proteínas. Sin embargo, un análisis de la Figura 6 de la Ref. [10] muestra que estas señales desaparecen con el calentamiento, al igual que la señal  $\nu_1$ , lo que confirma la asignación.

En cuanto a la matriz inorgánica de la capa prismática, la ausencia de desdoblamiento de las señales de balanceo  $\delta_4$  y estiramiento  $\nu_3$  está de acuerdo con los resultados de XRD que detectaba la presencia exclusiva de calcita en esta capa. Sin embargo, a pesar de la

ausencia de desdoblamiento de estas bandas, aparece una señal muy débil del estiramiento  $\nu_1$ , que es típico de la aragonita. Esta señal es probablemente despreciable y representa la presencia de aragonita en la capa prismática en niveles por debajo de los límites de detección de la técnica de XRD. En esta capa no se detecta la presencia de bicarbonato, y aparecen dos señales muy débiles, pero bien definidas a 1796 y 2515  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a combinaciones de las vibraciones de estiramiento y/o balanceo.

#### 4.1.3. Matriz orgánica

La banda amida I del espectro de absorción infrarroja del nácar y de la capa prismática de *Pinctada maxima* se extiende entre 1600 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  en una combinación compleja de bandas de absorción relacionadas con la estructura secundaria de las proteínas presentes (Figura 11).



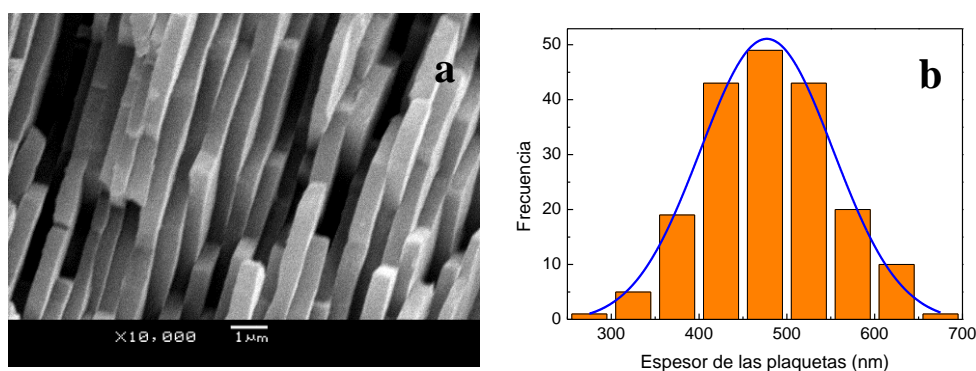
**Figura 11.** Deconvolución de la banda amida I del espectro infrarrojo de la capa de nácar de *Pinctada maxima* (a). Porcentaje de estructura secundaria de proteínas de la banda amida I del espectro infrarrojo del nácar de la madreperla blanca (b). Deconvolución de la banda de la amida I del espectro infrarrojo de la capa prismática de *Pinctada maxima* (c), junto con sus respectivos porcentajes de la estructura secundaria de la proteína (d).

En ambos casos existe un predominio de las estructuras  $\beta$ , y en particular, las hojas  $\beta$  constituyen prácticamente la mitad de la estructura secundaria de las proteínas de la capa prismática.

En la literatura no hemos encontrado antecedentes de estudios acerca de la estructura secundaria para *Pinctada máxima*. Sin embargo, existe un estudio muy detallado de la composición química de la matriz orgánica [49].

#### 4.1.4. Análisis SEM del nácar

En la micrografía SEM con una magnificación 10.000x se puede apreciar las plaquetas de aragonita del nácar de madreperla blanca (*Pinctada máxima*) (Figura 12). Las plaquetas de aragonita tienen un espesor medio de 477 nm ( $\pm 64$  nm, n = 375). (Figura 12). Estos valores concuerdan con lo reportado en la bibliografía [18].

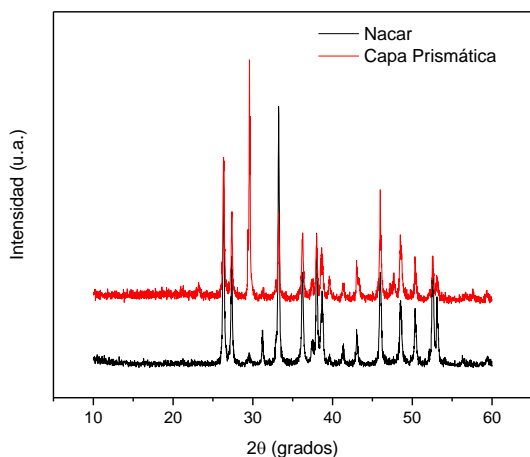


**Figura 12.** Imagen por microscopía SEM de las plaquetas de nácar de *Pinctada máxima* (a). Distribución de tamaño de los espesores con un valor promedio de 477 nm (b).

## 4.2. *Haliotis fulgens*

### 4.2.1. Identificación de los componentes del nácar y de la capa prismática

Los difractogramas del nácar y de la capa prismática de *Haliotis fulgens* presentan picos angostos, y no aparecen evidencias de material amorfo (Figura 13), lo que indica un alto grado de cristalinidad de las muestras a la vez que confirma que proceden de ejemplares adultos [8].



Nácar			Capa prismática		
2θ	Intensidad	Polimorfo	2θ	Intensidad	Polimorfo
26.340	177	A	23.230	9	B
27.357	97	A	26.360	138	A
31.226	30	AB	27.375	84	A
33.255	220	A	29.606	184	B
36.234	92	AB	33.261	84	A
37.440	20	A	36.235	59	AB
38.018	112	A	37.460	15	A
38.712	59	A	38.017	63	A
39.643	8	B	38.577	33	A
41.337	13	A	39.603	15	B
43.069	31	A	43.050	38	A
46.001	93	A	45.999	93	A
48.546	64	AB	48.534	45	AB
50.379	51	A	50.381	31	A
52.571	98	A	52.582	35	A
53.148	55	A	53.098	16	A

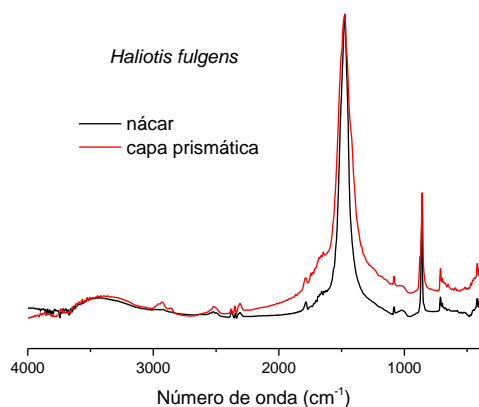
**Figura 13.** Difractogramas de rayos X del nácar y de la capa prismática de *Haliotis fulgens*.

Las comparaciones con los patrones identificaron aragonita (100 % pura) en el nácar (Figura 13). En la capa prismática fueron identificados los dos polimorfos en cantidades equivalentes: aragonita (43.9 %) y calcita (56.1 %). A diferencia de lo observado para *Pinctada máxima*, el grado de contaminación de la capa prismática con aragonita está claramente evidenciado por la presencia de varios picos de este polimorfo.

Finalmente, los tamaños medios de la cristalita, hallados con la ecuación de Scherrer, fueron 43 nm para el nácar y 51 nm para la capa prismática.

#### 4.2.2. Matriz inorgánica

Los espectros vibracionales de las capas de nácar y prismática [50] muestran las bandas de absorción principales atribuidas a la aragonita y la calcita, respectivamente. En este caso, debido a la contaminación cruzada en la capa prismática, los espectros son prácticamente idénticos en cuanto a la composición de la fase inorgánica (Figura 14).



Nácar		Placa prismática	
v (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	v (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
<b>Matriz inorgánica</b>			
700	δ <sub>4b</sub>	700	δ <sub>4b</sub>
713	δ <sub>4a</sub>	713	δ <sub>4a</sub>
862	δ <sub>2</sub>	858	δ <sub>2</sub> **
		874	δ <sub>2</sub>
1082	v <sub>1</sub>	1082	v <sub>1</sub>
1474	v <sub>3</sub>	1472	v <sub>3</sub>
1784	v <sub>1</sub> + δ <sub>4b</sub>	1786	v <sub>1</sub> + δ <sub>4b</sub>
1797*	v <sub>1</sub> + δ <sub>4a</sub>	1799*	v <sub>1</sub> + δ <sub>4a</sub>
2520	vOH	2520	vOH
2548	v <sub>1</sub> + v <sub>3</sub>	2548	v <sub>1</sub> + v <sub>3</sub>
2498		2498	
<b>Matriz orgánica</b>			
1600-1700	Amida I	1600-1700	Amida I
2800-3000	vCH	2800-3000	vCH
3000-3500	vOH+ vNH	3000-3500	vOH+ vNH

\* Obtenida por análisis de derivada cuarta de la señal.

\*\* Proveniente de la aragonita que contamina la muestra.

**Figura 14.** Espectros FTIR en el rango 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> para el nácar y la capa prismática de *Haliotis fulgens*.

No se observa un desdoblamiento de la banda correspondiente al estiramiento asimétrico v<sub>3</sub>, distinguiéndose una única banda de absorción muy intensa a 1474 cm<sup>-1</sup>. El análisis por derivada cuarta resuelve la banda en 4 contribuciones, centradas en 1420, 1450, 1474 y 1510 cm<sup>-1</sup>, es decir, en aproximadamente las mismas posiciones que las obtenidas para *Pinctada máxima*.

