



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO DE LA MEMBRANA DE LA CÁSCARA DE HUEVO
POLICARBOXILADA COMO SUSTRATO PARA LA
MINERALIZACIÓN *IN VITRO***

Karla Cristina Silva Duque

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas

PROFESOR GUÍA: JOSÉ LUIS ARIAS BAUTISTA
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Proyecto FONDECYT 1180734

SANTIAGO, CHILE
2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFECTO DE LA MEMBRANA DE LA CÁSCARA DE HUEVO
POLICARBOXILADA COMO SUSTRATO PARA LA
MINERALIZACIÓN *IN VITRO***

Karla Cristina Silva Duque

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias
Biológicas

Nota Final:

Profesor Guía: José Luis Arias Bautista Firma:

Profesor Corrector: Andrónico Neira Carrillo Firma:

Profesor Corrector: Marco Galleguillos Caamaño Firma:

SANTIAGO, CHILE
2019

AGRADECIMIENTOS

En esta instancia, en donde finaliza una etapa de mi vida, quiero agradecer primero que todo, a mi papá, mi mamá, a mi hermana, y a mi pareja César, por apoyarme siempre en este camino, en todos mis proyectos y decisiones, por darme tanto amor cada día, y por hacerme confiar en Dios y darme fuerzas en los momentos difíciles.

Asimismo, quiero agradecer a mis amigas de la universidad, por haber sido mi apoyo y compañía en las largas horas de estudios, en los días de estrés y también en los días en que solo nos quedamos conversando al sol. También agradecer a mis amigas del laboratorio, por ayudarnos en nuestras tesis y darnos apoyo cuando lo necesitamos.

Agradecer también, a los profesores que me acompañaron durante esta última etapa, especialmente a la Dra. María Soledad Fernández y el Dr. José Luis Arias, quienes me apoyaron, guiaron y me ofrecieron su ayuda en todo momento, por su paciencia y dedicación en el proceso de la tesis.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos del Hospital Veterinario Puente Alto, por enseñarme y ayudarme siempre que lo he necesitado, por hacerme amar esta profesión y por haber contribuido en mi formación como Médico Veterinario.

ÍNDICE

I. CAPÍTULOS:

<i>Resumen</i>	6
<i>Abstract</i>	7
<i>Introducción</i>	8
<i>Revisión bibliográfica</i>	9
<i>Hipótesis y Objetivos</i>	13
<i>Materiales y Métodos</i>	14
<i>Resultados</i>	19
<i>Discusión</i>	30
<i>Conclusión</i>	32
<i>Bibliografía</i>	33

II. FIGURAS:

<i>Nro. 1: Diagrama de la cámara de cristalización de CaCO₃ in vitro</i>	16
<i>Nro. 2: Micropocillo control</i>	16
<i>Nro. 3: Micropocillo 2 y 3 con ESM intacta</i>	17
<i>Nro. 4: Micropocillo 4 y 5 con ESM policarboxilada con PGlu</i>	17
<i>Nro. 5: FTIR de ESM intacta, ESM policarboxilada con PGlu y ESM policarboxilada con PGlu-CH₃</i>	19
<i>Nro. 6: Imagen SEM de cristales de calcita aglomerados en el fondo del micropocillo control</i>	20
<i>Nro. 7: Imagen SEM de fondo de micropocillo control con cristales de calcita fusionados</i>	20
<i>Nro. 8: Imagen SEM de la ESM sin tratamiento con cristales de calcita aglomerados</i>	21
<i>Nro. 9: Imagen SEM de la ESM sin tratamiento. Mediciones del eje mayor de cristales de calcita</i>	21

<i>Nro. 10: Imagen SEM del fondo de micropocillo de ESM sin tratamiento con cristales de calcita aislados</i>	22
<i>Nro. 11: Imagen SEM del de fondo de micropocillo de ESM sin tratamiento con cristales de calcita con forma irregular y bordes redondeados</i>	22
<i>Nro. 12: Imagen SEM de ESM policarboxilada con PGlu con gran cantidad de cristales de calcita distribuidos uniformemente</i>	23
<i>Nro. 13: Imagen SEM de ESM policarboxilada con PGlu. Mediciones del eje mayor de cristales de calcita</i>	23
<i>Nro. 14: Imagen SEM del fondo de micropocillo de ESM PGlu con cristales de calcita aislados</i>	24
<i>Nro. 15: Imagen SEM del fondo de micropocillo de ESM PGlu, en donde se observan cristales fusionados y cristales aislados</i>	24

III. GRÁFICOS:

<i>Nro.1: Número promedio de cristales de calcita por mm² obtenidos en ESM sin tratamiento y ESM PGlu.....</i>	25
<i>Nro. 2: Tamaño promedio de cristales de calcita obtenidos en ESM sin tratamiento y ESM PGlu.....</i>	26
<i>Nro. 3: Número promedio de cristales de calcita por mm² en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control</i>	27
<i>Nro. 4: Tamaño promedio de cristales de calcita en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control</i>	29

IV. TABLAS:

<i>Nro. 1: Promedio de cristales/mm² y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en ESM y ESM PGlu</i>	25
<i>Nro. 2: Promedio del tamaño de cristales y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en ESM sin tratamiento y ESM PGlu</i>	27

Nro. 3: Promedio de cristales/mm² y desviación estándar de los cristales de Calcita presentes en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control 28

Nro. 4: Promedio del tamaño de cristales y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control 29

RESUMEN

La membrana de la cáscara de huevo (ESM) es una matriz orgánica que está formada por 2 capas de fibras entrecruzadas de proteínas, la membrana externa y la membrana interna; en la membrana externa se encuentran las mamilas, las cuales son sitios de nucleación donde se produce el inicio del depósito de los cristales de CaCO_3 . Las proteínas de la ESM están formadas por varios aminoácidos, entre ellos el ácido glutámico (Glu) y el aspártico (Asp), los cuales poseen grupos carboxilos libres, los que, en otros sistemas distintos a la cáscara del huevo, han mostrado la capacidad de controlar el crecimiento y forma de los cristales de CaCO_3 .