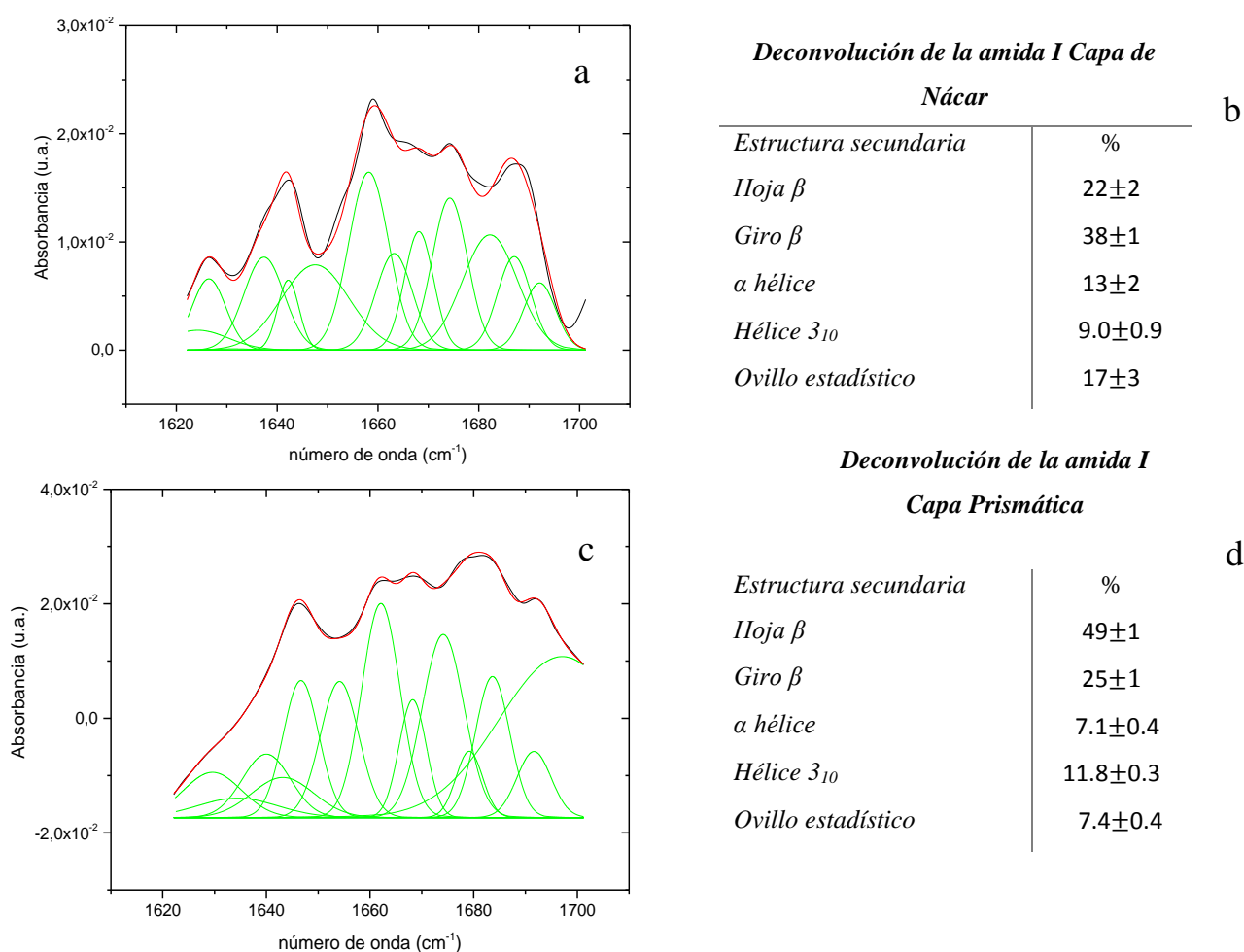
La señal a 2520 cm<sup>-1</sup> se atribuye al estiramiento del enlace O-H del ion bicarbonato [10], y la combinación de las vibraciones (v<sub>1</sub> + δ<sub>4b</sub>) y (v<sub>1</sub> + v<sub>3</sub>) dan señales claramente identificables, aunque los valores experimentales difieren de los teóricos en 2 – 5 cm<sup>-1</sup>. La señal de combinación (v<sub>1</sub> + δ<sub>4a</sub>) aparece como un hombro sobre otra señal, por lo que se recurrió al análisis por derivada cuarta para determinar su localización en el espectro.

En cuanto a la matriz inorgánica el nácar, el desdoblamiento de la señal de balanceo δ<sub>4</sub> está de acuerdo con los resultados de XRD que detectaba la presencia exclusiva de aragonita en esta capa. Al igual que *Pinctada máxima*, y a diferencia de las aragonitas geológicas, no se observa desdoblamiento de la banda para el estiramiento asimétrico v<sub>3</sub>,

aunque de todos modos aparece una señal muy débil del estiramiento  $\nu_1$ , que es típico de la aragonita. Finalmente, se detecta la presencia de bicarbonato en ambas capas.

#### 4.2.3. Matriz orgánica

La banda amida I del espectro de absorción infrarroja del nácar y de la capa prismática (Figura 15) de *Pinctada maxima* se extiende entre 1600 a 1700  $\text{cm}^{-1}$  en una combinación compleja de bandas de absorción relacionadas con la estructura secundaria de las proteínas presentes.

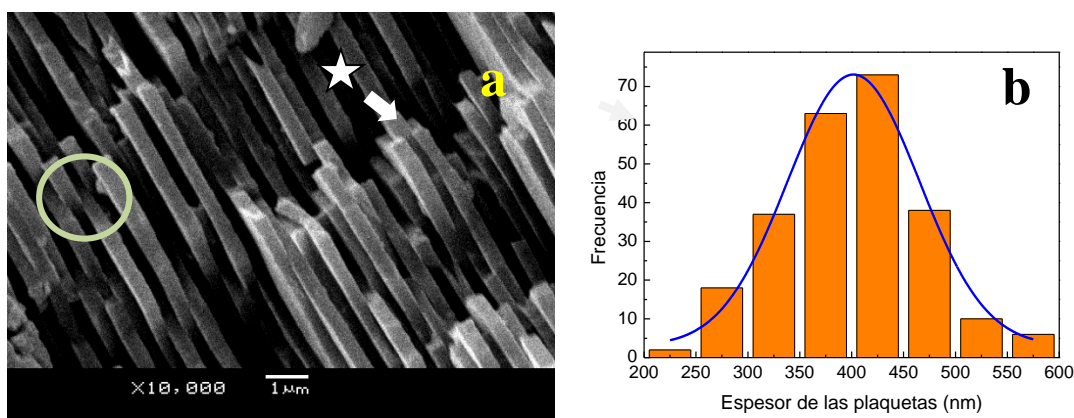


**Figura 15.** Deconvolución de la banda amida I del espectro infrarrojo del nácar de *Haliotis fulgens*(a). Porcentaje de estructura secundaria de proteínas de la banda amida I del espectro infrarrojo del nácar de la madreperla blanca (b). Deconvolución de la banda de la amida I del espectro infrarrojo de la capa prismática de *Haliotis fulgens* (c), junto con sus respectivos porcentajes de la estructura secundaria de la proteína (d).

En ambos casos, existe un predominio de las estructuras  $\beta$ , y en particular, las hojas  $\beta$  constituyen prácticamente la mitad de la estructura secundaria de las proteínas de la capa prismática. Si bien existe información acerca de la matriz orgánica [51]–[53], no existen antecedentes de estudios detallados acerca de la estructura secundaria de las proteínas para *Haliotis fulgens*.

#### 4.2.4. Análisis SEM del nácar

En la micrografía SEM con una magnificación 10.000x se pueden apreciar las plaquetas de aragonita del nácar de *Haliotis fulgens* (Figura 16a). Las plaquetas de aragonita tienen un espesor medio de 413 nm ( $\pm 68$  nm n = 247).



**Figura 16.** Micrografía SEM del nácar de *Haliotis fulgens*. El círculo señala un encastre entre placas y la flecha indica un borde de milano (a). Distribución de medidas del espesor de las plaquetas de nácar en *Haliotis fulgens* (b). Las plaquetas presentaron un tamaño promedio de 413 nm de espesor.

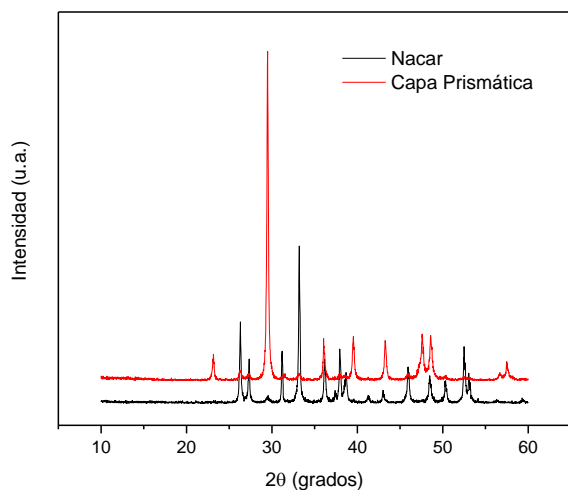
### 4.3. *Turbo marmoratus*

#### 4.3.1. Identificación de los componentes del nácar y de la capa prismática

Los difractogramas del nácar y de la capa prismática de *Turbo marmoratus* presentan picos angostos, y no aparece evidencias de material amorfo (Figura 17), lo que indica un alto grado de cristalinidad de las muestras a la vez que confirma que proceden de ejemplares adultos [8].

La comparación con los patrones identificó aragonita (100 % pura) en el nácar. En la capa prismática fue identificado como principal polimorfo a la calcita con sustitución parcial

de iones calcio por magnesio (carbonato de calcio y magnesio) en un 97.4 % con una contaminación con aragonita a un nivel del 2.6 %.



Nácar			Capa prismática		
2θ	Intensidad	Polimorfo	2θ	Intensidad	Polimorfo
26.302	186	A	23.144	61	B
27.320	105	A	26.305	22	A
31.198	124	A	27.294	11	A
33.211	372	A	29.495	809	B
36.193	113	A	31.510	12	B
37.415	30	A	33.182	15	A
37.973	134	A	36.084	96	B
38.682	74	A	39.536	117	B
41.294	14	A	43.284	106	B
43.037	27	AB	45.923	10	A
45.969	94	A	47.612	103	B
48.498	64	AB	48.614	100	BA
50.340	56	A	56.703	14	BA
52.531	129	A	57.538	39	B
53.096	71	A	23.144	61	B
54.098	6	A	26.305	22	A

**Figura 17.** Difractogramas de rayos X del nácar y de la capa prismática de *Turbo marmoratus*.

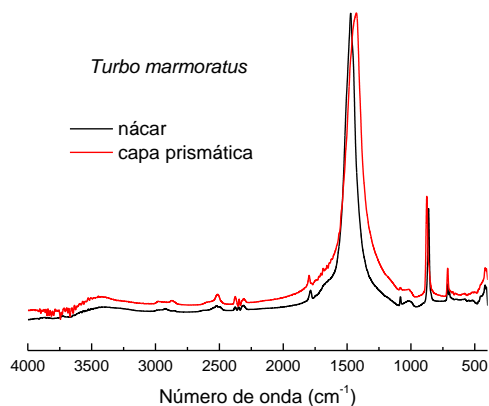
Los tamaños medios de las cristalita, hallados con la ecuación de Scherrer, fueron 47 nm para el nácar y 43 nm para la capa prismática.

#### 4.3.2. Matriz inorgánica

Los espectros vibracionales de las capas de nácar y prismática muestran las bandas de absorción principales atribuidas a la aragonita y la calcita, respectivamente (Figura 18).

Las bandas de absorción presentes en el nácar de *Turbo marmoratus* coinciden con las esperadas para la aragonita, incluyendo el desdoblamiento de la señal de balanceo  $\delta_4$ . Al igual que con *Pinctada máxima* y *Haliotis fulgens*, no se verifica el desdoblamiento de la banda de estiramiento asimétrica  $\nu_3$ , mostrando una única señal intensa centrada en  $1472 \text{ cm}^{-1}$ .





Nácar		Placa prismática	
v (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	v (cm <sup>-1</sup> )	Asignación
<b>Matriz inorgánica</b>			
700	δ <sub>4a</sub>	712	δ <sub>4</sub>
712	δ <sub>4b</sub>		
862	δ <sub>2</sub>	862	δ <sub>2</sub> *
		875	δ <sub>2</sub>
1082	v <sub>1</sub>	1082	v <sub>1</sub> *
1472	v <sub>3</sub>	1427	v <sub>3</sub>
2521	vOH	2515	vOH
1785	v <sub>1</sub> + δ <sub>4a</sub>	1797	v <sub>1</sub> + δ <sub>4</sub> *
n.d.	v <sub>1</sub> + δ <sub>4b</sub>		
2546	v <sub>1</sub> + v <sub>3</sub>	2513	v <sub>1</sub> + v <sub>3</sub>
<b>Matriz orgánica</b>			
1600-1700	Amida I	1600-1700	Amida I
2800-3000	vCH	2800-3000	vCH
3000-3500	vOH+ vNH	3000-3500	vOH+ vNH

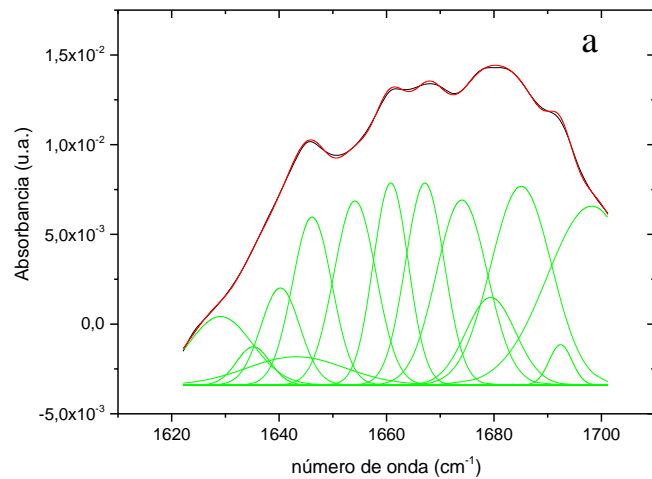
\*proveniente de la contaminación con aragonita.  
n.d.: señal no detectada.

**Figura 18.** Espectros FTIR en el rango 4000 – 400 cm<sup>-1</sup> para el nácar y la capa prismática de *Turbo marmoratus*.

#### 4.3.3. Matriz orgánica

La banda amida I del espectro de absorción infrarroja del nácar y de la capa prismática de *Pinctada maxima* se extiende entre 1600 a 1700 cm<sup>-1</sup> en una combinación compleja de bandas de absorción relacionadas con la estructura secundaria de las proteínas presentes (Figura 19).

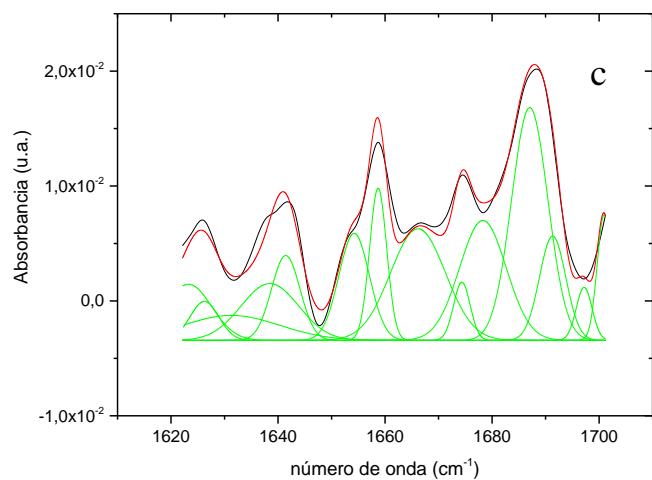
En ambos casos existe un predominio de las estructuras β, y en particular, las hojas β constituyendo prácticamente la mitad de la estructura secundaria de las proteínas de la capa prismática.



**Deconvolución de la amida I Capa de Nácar**

b

Estructura secundaria	%
Hoja $\beta$	34 $\pm$ 4
Giro $\beta$	41 $\pm$ 2
$\alpha$ hélice	8 $\pm$ 1
Hélice $3_{10}$	8 $\pm$ 1
Ovillo estadístico	9 $\pm$ 2



**Deconvolución de la amida I Capa Prismática**

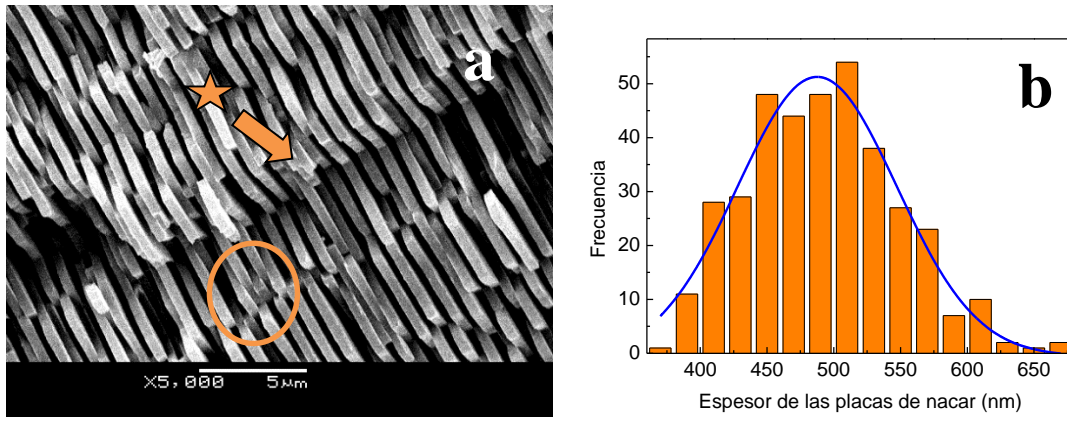
d

Estructura secundaria	%
Hoja $\beta$	39 $\pm$ 2
Giro $\beta$	48 $\pm$ 1
$\alpha$ hélice	9 $\pm$ 1
Hélice $3_{10}$	3 $\pm$ 3
Ovillo estadístico	0.2 $\pm$ 0.2

**Figura 19.** Deconvolución de la banda amida I del espectro infrarrojo del nácar de *Turbo marmoratus* (a), junto con el porcentaje de estructura secundaria de proteínas (b). Deconvolución de la banda amida I del espectro infrarrojo de la capa prismática de *Turbo marmoratus* (c), junto con el porcentaje de estructura secundaria de proteínas (d).