En el presente estudio, se utilizó el método de difusión de gases para evaluar el efecto de la ESM policarboxilada con ácido poliglutámico (PGlu) sobre la mineralización de CaCO_3 *in vitro* y comparar los resultados con la mineralización en la ESM sin tratamiento. Además, se utilizó espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para determinar que el PGlu se acopló a la ESM, y posteriormente los resultados se analizaron mediante SEM, en donde se pudo establecer la presencia del polimorfo calcita en una gran cantidad por toda la membrana, se determinó el tamaño promedio y la morfología de los cristales. De esta forma se pudo establecer la influencia de la ESM funcionalizada sobre la mineralización *in vitro*.

Palabras claves: Biomineralización, Carbonato de Calcio, Ácido poliglutámico, Membrana de la cáscara de huevo.

ABSTRACT

The eggshell membrane (ESM) is an organic matrix made up of 2 layers of cross-linked protein fibers, the outer membrane and the inner membrane; on the outer membrane are the mammillae, which are nucleation sites where the onset of the CaCO₃ crystals deposition occurs. ESM proteins are made up of several amino acids, including glutamic (Glu) and aspartic acids (Asp), which have free carboxylic groups, which in other systems excluding the eggshell have the ability to control the growth and shape of CaCO₃ crystals.

In the present study, the gas diffusion method was used to evaluate the effect of polycarboxylated ESM with polyglutamic acid (PGlu) on *in vitro* mineralization of CaCO₃ and compare the results with mineralization in ESM without treatment. In addition, infrared Fourier transform spectrometry (FTIR) was used to determine that the PGlu was coupled to the ESM, and subsequently the results were analyzed by SEM, where it was possible to establish the presence of the calcite polymorph in a large amount throughout the entire membrane, and the average size and morphology of the crystals were also determined. In this way, the influence of functionalized ESM on *in vitro* mineralization could be established.

Keywords: Biomineralization, Calcium Carbonate, Polyglutamic Acid, Egg Shell Membrane.

INTRODUCCIÓN

La biomineralización es el proceso mediante el cual se forman materiales inorgánicos a partir de una matriz orgánica. Este proceso se genera en organismos vivos como conchas, cáscaras de huevos, huesos, dientes, entre otros (Lowenstam y Weiner, 1989). Existen diversos estudios en donde se ha demostrado que la matriz orgánica cumple un rol importante en la formación de los cristales, ya que controlan la nucleación, crecimiento, forma y estructura de éstos (Wada *et al.*, 2014).

Uno de los biominerales más ampliamente estudiados es el carbonato de calcio (CaCO_3), ya que es el más abundante entre los diferentes taxones (Weiner y Dove, 2003) y además es utilizado en la industria para diferentes propósitos (Chen *et al.*, 2018). Es por esto que, para entender mejor el mecanismo de mineralización, se ha estudiado el efecto de varios aditivos en la mineralización del CaCO_3 (Zheng *et al.*, 2012).

Entre los sistemas de biomineralización conocidos, la cáscara de huevo aviar es uno de los modelos estudiados para ver el efecto de aditivos en la mineralización del CaCO_3 , debido a sus características distintivas como la naturaleza del depósito mineral, ausencia de células que se mezclan con la estructura mineral, y la rapidez del proceso de mineralización de la cáscara (Arias *et al.*, 2007a). Entre los componentes de la membrana de la cáscara de huevo (ESM) encontramos ácido glutámico, el cual posee fuertes interacciones electrostáticas con el Ca^{2+} (Zheng *et al.*, 2012), debido a los grupos carboxilo que posee (Ren *et al.*, 2011). Lo anterior controla la cristalización: la nucleación, selección polimórfica y el crecimiento del biomineral. La adición en la ESM de ácido poliglutámico influye predominantemente en la biomineralización (Stajner *et al.*, 2018).

Por esta razón, el uso de la ESM aviar resulta interesante como un soporte para la biomineralización, determinando el efecto de la ESM policarboxilada como sustrato para la mineralización de CaCO_3 *in vitro*.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La biomineralización es el proceso mediante el cual los organismos vivos forman minerales estructurados, como conchas, cáscaras de huevos, huesos y dientes (Lowenstam y Weiner, 1989). Los biominerales se forman a través de interacciones entre minerales inorgánicos con macromoléculas que controlan la nucleación y el crecimiento, regulan la morfología, estructura y orientación del componente inorgánico. Las moléculas orgánicas cumplen un rol importante en el proceso de cristalización y se propone que tienen tres funciones: a) promover la nucleación heterogénea (actúan como plantilla), b) podrían inhibir el crecimiento de cristales por su adsorción y c) podrían estabilizar la fase precursora amorfa (Wada *et al.*, 2014).

En las últimas décadas, los científicos se han interesado en el estudio de la biomineralización debido a que la capacidad de producir minerales inorgánicos es de gran valor en algunas áreas como electrónica, magnetismo, entre otros (Mann, 2001). Por lo tanto, el campo de la biomineralización se ha ampliado para incluir la aplicación de estrategias adaptadas de la biología a la producción de materiales sintéticos (Estroff, 2008).