#### 4.3.4. Análisis SEM del nácar

Las micrografías SEM, a un nivel de magnificación de 5.000x, muestran las plaquetas de aragonita apiladas a lo largo de uno de los ejes, y rotadas entre capas en el plano que forman los otros dos ejes del cristal (Figura 1). También es posible observar algunas particularidades de la estructura, como los encastrados y la cola de milano. El espesor medio de las plaquetas de aragonita en el nácar de *Turbo marmoratus* es de 487 nm ( $\pm$  56 nm, n = 347).



**Figura 1.** Micrografía SEM que muestra las plaquetas de nácar del turbante verde, con su encastre (flecha con estrella) y la cola de milano (encerrada en un círculo) (a). Distribución de tamaños de los espesores de las plaquetas de nácar de *Turbo marmoratus* (b).

## 5. Discusión

Se analizaron las conchas de 3 muestras de moluscos, a saber: madreperla blanca (*Pinctada máxima*), Abalón verde (*Haliotis fulgens*) y turbante verde (*Turbo marmoratus*). Los datos serán discutidos en función de la técnica analítica empleada. En primer lugar, el XRD permite la identificación inequívoca de las muestras. Luego discutiremos hasta qué punto el análisis por FTIR posibilita el mismo tipo de discriminación entre aragonita y calcita, y qué tipo de información adicional puede obtenerse del análisis de la fase inorgánica de las muestras. Adicionalmente, se analizarán las ventajas, desventajas y limitantes para su empleo en el estudio de biominerales. Finalmente, los análisis de imágenes SEM permitirán establecer el tipo de estructura (amorfa, cristalina, jerárquica) que constituye las muestras analizadas.

### 5.1. Análisis por XRD

El análisis por XRD permite la identificación inequívoca entre los polimorfos del carbonato de calcio (aragonita y calcita), por lo que se tomará como técnica de referencia a lo hora de establecer la composición química de cada una de las muestras analizadas. La comparación de los difractogramas de las muestras con los patrones de difracción de rayos X para la aragonita y la calcita permiten deducir que la capa de nácar está formada principalmente por aragonita, mientras que en la capa prismática prevalece la calcita, tal como está descrito en la literatura para otros moluscos [18], [54]. La selectividad de las señales permitió establecer las purezas de las muestras obtenidas, que se resumen en la Tabla 6. Los niveles de contaminación detectados están por encima del límite de cuantificación (2.1 %) empleando la técnica de difracción de rayos X (ver Anexo).

**Tabla 6.** Contenido relativo de aragonita y calcita en las muestras obtenidas de las capas de nácar y prismática de las conchas de los animales marinos analizados.

Muestra biológica	Nácar		Capa prismática	
	Aragonita (%)	Calcita (%)	Aragonita (%)	Calcita (%)
<i>Pinctada máxima</i>	93.4	6.6	0	100
<i>Haliotis fulgens</i>	100	0	43.9	56.1
<i>Turbo marmoratus</i>	100	0	2.6	97.4*

\* identificada como calcita mixta de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>.

La contaminación cruzada puede tener tres orígenes [55]: i) transformación de un polimorfo a otro por calentamiento local durante la pulverización de la muestra, ii) existencia real de los polimorfos detectados, o iii) contaminación durante la preparación de la muestra. La transformación de aragonita a calcita se da por aumento de temperatura (ca. 350 °C), pero no se verifica la transformación en el sentido inverso. Como en nuestros análisis hemos encontrado tanto aragonita contaminada, como calcita contaminada, es más probable que el origen de la contaminación esté en la preparación de la muestra. La pulverización de la muestra se hizo empleando métodos mecánicos, y los límites entre el nácar y la capa prismática se hizo a ojo desnudo. Por este motivo, es factible la contaminación entre ambas capas.

Desde el punto de vista de la composición química, los difractogramas permiten distinguir entre calcitas puras o calcitas mixtas (Ca y Mg); éste es el caso de la capa prismática de *Turbo marmoratus*. Sin embargo, no permite distinguir si las muestras son de origen geológico, sintético o biogénico, ya que los patrones de identificación disponibles sirven para analizar todos los tipos de muestras y la resolución del equipo empleado no fue suficiente para detectar posibles corrimientos generados por deformación de la celda unidad del CaCO<sub>3</sub>, producto de las interacciones con la matriz orgánica (ver Sección 2.1.2). La comparación con los difractogramas de los carbonatos geológicos, se observan pequeñas pero consistentes diferencias en la posición de los picos de difracción (Tabla 7).

**Tabla 7.** Posición e intensidad de los principales picos de difracción para las muestras de aragonita geológica y el nácar de las especies analizadas.

	<b>2θ, grados (Intensidad, u.a.)</b>			
<b>Plano cristalino</b>	geológica[56]	<i>Pinctada máxima</i>	<i>Haliotis fulgens</i>	<i>Turbo marmoratus</i>
<b>(111)</b>	26.24° (100)	26.34° (184)	26.34° (177)	26.30° (186)
<b>(112)</b>	37.94° (41.13)	38.01° (124)	38.02° (112)	37.97° (134)
<b>(012)</b>	33.18° (52.12)	33.26° (265)	33.26° (220)	33.21° (372)

Tomando en cuenta las señales más intensas de los difractogramas, se observa que todos los carbonatos biogénicos presentan sus picos de difracción centrados en valores de 2θ mayores que la aragonita geológica. Para *Pinctada máxima* y *Haliotis fulgens* los apartamientos absolutos son prácticamente idénticos, y resultan ser de Δ(2θ) = +0.10 para

el plano (111) y  $\Delta(2\theta) = +0.08$  para los planos (112) y (012). Para *Turbo marmoratus* los apartamientos son menores, +0.06 para el plano (111) y +0.03 para los planos (112) y (012).

Los tamaños medio de cristalitas se obtienen a partir de los picos mayoritarios correspondientes de cada componente. En el caso de la aragonita y calcita, sus señales en los difractogramas se encuentran aisladas y no experimentan ningún tipo de superposición que surja de la contaminación de la muestra, por lo que los resultados pueden considerarse confiables. Los tamaños medios de cristalita obtenidos (Tabla 8) están en el rango nanométrico (39 – 51 nm), y dan cuenta del nivel 3 de la estructura jerárquica de los biominerales de carbonato de calcio. Estas dimensiones son del orden de las encontradas por AFM para *Haliotis rufescens* (32 nm) [57], y por TEM para *Pinctada máxima* (45 nm) [58].

**Tabla 8.** Tamaño de cristalita obtenida por la ecuación de Scherrer a partir de los picos a (111) y (104) para las capas de nácar y prismática, respectivamente.

Muestra biológica	Tamaño de cristalita (nm)	
	Nácar	Capa prismática
<i>Pinctada máxima</i>	39	45
<i>Haliotis fulgens</i>	43	51
<i>Turbo marmoratus</i>	47	43

## 5.2. Análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR)

La calcita geológica (o sintética) se caracteriza por la presencia de las bandas  $\nu_3$  y  $\delta_4$  doblemente degeneradas, integradas por dos tipos de vibraciones de igual energía. La presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  en la aragonita geológica altera la energía de vibración (Tabla 3), perdiéndose la degeneración. Por su parte, para ambas capas se observan las señales a ca.  $2800 \text{ cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones C-H, que dan cuenta de la presencia de materia orgánica, la cual incluye las proteínas y la presencia de polisacáridos. Es importante destacar que estas señales se presentan en forma débil, dado que el porcentaje de materia orgánica es del orden del 5 % (m/m) respecto a la cantidad total de  $\text{CaCO}_3$ .

Cuando se comparan los datos de absorción en la región infrarroja de las aragonitas geológicas y las presentes en el nácar (Tabla 9), se observa una energía similar para todas

las bandas excepto para la banda  $\delta_2$  correspondiente a la deformación fuera del plano, que de su localización espectral en  $854\text{ cm}^{-1}$  pasa a energías más altas,  $862\text{ cm}^{-1}$ .

**Tabla 9.** Comparación de los números de onda para la aragonita geológica y el nácar biogénico.

Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para el nácar				
Aragonita geológica[59]	<i>Pinctada máxima</i>	<i>Haliotis fulgens</i>	<i>Turbo marmoratus</i>	Asignación
700	700	701	700	} $\delta_4$
713	714	714	712	
854	862	862	862	$\delta_2$
1083	1082	1082	1082	$\nu_1$
1440	} 1472	} 1475	} 1472	$\nu_3$
1488				

La otra diferencia que se observa entre la aragonita geológica y la contenida en el nácar es que no se verifica el desdoblamiento de la señal  $\nu_3$ . Estas diferencias podrían estar vinculadas a la presencia de interacciones entre la matriz inorgánica y orgánica, las cuales modificarían la frecuencia de vibración de los átomos del carbonato biogénico, en comparación con el geológico, el cual no contiene materia orgánica. La espectroscopía infrarroja podría entonces servir como herramienta cualitativa para discernir entre carbonatos de origen biológico del geológico. Es importante aclarar que el método solamente será válido para el análisis de muestras con un alto grado de pureza y muestras sin calcinar, dado que existen evidencias que a temperaturas entre  $300 - 400\text{ }^\circ\text{C}$ , la aragonita se transforma en calcita [8].