Entre los minerales existentes, el CaCO_3 es el mineral biogénico más abundante, tanto en términos de las cantidades producidas como por su distribución generalizada entre muchos taxones diferentes (Weiner y Dove, 2003). Reside en diferentes organismos como protección o soporte estructural, y también se ha utilizado ampliamente en muchas industrias para plásticos, fabricación de papel, cosméticos, pinturas y aplicaciones farmacéuticas recientes (Chen *et al.*, 2018). Existen tres principales formas cristalinas de CaCO_3 : calcita, aragonita y vaterita (Ren *et al.*, 2011). La aragonita y la calcita tienen una mayor estabilidad termodinámica que la vaterita (Chen *et al.*, 2018).

En el proceso de formación del CaCO_3 , están involucradas una variedad de pequeñas moléculas inorgánicas (iones de fosfato, iones de magnesio, etc.) y macromoléculas (proteínas que contienen grupos hidroxilo o carboxilo) que desempeñan un papel insustituible, que afecta la nucleación y el crecimiento de los cristales de CaCO_3 de una manera única, regulando su fase y forma (Chen *et al.*, 2018). En estudios *in vitro*, se ha observado que los principales factores que modifican la morfología de estos polimorfos

dependen en gran medida de: temperatura, concentración de reactantes y aditivos, pH de la solución, entre otros (Al-Rawajfeh, 2008).

Para comprender mejor el mecanismo de la mineralización biológica, se han estudiado los efectos de varios aditivos en la mineralización del CaCO_3 (Zheng *et al.*, 2012). Dentro de estos aditivos, las proteínas pueden influir en el crecimiento, orientación espacial, forma de los cristales de CaCO_3 en el proceso de biomineralización (Chen *et al.*, 2018). Además, las proteínas ricas en ácido aspártico (Asp) y ácido glutámico (Glu) son componentes principales de una fracción soluble de macromoléculas, las cuales controlan la nucleación, selección polimórfica y el crecimiento del biomineral (Stajner *et al.*, 2018). Esto se debe a que Asp y Glu poseen fuertes interacciones electrostáticas con el Ca^{2+} (Zheng *et al.*, 2012), por su carga negativa del grupo carboxilo, que interactúa con los iones de Ca^{2+} (Ren *et al.*; 2011). El campo eléctrico controla aspectos importantes de la cristalización mineral, como la reorganización y la condensación de los grupos en la interfaz (Wada *et al.*, 2014).

Se han usado análogos sintéticos de moléculas naturales que imitan la composición de los aminoácidos, dentro de los cuales el ácido Poliglutámico (PGlu) influye predominantemente en la biomineralización y en los experimentos de precipitación de CaCO_3 (Stajner *et al.*, 2018).

Entre los sistemas de biomineralización conocidos, uno de los estudiados es la cáscara de huevo aviar, debido a sus características distintivas como la naturaleza del depósito mineral, ausencia de células que se mezclan con la estructura mineral, y la rapidez del proceso de mineralización de la cáscara (Arias *et al.*, 2007a). Es un compuesto biocerámico que consiste en CaCO_3 depositado en una matriz orgánica, la membrana semipermeable de la cáscara de huevo, la cuál es una matriz orgánica que se puede utilizar para el desarrollo de materiales y plantillas biocompatibles (Kumaran *et al.*, 2003).

La cáscara de huevo aviar es un compuesto biocerámico natural acelular altamente ordenado, compuesto por una fase inorgánica y otra orgánica en forma de proteínas y proteoglicanos (Arias *et al.*, 2007b). Químicamente está compuesta por aproximadamente un 95% de CaCO_3 en forma de calcita y aproximadamente un 3,5% de proteínas y proteoglicanos (Sarathi y Dash, 2014). Estructuralmente está constituida por cuatro capas:

membrana de la cáscara, capa mamilar, capa empalizada y cutícula (Fernández y Arias, 2000).

La membrana de la cáscara (ESM, por sus siglas en inglés Egg Shell Membrane) es la capa más interna de la cáscara de huevo y está compuesta por dos capas fibrilares no mineralizadas: una interna y una externa (Arias *et al.*, 2007a). El espesor de la capa externa es de 50-70 μm y el de la capa interna es de 15-30 μm . Existen espacios entre las fibras que componen las capas, los cuales son altamente porosos; el tamaño de los poros entre fibras es de aproximadamente 5 μm , lo que garantiza la permeabilidad al agua y al gas (Park *et al.*, 2016). Las fibras de ambas capas tienen un núcleo central, y su composición principal es colágeno tipo X (Fernández y Arias, 2000), el cual no permite la mineralización de la ESM, pero sí permite la correcta mineralización de la cáscara (Arias *et al.*, 2007b).

En la porción más externa de la ESM, se forman acúmulos de materia orgánica llamadas mamilas, las cuales son sitios de nucleación donde se produce el inicio del depósito de los cristales de calcita, debido a la presencia en estas de mamilán, un proteoglicano sulfatado que aporta cargas negativas a la superficie de la ESM. Luego se produce el crecimiento de las columnas de calcita para formar la capa calcificada o palisada, que es la cáscara de huevo propiamente tal (Arias *et al.*, 2007a).