Por su parte, no se encontraron diferencias significativas en la posición de las bandas de las calcitas biológicas y geológicas para *Pinctada máxima* y *Turbo marmoratus* (Tabla 10). La muestra de *Haliotis fulgens* no se consideró para la comparación dado que los resultados por FTIR confirmaron la contaminación de capa prismática con restos de

aragonita provenientes del nácar (Tabla 6). Esto se constató a partir de la señal unívoca a  $1082\text{ cm}^{-1}$ , conjuntamente con las señales  $1474$ ,  $858$  y  $700\text{ cm}^{-1}$ , características de la aragonita (Tabla 9, Figura 20 y Figura 21).

**Tabla 10.** Comparación de los números de onda del espectro infrarrojo de la capa prismática de los moluscos.

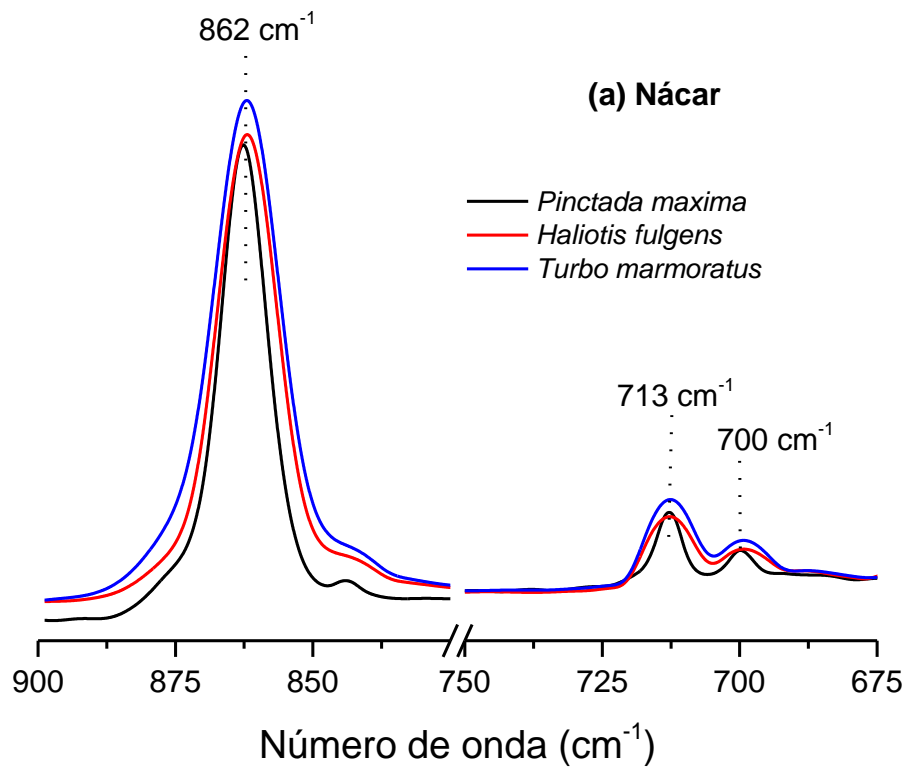
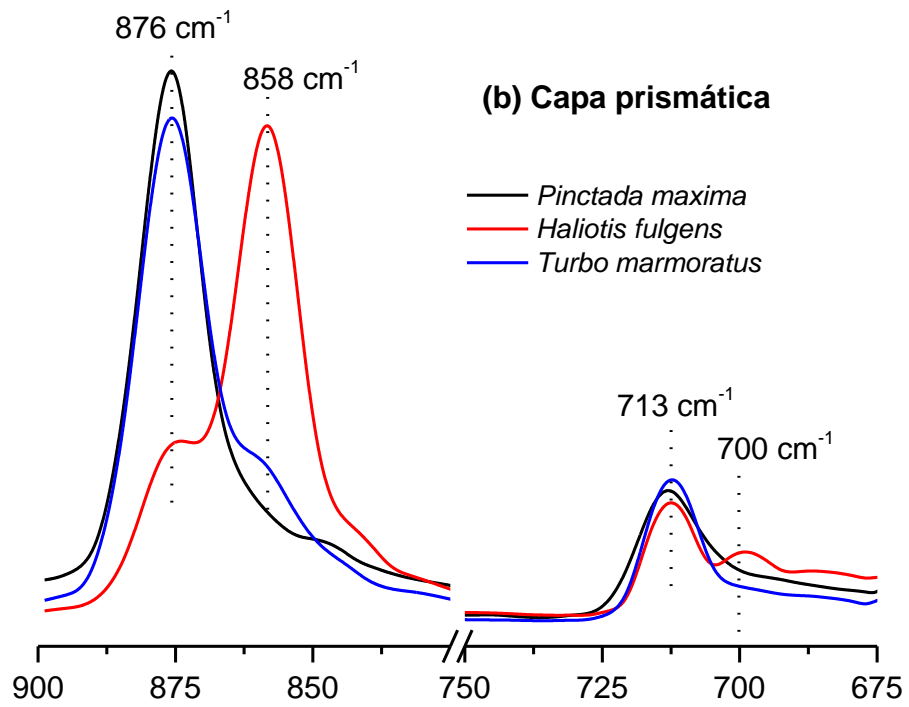
Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) para la capa prismática				
<i>Calcita geológica</i> [59]	<i>Pinctada máxima</i>	<i>Haliotis fulgens</i> *	<i>Turbo marmoratus</i>	Asignación
712	714	700/713	712	$\delta_4$
875	876	858/876	876	$\delta_2$
1082	n.d.	1082	n.d.	$\nu_1$
1430	1427	1474	1427	$\nu_3$

\* Los datos de FTIR para *Haliotis fulgens* no se toman en cuenta en este análisis dada la alta contaminación de la muestra de la capa prismática con la capa de nácar.  
n.d.: no detectado.

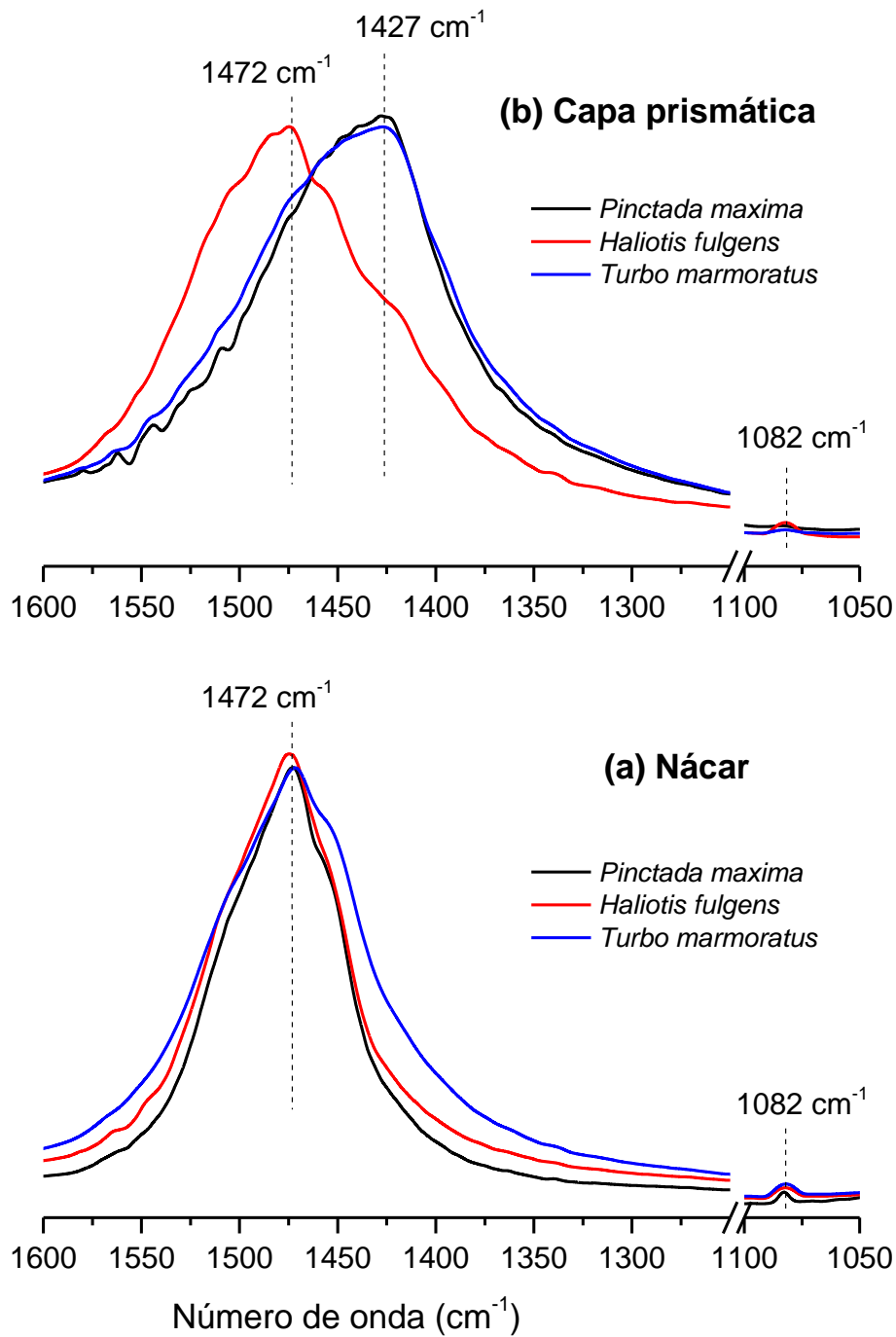
La comparación entre los tres moluscos (Figura 20 y Figura 21) no muestran diferencias significativas en las bandas características de cada capa que permitan identificar a la especie.

Tanto la espectroscopía infrarroja como la difracción de rayos X dan cuenta de la estructura atómica  $\text{CaCO}_3$ , pero no brindan información sobre la estructura jerárquica del nácar, la cual es detectable únicamente por microscopía electrónica.





**Figura 20.** Comparación de las bandas FTIR correspondientes a las señales para el balanceo O-C-O en el plano y fuera del plano para (a) el nácar y (b) la capa prismática de las especies analizadas.



**Figura 21.** Comparación de las bandas FTIR correspondientes a las señales para el estiramiento del enlace C-O simétrico y asimétrico para (a) el nácar y (b) la capa prismática de las especies analizadas.

### 5.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes por microscopía de la capa de nácar de los tres moluscos analizados permiten distinguir el nivel I y II de la estructura jerárquica de la aragonita. Las láminas paralelas apiladas con ligeros giros permiten la formación de encastramientos, responsables de la alta resistencia de los carbonatos biológicos. En comparación, no se observaron diferencias en cuanto a la forma y tamaño de las placas, entre los tres moluscos analizados. En promedio, el espesor de las placas es de 413 – 487 nm, lo cual concuerda con los valores reportados por otros investigadores [19], [20].

Los fuertes colores iridiscentes observados en las cochas marinas surgirían como resultado del apilamiento paralelo y ordenado de las placas de aragonita, que definen una alta densidad de surcos por los cuales la luz blanca puede difractar. Los patrones de interferencia serían entonces los responsables de la mezcla de colores tan particular [60].

Es importante destacar que la resolución máxima del equipo empleado solamente permitió distinguir el nivel 1 y 2 de la estructura jerárquica del nácar, siendo imposible detectar la presencia de proteínas y/o polisacáridos, característicos de la matriz orgánica. Sin embargo, las medidas por espectroscopía infrarroja permitieron arrojar luz acerca de la estructura de las proteínas que componen el biomineral. Este análisis será objeto de la siguiente Sección.

### 5.4. Determinación de la estructura secundaria de las proteínas

Además de contribuir a la identificación de compuestos y a la detección de enlaces, la espectroscopía infrarroja es una herramienta útil a la hora de determinar la estructura secundaria de las proteínas.

Antes de adentrarnos en la discusión, es importante aclarar que si bien existen varios trabajos publicados en donde se emplea la técnica, en la práctica existen varias dificultades a la hora de lograr una buena aproximación de la estructura secundaria de las proteínas: En primer lugar, la mayoría de las tablas empleadas para la asignación de señales se basan en proteínas en solución, por lo que pueden existir corrimientos de las señales al interactuar con las moléculas de agua. Además, estas últimas presentan una señal fuerte a  $1600\text{ cm}^{-1}$  que se superpone a la banda de la amida I y en consecuencia se disminuye considerablemente la resolución general del espectro. En segundo lugar, en todos los trabajos consultados, la elección de la línea de base siempre es arbitraria, lo cual

en principio no afectaría la posición de las bandas, pero si puede llegar a influir en la deconvolución del espectro. Por último, estrictamente existen infinitas soluciones posibles de deconvolución del espectro, dependiendo de las condiciones iniciales del algoritmo de análisis (cantidad y posición inicial de las bandas empleadas para la deconvolución, función elegida [gaussiana, lorentziana, etc], ancho medio de pico, amplitud, línea de base, etc). Para minimizar la variabilidad del análisis se siguió el protocolo descrito por Yang *et al.* [47], repitiendo el procedimiento del análisis espectral tres veces por cada muestra.

En todos los casos analizados se destaca el alto porcentaje de hojas  $\beta$  en la matriz orgánica de los moluscos (Tabla 11). Este tipo de conformación sería importante en proteínas como la Lustrina A, la cual es responsable de la plasticidad y resistencia a la fractura que tienen las capas de nácar [27]. Para el caso particular de *Haliotis fulgens* se observa un mayor porcentaje de ovillo estadístico, cuya presencia se atribuye a las proteínas responsables de regular el proceso de biomineralización. Son ejemplo las proteínas de la familia de la AP7 y AP24 las cuales participan de la inhibición del crecimiento del  $\text{CaCO}_3$ . La ventaja evolutiva de la estructura extendida y desordenada de ovillo estadístico consistiría en brindar una mayor superficie de contacto, mejorando la interacción entre las proteínas y los cristales de  $\text{CaCO}_3$  [26].

Para el caso de la capa prismática no se observaron grandes diferencias entre las distintas especies (Tabla 11). Al igual que para la capa de nácar, se destaca la estructura en forma de hoja  $\beta$  lo cual concuerda con datos reportados de la bibliografía, donde proteínas como la Prismalina 14 o de la familia MSI31 presentan este tipo de estructura mayoritariamente. Si bien existe para el caso de *Turbo marmoratus* y *Haliotis fulgens* una contaminación cruzada de la capa prismática con el nácar, tampoco se observaron grandes diferencias con *Pinctada máxima*, la cual es en su totalidad calcita. Esto sugiere que la conformación de estructura de hoja  $\beta$  y de ovillo estadístico son un sello particular de las proteínas responsables de la biomineralización, independientemente de la capa analizada. Como se mencionaba en la Sección 1.5, esta estructura jugaría un rol clave en las proteínas responsables de brindar estabilidad mecánica y en los procesos de nucleación y crecimiento de los cristales de  $\text{CaCO}_3$ .

**Tabla 11.** Comparación de la estructura secundarias de las proteínas que componen la capa de nácar y la capa prismática de los tres moluscos.

<i>Nácar</i>			
	<i>Pinctada máxima</i>	<i>Haliotis fulgens</i>	<i>Turbo marmoratus</i>
<b><i>Estructura secundaria</i></b>	%	%	%
<i>Hoja <math>\beta</math></i>	38±2	22±2	34±4
<i>Giro <math>\beta</math></i>	44±1	38±1	41±2
<i><math>\alpha</math> hélice</i>	12±2	13±2	8±1
<i>Hélice <math>3_{10}</math></i>	2.9±0.2	9.0±0.9	8±1
<i>Ovillo estadístico</i>	3±1	17±3	9±2
<b><i>Capa Prismática</i></b>			
	<i>Pinctada máxima</i>	<i>Haliotis fulgens</i>	<i>Turbo marmoratus</i>
<b><i>Estructura secundaria</i></b>	%	%	%
<i>Hoja <math>\beta</math></i>	44±2	44±2	39±2
<i>Giro <math>\beta</math></i>	39±1	39±1	48±1
<i><math>\alpha</math> hélice</i>	13±1	13±1	9±1
<i>Hélice <math>3_{10}</math></i>	2±1	2±1	3±3
<i>Ovillo estadístico</i>	1.0±0.2	1.0±0.2	0.2±0.2

## 5.5. Aspectos biológicos de la estructura de los carbonatos biogénicos

El cúmulo de estudios realizados sobre carbonatos biogénicos, y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesina, no aclaran la razón última que produce la distorsión cristalina del carbonato. Si bien se sabe que la misma se produce por la interacción con la matriz orgánica [18], [61] y no por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (ya que los carbonatos geológicos no muestran tal distorsión), no queda claro si esta distorsión resulta ser una consecuencia indeseada de la existencia de un precursor amorfo de carbonato en el proceso de biomineralización o si surge como una ventaja evolutiva.

El Prof. Zolotoyabko (Israel Institute of Technology, Israel), uno de los principales científicos en el tema de biomineralización de moluscos, ha hipotetizado acerca de alguna ventaja que tendría la distorsión cristalina del carbonato en el proceso de

biomineralización [7]. Basado en el crecimiento preferencial a lo largo del eje  $c$  del cristal, el Prof. Zolotoyabko propone que la distorsión generada por este crecimiento produciría un cambio en la presión interna de extensión de unos 150 – 200 MPa, que debería ser contrabalanceada por un predador que quisiera romper la concha en esa dirección (que, por otra parte, es la dirección natural de ataque de los predadores sobre los moluscos). Esta presión adicional corresponde a una fuerza de 150 – 200 MPa mm<sup>-2</sup>, lo que le supondría una ventaja al molusco para resistir ataques externos.

Por su parte Olson *et al.* [62] plantea que el espesor de las tabletas de aragonita depende de la temperatura ambiente, siendo mayor a altas temperaturas. En este sentido, es posible que el crecimiento cristalino no estuviera relacionado con una ventaja evolutiva, aunque aún se necesitan más estudios para descartar o validar la hipótesis.

## 6. Conclusiones

En todos los moluscos estudiados el nácar está compuesto de aragonita, mientras que la capa prismática es de calcita. El contenido orgánico, fundamentalmente proteico, reveló la presencia de una estructura mayoritariamente de tipo hoja  $\beta$ , la cual estaría vinculada a los procesos de nucleación y crecimiento del cristal, así como también contribuirían en parte a la alta resistencia mecánica del mineral. Respecto a esta última, los estudios por microscopía revelaron la presencia de las plaquetas de nácar, las cuales se disponen de forma ordenada con entrecruzamientos y encastrados que serían los principales responsables de la alta resistencia mecánica y de los colores característicos que hacen al material objeto de joyería.