La ESM presenta varios grupos químicos libres, como los grupos amino, carboxilo e hidroxilo provenientes de los aminoácidos y carbohidratos de las glicoproteínas que la constituyen, los que le otorgan una buena capacidad de adsorción (Park *et al.*, 2016). Dentro de los aminoácidos de la ESM, el Glu y Asp, están en un 13,8% y 7,9% respectivamente (Britton y Hale, 1976); y por lo que se mencionó, en otros modelos biológicos se ha demostrado que poseen la capacidad de controlar el crecimiento y forma de los cristales al interactuar con los iones de calcio (Stajner *et al.*, 2018). Sin embargo, su presencia en la ESM no se ha podido relacionar con la mineralización de la cáscara del huevo, donde como se ha dicho, las cargas negativas de las mamilas son las responsables de la nucleación de los cristales de calcita. No obstante, si se aumentaran experimentalmente el número de grupos carboxilos, podría incrementarse la nucleación de cristales sobre la ESM.

De esta manera, al modificar diversas propiedades químicas de la ESM se podrían encontrar nuevas aplicaciones. Estas modificaciones se pueden realizar mediante poliaminoácidos para estudiar la formación de los cristales de CaCO_3 . Sin embargo, la interacción cooperativa de materiales inorgánicos con macromoléculas orgánicas para fabricar materiales artificiales no se ha entendido completamente (Wada *et al.*, 2014). Por esta razón, el uso de la ESM aviar resulta interesante como un soporte para la biomineralización y así determinar el efecto de la ESM policarboxilada como sustrato para la mineralización de CaCO_3 *in vitro*.

HIPÓTESIS

Si en diversos modelos de biomineralización hay grupos carboxilos que controlan el crecimiento y formación de cristales de CaCO_3 , entonces al agregarle más grupos carboxilos a la ESM se modificará la cristalización.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la ESM policarboxilada como sustrato para la mineralización de CaCO_3 *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la ESM policarboxilada con PGlu sobre la morfología, tamaño, polimorfismo y número de los cristales de CaCO_3 .
2. Comparar la morfología, tamaño, polimorfismo y número de los cristales de CaCO_3 depositados sobre ESM policarboxilada con PGlu y ESM sin tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la ESM

Para realizar los ensayos de cristalización *in vitro* primero se debe tener la ESM policarboxilada. Para obtener la ESM se ocuparon huevos comercialmente disponibles; se realizó un orificio en el polo posterior del huevo, y se vació el contenido. Luego se lavó el huevo con agua destilada por dentro y por fuera, y después con agua desionizada. Posteriormente se agregó ácido acético al 1 % en su interior y se dejó reposar por 25 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se lavó 10 veces con agua desionizada, y luego se removió la cáscara dejando la membrana intacta, para luego lavarla con agua desionizada. La membrana se dejó en un vaso con ácido acético al 1 % por 48 horas a 4 °C. Una vez pasado el tiempo, se realizó el lavado de la ESM con agua desionizada por 5 minutos. Se cortaron piezas rectangulares de 2 cm de largo por 0.3 mm de ancho.

Protección grupos carboxilos de PGlu (Albert et al., 1987):

El PGlu posee grupos carboxilos libres (-COOH) los que se protegieron para evitar la formación de un enlace peptídico no deseado, permitiendo que grupo amino (-NH₂) del PGlu pueda formar enlaces peptídicos con los carboxilos libre de la ESM, e impidiendo las interacciones con los grupos aminos de la ESM o carboxilos de las propias cadenas de PGlu.

Para llevar a cabo esta protección, dichos grupos fueron esterificados con grupos metilo (-CH₃). Para ello, se pesaron 15 mg de PGlu. Luego se suspendieron los 15 mg de PGlu junto con 7 mg de sulfato de sodio (Na₂SO₄) en 10 mL de metanol (CH₃OH) en un tubo Falcon de 50 mL. Además, se agregaron 2 mL de ácido tetrafluorobórico (HBF₄) con dietil éter lentamente con una pipeta plástica. Se mantuvo la solución en agitador magnético a temperatura ambiente por 15 horas. Pasado este tiempo se removió el agua resultante por decantación y se lavó con 5 mL de CH₃OH. Luego se centrifugó a 250 x G (3.500 rpm) por 5 min, después se filtró en papel filtro y se dejó secar el aire para que se evaporara el CH₃OH. El sólido retenido en el filtro corresponde a PGlu con los grupos carboxilos esterificados con metilo (PGlu-CH₃). Éste sólido se conservó para realizar los siguientes pasos.

Preparación de la ESM Policarboxilada mediante la unión (Crosslinking) de ESM con PGlu-CH₃ (Grabarek and Gergely, 1990; Enrione *et al.*, 2013):

Previamente se realizó FTIR de la ESM intacta para identificar los grupos funcionales presentes en la membrana. Paralelamente se prepararon 100 mL de “buffer” de activación 0,1M MES, 0,5M NaCl, pH 6,0 de los cuales se utilizaron 10 mL de “buffer” que se agregaron en un tubo Falcon de 50 mL junto con 300 mg de piezas de ESM (membranas de dos huevos cortadas en piezas). Además, se añadieron 4 mg de Carbodiimida (EDC) a la solución y 6 mg de N-hydroxysulfosuccinimida (NHS) al tubo Falcon, obteniendo una concentración final 5 mM. Se dejó en el agitador magnético por 15 minutos a temperatura ambiente.

Mientras tanto se agregó 1 mL de “buffer” fosfato salino (PBS) pH 7,5 al tubo con PGlu-CH₃. Una vez pasados los 15 minutos se mezclaron ambos tubos (PGlu-CH₃ con ESM) y se dejó reaccionar en el agitador por 2 horas a temperatura ambiente. Luego se lavaron las membranas dos veces con metanol : agua (3:1), se filtraron en papel filtro y se secaron a temperatura ambiente para posteriormente hacer FTIR a un trozo de estas membranas (ESM+ PGlu+CH₃).

Desbloqueo (cleavage) de grupos carboxilos de ESM+ PGlu+CH₃ (Corey *et al.* 1977):

Se sumergieron las membranas (ESM+ PGlu+CH₃) en 10 mL de metanol : agua (3:1), o sea 7,5 mL metanol + 2,5 mL agua, y se añadieron 240 mg de hidróxido de litio (LiOH). Se hizo reaccionar a 4 °C por 15 horas, con este proceso se obtiene ESM acoplada a PGlu. Finalmente se filtraron las membranas en papel y se lavaron con etanol sobre el filtro. Se hizo FTIR de un trozo de estas membranas y posteriormente se guardaron en agua desionizada a 4 °C. De esta forma la ESM quedó lista para reaccionar con una fuente de iones de Ca²⁺.

Ensayo de cristalización *in vitro*

Para realizar el ensayo de cristalización de CaCO₃ se utilizó el método de difusión de gases, el cual consiste en una cámara experimental hermética (Figura 1). La cámara está cubierta y compuesta por una placa Petri de vidrio de 85 mm de diámetro, con un orificio central en la

base de 18 mm que la comunica con un recipiente cilíndrico de plástico de 50 mm de diámetro y 30 mm de altura. En este recipiente se depositaron 3 mL de una solución de bicarbonato de amonio $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ 25 mM. Esta solución se descompone en amoníaco y dióxido de carbono generando una atmósfera gaseosa de CO_2 .

La parte superior de la cámara se dividió en cinco partes, en donde se pusieron los micropocillos de poliestireno. En cada pocillo se agregaron 35 μL de una solución de CaCl_2 200 mM, la cual está tamponada a pH 9 usando una solución amortiguadora TRIS 200 mM. De esta forma, se espera que los iones Ca^{2+} presentes en los micropocillos reaccionen con el CO_2 formando cristales de CaCO_3 .

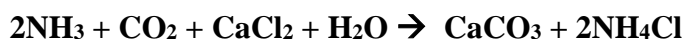
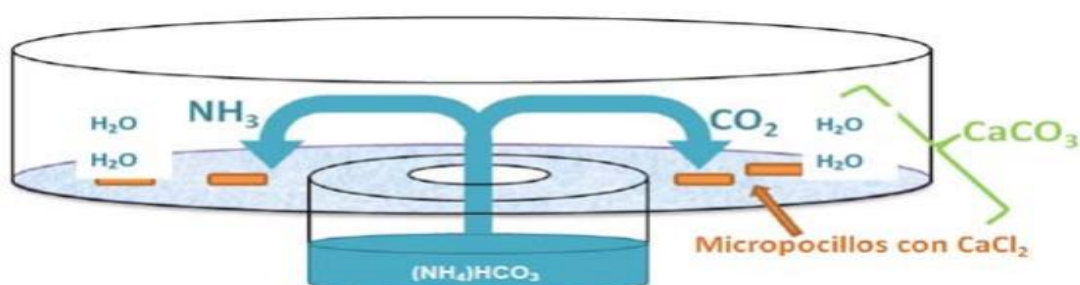


Figura 1. Diagrama de la cámara de cristalización de CaCO_3 *in vitro*.

Las ESM previamente tratadas fueron colocadas en cada micropocillo, en donde hubo un micropocillo control, dos con la ESM intacta y dos con la ESM policarboxilada con PGlu, tal como muestran las siguientes figuras:

- **Micropocillo 1 (M1):** Control, contiene 35 μL de solución de CaCl_2 200 mM en TRIS 200 mM a pH 9 (Figura 2).



Figura 2: Micropocillo control. Relleno de color gris corresponde a CaCl_2 .

- **Micropocillo 2 y 3 (M2 Y M3):** Membrana intacta en micropocillos, se pegó en la parte superior del micropocillo con las mamilas hacia la solución. Contiene 35 μL de la solución CaCl_2 de 200 mM en TRIS 200 mM a pH 9 (Figura 3).



Figura 3: Micropocillo 2 y 3 con ESM intacta en color rojo.

- **Micropocillo 4 y 5 (M4 Y M5):** Membrana policarboxilada con PGlu en micropocillos, se pegó en la parte superior del micropocillo con las mamilas hacia la solución. Contiene 35 μL de la solución CaCl_2 de 200 mM en TRIS 200 mM a pH 9 (Figura 4).

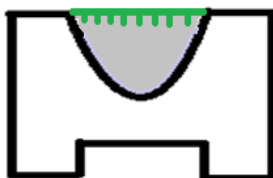


Figura 4: Micropocillo 4 y 5 con ESM policarboxilada con PGlu en color verde.

Finalmente se depositaron 3 mL de la solución de $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ en el recipiente cilíndrico que forma parte de la cámara de cristalización. Posteriormente la placa se cubrió con una tapa, se selló con parafilm, para posteriormente dejar incubando por 24 horas a temperatura ambiente.

Una vez que transcurrieron las 24 horas, se realizaron lavados en cada micropocillo, utilizando las siguientes soluciones: dos lavados con agua destilada, dos lavados con alcohol etílico al 50 %, dos lavados con alcohol etílico al 80 %, dos lavados con alcohol etílico al 100 %. Luego, cada micropocillo fue sombreado con oro utilizando un equipo sombreador Electron Microscopy Sciences EMS-550 (Automated Sputter Coated), y finalmente fueron observadas las muestras en un microscopio electrónico de barrido (SEM)

(Jeol JS-IT300 EDS-Oxford Instrument, en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile).