Desde el punto de vista de la caracterización fisicoquímica, no se encontraron diferencias significativas entre los tres moluscos estudiados, en línea con lo reportado en la bibliografía. Las técnicas empleadas permitieron estudiar los diferentes niveles de la estructura jerárquica del biomineral.

En un futuro, sería interesante estudiar más a fondo las proteínas de la matriz orgánica de estos moluscos ya que se sabe que tienen propiedades osteogénicas y conocer como activan las vías de diferenciación celular, lo cual podría dar lugar a nuevos fármacos que para la resorción de calcio en los huesos, importante en el tratamiento de enfermedades graves, como la fibrosis quística.

## Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a los Profesores, Dr. Eduardo Méndez y al Dr. Santiago Botasini por sus enseñanzas en el Laboratorio de Biomateriales de la Facultad de Ciencias, UdelaR y por su ayuda para realizar mi tesina en su Laboratorio.

También a las otras integrantes del Laboratorio de Biomateriales como lo son la Dra. Fernanda Cerdá, Lic. Laura Luzuriaga y Lic. Paula Enciso por su calidez y atención.

Al Dr. Ricardo Faccio y su equipo por la realización de las medidas de rayos X en el Laboratorio de Cristalografía, Estado Sólido y Materiales de la Facultad de Química, UdelaR.

A mi padre y madre como así también a mis hermanas por su apoyo incondicional.



## 7. Referencias

- [1] S. Weiner, “An Overview of Biomineralization Processes and the Problem of the Vital Effect,” *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 54, no. 1, pp. 1–29, 2003.
- [2] A. Veis, “Mineralization in Organic Matrix Frameworks,” *Rev. Mineral. Geochem.*, vol. 54, no. 1, pp. 249–289, 2003.
- [3] C. Liu, L. Xie and R. Zhang, “Heterogeneous distribution of dye-labelled biomineralization proteins in calcite crystals,” *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–8, 2015.
- [4] N. K. Dhama, M. S. Reddy, and A. Mukherjee, “Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review,” *Front. Microbiol.*, vol. 4, p. 314, 2013.
- [5] A. Mason, K. Simkiss, “Sites of mineral deposition in metal accumulating cells,” *Exp. Cell Res.*, vol. 139, pp. 383–391, 1982.
- [6] M. Rahman and R. Shinjo, “Control of CaCO<sub>3</sub> Crystal Growth by the Acidic Proteinaceous Fraction of Calcifying Marine Organisms: An In Vitro Study of Biomin,” En *Advanced Topics in Biomineralization*, 2011.
- [7] E. Zolotoyabko, “Anisotropic Lattice Distortions in Biogenic Minerals Originated from Strong Atomic Interactions at Organic/Inorganic Interfaces,” *Adv. Mater. Interfaces*, vol. 4, no. 6, 2017.
- [8] E. M. Gerhard *et al.*, “Design strategies and applications of nacre-based biomaterials,” *Acta Biomater.*, vol. 54, pp. 21–34, 2017.
- [9] M. Lamghari *et al.*, “Stimulation of bone marrow cells and bone formation by nacre: In vivo and in vitro studies,” *Bone*, vol. 25, SUPPL. no.1, pp. 91–94, 1999.
- [10] P. Westbroek and F. Marin, “A marriage of bone and nacre,” *Nature*, vol. 392, no. 6679, pp. 861–862, 1998.
- [11] X. Hu, Z. Xu, Z. Liu, and C. Gao, “Liquid crystal self-templating approach to ultrastrong and tough biomimic composites,” *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–8, 2013.
- [12] L. Zhu, H. Wang, J. Xu, J. Lin and X. Wang, “Effects of nacre-coated titanium surfaces on cell proliferation and osteocalcin expression in MG-63 osteoblast-like

- cells” *African J. Biotechnol.*, vol. 10, pp. 15387–15393, 2011.
- [13] S. J. Köhler, P. Cubillas, J. D. Rodríguez-Blanco, C. Bauer and M. Prieto, “Removal of Cadmium from Wastewaters by Aragonite Shells and the Influence of Other Divalent Cations Removal of Cadmium from Wastewaters by Aragonite Shells and the Influence of Other Divalent Cations”, *Environ. Sci. Technol.* vol. 41, pp. 112–118, 2017.
- [14] Y. Du, F. Lian and L. Zhu, “Biosorption of divalent Pb, Cd and Zn on aragonite and calcite mollusk shells,” *Environ. Pollut.*, vol. 159, no. 7, pp. 1763–1768, 2011.
- [15] V. Achal, X. Pan, Q. Fu and D. Zhang, “Biom mineralization based remediation of As(III) contaminated soil by *Sporosarcina ginsengisoli*,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 201–202, pp. 178–184, 2012.
- [16] J. D. Currey, “Mechanical Properties of Mother of Pearl in Tension,” *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 196, no. 1125, pp. 443–463, 1977.
- [17] H. Kakisawa and T. Sumitomo, “The toughening mechanism of nacre and structural materials inspired by nacre,” *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 12, no. 6, p. 64710, 2011.
- [18] F. Nudelman, “Nacre biomineralisation: A review on the mechanisms of crystal nucleation,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 46, pp. 2–10, 2015.
- [19] D. Volkmer, “Biologically Inspired Crystallization of Calcium Carbonate beneath Monolayers: A Critical Overview,” *Handb. Biominer. Biol. Asp. Struct. Form.*, vol. 2, pp. 65–87, 2008.
- [20] H. Imai and Y. Oaki, “The Hierarchical Architecture of Nacre and its Mimetic Materials,” *Handb. Biominer. Biol. Asp. Struct. Form.*, vol. 2, pp. 89–107, 2008.
- [21] K. S. Katti, D. R. Katti, S. M. Pradham and A. Bhosle, “Platelet interlocks are the key to toughness and strength in nacre,” *J. Mater. Res.*, vol. 20, pp. 1097–1100, 2005.
- [22] J. Sun and B. Bhushan, “Hierarchical structure and mechanical properties of nacre: a review,” *RSC Adv.*, vol. 2, no. 20, p. 7617, 2012.

- [23] S. Collino, I. W. Kim and J. S. Evans, "Identification and structural characterization of an unusual RING-like sequence within an extracellular biomineralization protein, AP7," *Biochemistry*, vol. 47, no. 12, pp. 3745–3755, 2008.
- [24] "Protein Data Bank." [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/3d-view/1L3Q/1>. [Última entrada: 01-Ene-2018].
- [25] J. L. Raj I, A. Sadat, H. Hosseini, E. Dioguardi, K. Nishimura, L. Han, A. Villa, D. de Sanctis, "Structural Basis of Egg Coat-Sperm Recognition at Fertilization," *Cell.*, vol. 169, no. 7, pp. 1315–1326, 2017.
- [26] M. Wojtas, P. Dobryczycki and A. Ozyhar, "Intrinsically disordered proteins in biomineralization," *Adv. Top. Biominer.*, pp. 3–32, 2012.
- [27] N. Kröger, C. Bergsdorf and M. Sumper, "A new calcium binding glycoprotein family constitutes a major diatom cell wall component.," *EMBO*, vol. 13, pp. 4676–4683, 1994.
- [28] C. Zhang and R. Zhang, "Matrix proteins in the outer shells of molluscs," *Mar. Biotechnol.*, vol. 8, no. 6, pp. 572–586, 2006.
- [29] B. Zhang, B. A. Wustman, D. Morse, and J. S. Evans, "Model peptide studies of sequence regions in the elastomeric biomineralization protein, Lustrin A. I. The C-domain consensus-PG-, -NVNCT-motif," *Biopolymers*, vol. 63, no. 6, pp. 358–369, 2002.
- [30] X. Shen, *et al.*, "Molecular cloning and characterization of lustrin A, a matrixprotein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens*," *J. Biol. Chem.*, vol. 272(51), no. 51, pp. 32472–32481, 1997.
- [31] T. Samata, N. Hayashi, M. Kono, K. Hasegawa, C. Horita, and S. Akera, "A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata*," *FEBS Lett.*, vol. 462, no. 1–2, pp. 225–229, 1999.
- [32] A. Matsushiro and T. Miyashita, "Evolution of hard-tissue mineralization: Comparison of the inner skeletal system and the outer shell system," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 22, no. 3, pp. 163–169, 2004.