Análisis de las preparaciones

Para determinar la morfología, polimorfismo, el tamaño y el número de los cristales de CaCO_3 en cada ESM y el fondo del micropocillo, se utilizó SEM. Para la evaluación del tamaño de los cristales, se midió el eje mayor de cada cristal con herramientas de medición presentes en el programa del computador del microscopio electrónico. Para el tamaño promedio o media de los cristales en cada micropocillo, se tomaron aleatoriamente cristales presentes en el campo y por cada micropocillo se tomaron 8 imágenes en aumento 1000X, teniendo así las mediciones de tamaño de cristales. Para determinar el número de cristales, se tomaron imágenes en aumento 250X y luego cada imagen se dividió en 9 campos. Se contaron por campo los cristales presentes en cada micropocillo y de esta forma se obtuvo la cantidad promedio de cristales. La presencia de cristales de CaCO_3 en los micropocillos, mediante SEM nos permitió determinar el polimorfismo de estos cristales.

Los resultados fueron analizados estadísticamente para obtener la media y desviación estándar de cada micropocillo. Para determinar el tipo de distribución de datos se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk. Para la determinar si hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control, sin tratamiento y con tratamiento, se utilizó la prueba de T de Student cuando los datos presentaron distribución normal. En el caso de los datos que presentaron distribución no normal, se utilizó la prueba de Wilcoxon. Se consideró significancia estadística con $P < 0,05$. Todos los análisis se hicieron con el software Infostat.

RESULTADOS

Para realizar los ensayos de cristalización lo primero que se realizó fue la funcionalización de la ESM, por lo que se hicieron FTIR de la membrana en las distintas etapas del proceso de policarboxilación con el fin de demostrar que efectivamente el PGlu se acopló a la ESM. Por lo tanto, se realizó FTIR comparando las curvas, primero de la ESM intacta, luego de la ESM acoplada con PGlu-CH₃, en donde los grupos carboxilos se encuentran esterificados y se muestra una curva similar a la de ESM intacta; y finalmente ESM PGlu, en donde aparece un pico diferencial de transmitancia a 1441 cm⁻¹ al desbloquear los grupos carboxilos, correspondiente a grupos carboxilos simétricos ionizados.

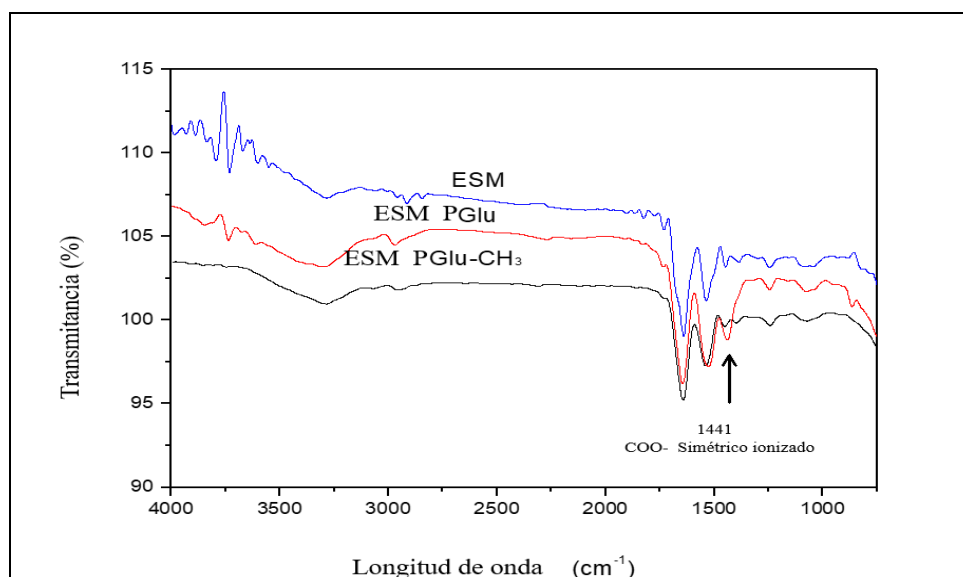


Figura 5. FTIR de ESM intacta, ESM policarboxilada con PGlu y ESM policarboxilada con PGlu con los grupos carboxilos esterificados con -CH₃.

Luego, según los ensayos realizados, se determinó el tamaño, número, morfología y polimorfismo de los cristales de CaCO₃, evaluando el efecto que tuvo la ESM policarboxilada en los cristales de CaCO₃. Los análisis se realizaron en las ESM y en los fondos de los micropocillos, en donde los resultados fueron los siguientes.

Micropocillo Control

Se analizó el micropocillo control, el cual fue expuesto durante 24 horas solo a CaCl_2 con el fin de demostrar que existe un depósito de cristales de calcita en presencia de la solución ya mencionada. Además, en las imágenes se pudo evidenciar gran presencia de cristales de calcita, los cuales están fusionados, con caras lisas y bordes rectos; y en menor, cantidad cristales de calcita aislados, con caras lisas y simétricas. El número promedio de cristales de calcita fue de 94 cristales/ mm^2 . El tamaño de los cristales de calcita se midió en el eje mayor de cada uno, obteniendo un tamaño promedio de 22,45 μm .

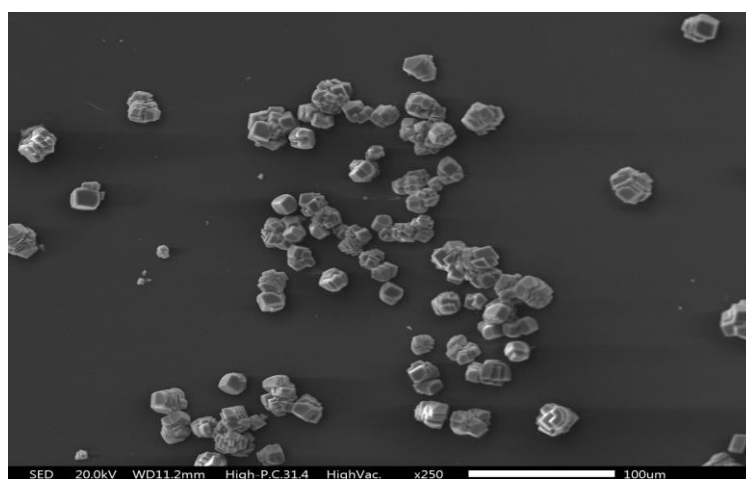


Figura 6. Imagen SEM de cristales de calcita aglomerado en el fondo del micropocillo control.

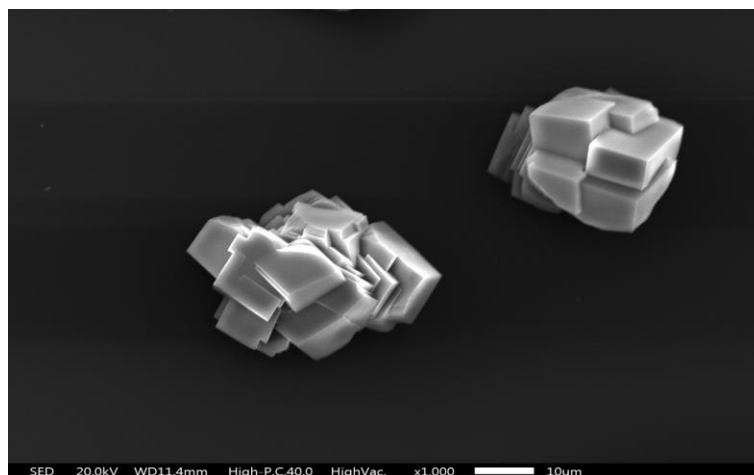


Figura 7. Imagen SEM de fondo de micropocillo control con cristales de calcita fusionados.

Micropocillo con ESM sin tratamiento

Se analizó el micropocillo con ESM y por otra parte el fondo del micropocillo, ya que lo que quiso ver es el crecimiento de cristales desde la membrana.

ESM sin tratamiento:

En las ESM sin tratamiento se pudieron ver cristales de calcita modificados, con bordes redondeados y forma irregular; en su mayoría se encontraron cristales formando parte de aglomerados y columnas; y en menor cantidad se encontraron cristales aislados también con bordes redondeados. El número promedio de cristales de calcita fue de 674 cristales/mm². El tamaño de los cristales se midió en el eje mayor de cada uno, obteniendo un promedio de 10,66 μm .



Figura 8. Imagen SEM de la ESM sin tratamiento con cristales de calcita aglomerados.

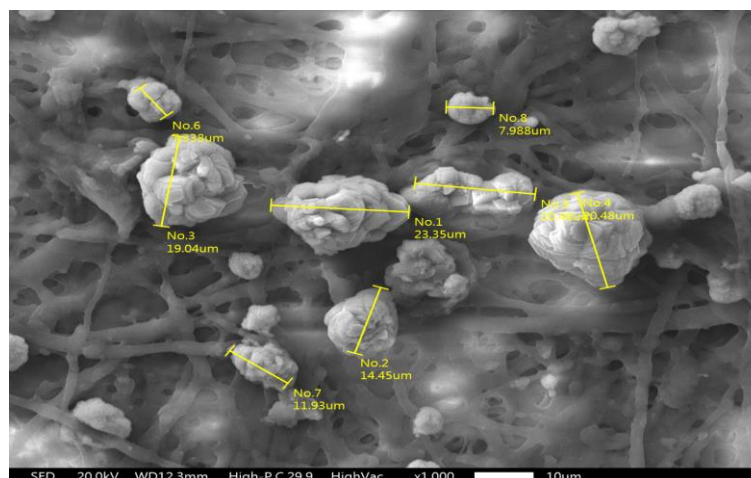


Figura 9. Imagen SEM de la ESM sin tratamiento. Mediciones del eje mayor de cristales de calcita.

Fondo de Micropocillo ESM sin tratamiento:

Se analizó el fondo del micropocillo de ESM sin tratamiento, en donde se pudo observar una menor cantidad de cristales de calcita en comparación con los cristales presentes en la ESM; la mayoría se encontró en forma aislada, poseen bordes redondeados y algunos con forma irregular, en menor cantidad se encontraron cristales aglomerados, también con bordes redondeados. El número promedio de cristales de calcita fue de 434 cristales/ mm². El tamaño de los cristales se midió en el eje mayor de cada uno, obteniendo un promedio de 18,57 μm.

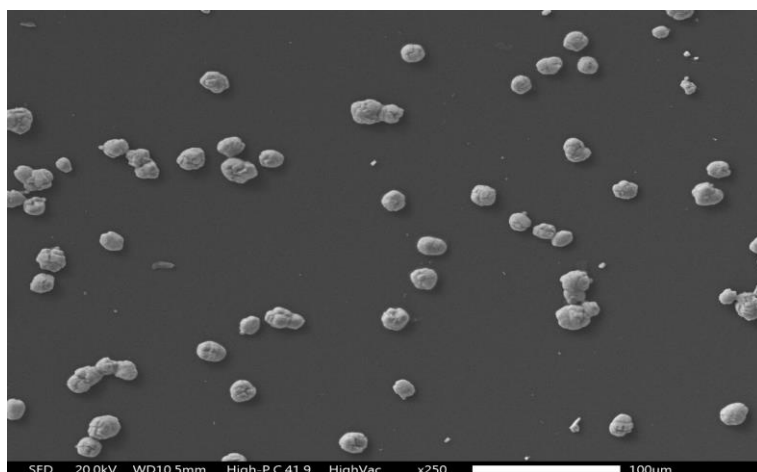


Figura 10. Imagen SEM del fondo de micropocillo de ESM sin tratamiento con cristales de calcita aislados.