- [33] M. Michenfelder *et al.*, “Characterization of Two Molluscan Crystal-Modulating Biomineralization Proteins and Identification of Putative Mineral Binding Domains,” *Biopolymers*, vol. 70, no. 4, pp. 522–533, 2003.
- [34] I. M. Weiss, W. Göhring, M. Fritz, and K. Mann, “Perlustrin, a *Haliotis laevigata* (abalone) nacre protein, is homologous to the insulin-like growth factor binding protein N-terminal module of vertebrates,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 285, no. 2, pp. 244–249, 2001.
- [35] S. Sudo *et al.*, “Structures of mollusc shell framework proteins,” *Nature*, vol. 387, no. 6633, pp. 563–564, 1997.
- [36] M. Suzuki *et al.*, “Characterization of Prismaticin-14, a novel matrix protein from the prismatic layer of the Japanese pearl oyster ( *Pinctada fucata* ),” *Biochem. J.*, vol. 382, no. 1, pp. 205–213, 2004.
- [37] F. Marin *et al.*, “Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 40, pp. 33895–33908, 2005.
- [38] H. Miyamoto, “Similarities in the structure of nacrein, the shell-matrix protein, in a bivalve and a gastropod,” *J. Molluscan Stud.*, vol. 69, no. 1, pp. 87–89, 2003.
- [39] M. Kono, N. Hayashi, and T. Samata, “Molecular mechanism of the nacreous layer formation in *Pinctada maxima*,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 269, no. 1, pp. 213–218, 2000.
- [40] Y. Zhang *et al.*, “A novel matrix protein participating in the nacre framework formation of pearl oyster, *Pinctada fucata*,” *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 135, no. 3, pp. 565–573, 2003.
- [41] K. E. Van Holde, W. C. Johnson, and P. S. Ho, *Principles of Physical Biochemistry*. Pearson/Prentice Hall, 2006.
- [42] J. Goldstein *et al.*, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, vol. 44, 2003.
- [43] R. Jenkins and L. Snyder, *Introduction to X-Ray Powder Diffractometry*. John Wiley & Sons, 1996.

- [44] C. Hammond, *The Basics of Crystallography and Diffraction*. Oxford University Press, 2015.
- [45] J. Aizenberg, J. Hanson, T. F. Koetzle, L. Leiserowitz, S. Weiner, and L. Addadi, “Biologically Induced Reduction in Symmetry: A Study of Crystal Texture of Calcitic Sponge Spicules,” no. 7, pp. 414–422, 1995.
- [46] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, Wiley & Sons, 2004.
- [47] H. Yang, S. Yang, J. Kong, A. Dong, and S. Yu, “Obtaining information about protein secondary structures in aqueous solution using Fourier transform IR spectroscopy,” *Nat. Protoc.*, vol. 10, no. 3, pp. 382–396, 2015.
- [48] “Shimadzu.”[Online]:  
<https://www.shimadzu.com/an/ftir/support/ftirtalk/talk8/intro.html> [Última entrada: 01-Ene-2018].
- [49] L. Pereira-Mouriès *et al.*, “Soluble silk-like organic matrix in the nacreous layer of the bivalve *Pinctada maxima*,” *Eur. J. Biochem.*, vol. 269, no. 20, pp. 4994–5003, 2002.
- [50] D. Verma, K. Katti and D. Katti, “Nature of water in nacre: A 2D Fourier transform infrared spectroscopic study,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 67, no. 3–4, pp. 784–788, 2007.
- [51] O. B. A. Agbaje, D. E. Thomas, B. V McLnerney, M. P. Molloy and D. E. Jacob, “Organic macromolecules in shells of *Arctica islandica*: comparison with nacropismatic bivalve shells,” *Mar. Biol.*, vol. 164, no. 11, 2017.
- [52] A. Arakaki, K. Shimizu, M. Oda, T. Sakamoto, T. Nishimura, and T. Kato, “Biom mineralization-inspired synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials: organic molecular control of self-organization of hybrids,” *Org. Biomol. Chem.*, vol. 13, no. 4, pp. 974–989, 2015.
- [53] J. Keith *et al.*, “Comparative analysis of macromolecules in mollusc shells” *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.*, vol. 105, no. 3–4, pp. 487–496, 1993.
- [54] L. A. G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, “Control of aragonite or calcite

- polymorphism by mollusk shell macromolecules,” *Science* (80-. ), vol. 271, pp. 67–69, 1996.
- [55] J. Balmain, B. Hannoyer, and E. Lopez, “Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and X-ray diffraction analyses of mineral and organic matrix during heating of mother of pearl (nacre) from the shell of the mollusc *Pinctada maxima*,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 48, no. 5, pp. 749–754, 1999.
- [56] E. Zolotoyabko, E. N. Caspi, J. S. Fieramosca, and R. B. Von Dreele, “Bond lengths differences between the mollusk-made and geological calcium carbonate,” *Mater. Sci. Eng. A*, vol. 524, no. 1–2, pp. 77–81, 2009.
- [57] X. Li, W.-C. Chang, Y. J. Chao, R. Wang, and M. Chang, “Nanoscale Structural and Mechanical Characterization of a Natural Nanocomposite Material: The Shell of Red Abalone,” *Nano Lett.*, vol. 4, no. 4, pp. 613–617, 2004.
- [58] M. Rousseau *et al.*, “Multiscale structure of sheet nacre,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 31, pp. 6254–6262, 2005.
- [59] F. A. Andersen and L. Brečević, “Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate,” *Acta Chem. Scand.*, vol. 45, pp. 1018–1024, 1991.
- [60] T. Tan, D. Wong and P. Lee, “Iridescence of a shell of mollusk *Haliotis Glabra*” *Opt. Express*, vol. 12, no. 20, pp. 4847–4854, 2004.
- [61] B. Pokroy, J. S. Fieramosca, R. B. Von Dreele, A. N. Fitch, E. N. Caspi and E. Zolotoyabko, “Atomic Structure of Biogenic Aragonite,” *Chem. Mater.*, vol. 19, pp. 3244–3251, 2007.
- [62] I. C. Olson, R. Kozdon, J. W. Valley, and P. U. P. A. Gilbert, “Mollusk shell nacre ultrastructure correlates with environmental temperature and pressure,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 17, pp. 7351–7358, 2012.

# **ANEXO**

## Detección y cuantificación de las señales en XRD

El límite de detección (LOD, de sus siglas en inglés) se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Representa la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que se podría discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente.

La desviación estándar para la medida del blanco se determinó en el rango  $16^\circ < 2\theta < 22^\circ$ , con un número total de 300 puntos experimentales (Figura AI 1) que fueron normalizados entre 0 y 100 unidades.

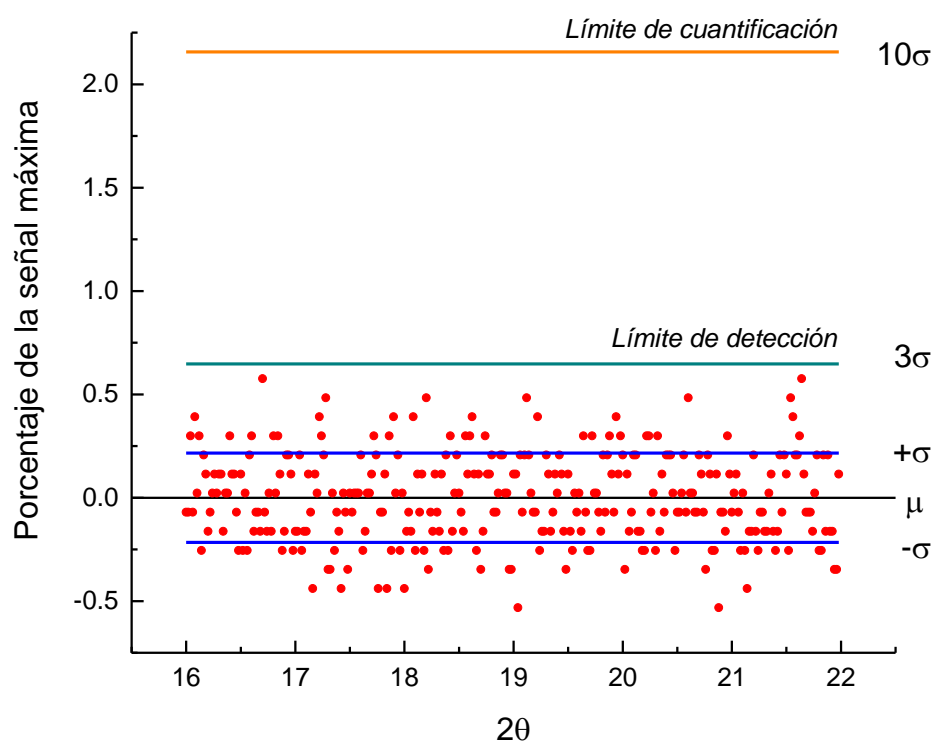


Figura AI 1. Registro de difracción de rayos X para el intervalo  $16^\circ < 2\theta < 22^\circ$ .

Se determinó los datos estadísticos correspondientes y se corrigieron los valores restándoles el valor medio ( $\mu$ ) (Tabla AI 1).



Tabla AI 1. Parámetros estadísticos de las medidas por rayos X de una región sin señales para el analito.

Parámetro estadístico	Datos crudos	Datos corregidos por el valor medio
Valor mínimo	0	-0.532
Valor máximo	1.108	0.576
Valor medio ( $\mu$ )	0.532	0
Desviación estándar ( $\sigma$ )	0.216	0.216

Una vez corregidos los datos por el valor medio, los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) se calculan fácilmente como:

$$\text{LOD} = 3 \sigma = 0.648$$

$$\text{LOQ} = 10 \sigma = 2.16$$

De esta forma, la señal mínima que puede detectarse y cuantificarse se calculan recordando que los datos se encuentran normalizados entre 0 y 100:

$$\% \text{ detectable} = \frac{\text{LOD}}{100 + \text{LOD}} \times 100 = 0.64 \%$$

$$\% \text{ cuantificable} = \frac{\text{LOQ}}{100 + \text{LOQ}} \times 100 = 2.1 \%$$

Esta metodología no toma en cuenta las diferentes absortividades molares para las señales analizadas, por lo que debe considerarse como una aproximación.