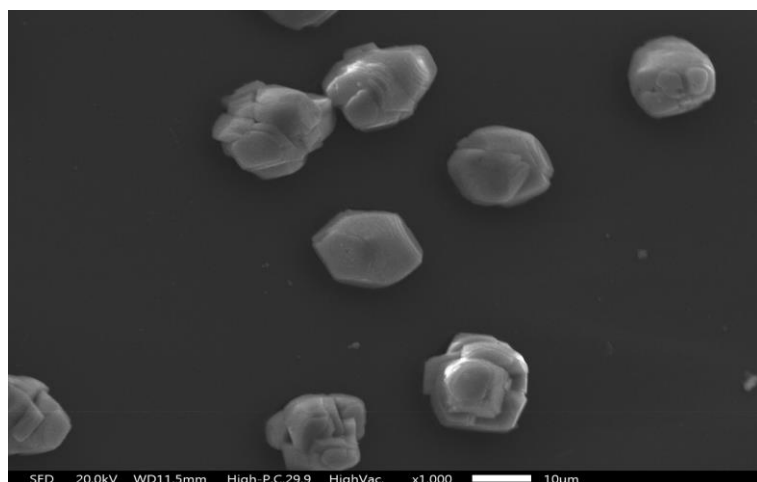


Figura 11. Imagen SEM del de fondo de micropocillo de ESM sin tratamiento con cristales de calcita con forma irregular y bordes redondeados.

Micropocillo con ESM policarboxilada con PGlu

ESM policarboxilada con PGlu:

En la ESM PGlu se observaron gran cantidad de cristales de calcita distribuidos ampliamente por la membrana; en su mayoría son cristales que se encuentran fusionados y presentan bordes rectos; también se observaron aglomeraciones de cristales. En menor cantidad se encontraron cristales aislados con bordes rectos y simétricos. El número promedio de cristales de calcita fue de 2.334 cristales/ mm². El tamaño de los cristales se midió en el eje mayor de cada uno, obteniendo un promedio de 10,49 μm.

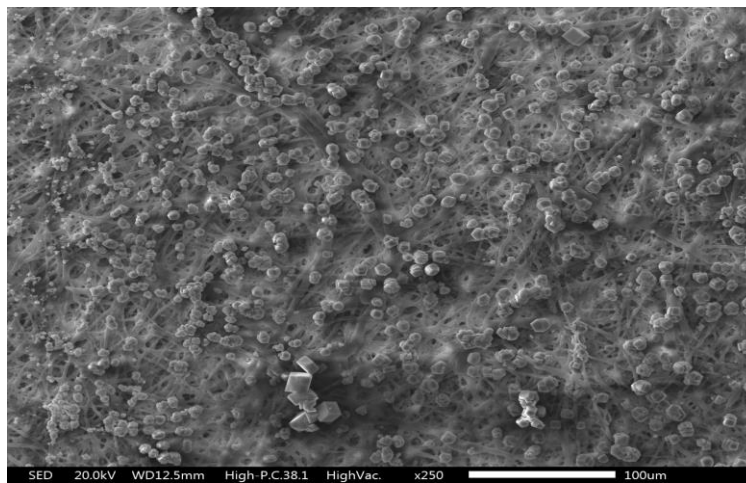


Figura 12. Imagen SEM de ESM policarboxilada con PGlu con gran cantidad de cristales de calcita distribuidos uniformemente.

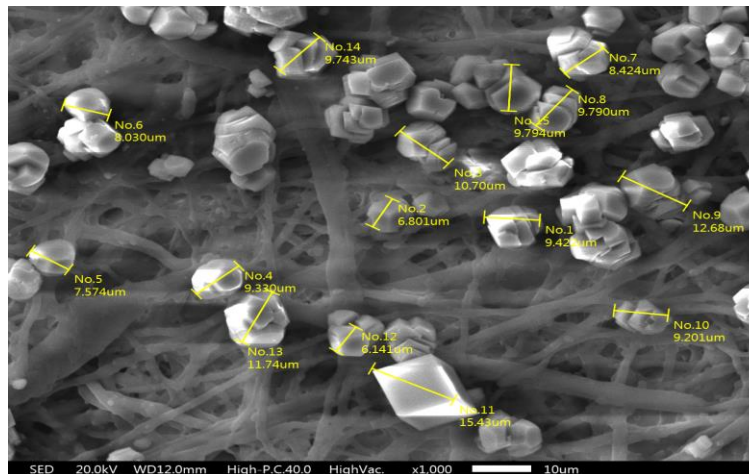


Figura 13. Imagen SEM de ESM policarboxilada con PGlu. Mediciones del eje mayor de cristales de calcita.

Fondo de Micropocillo ESM policarboxilada con PGlu:

Se analizó el fondo del micropocillo de ESM PGlu, en donde se pudo observar una menor cantidad de cristales de calcita en comparación con los cristales presentes en la ESM. La mayoría se encontró en forma aislada uno de otro, con bordes rectos y simétricos; en menor cantidad se encontraron cristales fusionados, con bordes rectos y forma irregular. El número promedio de cristales de calcita fue de 617 cristales/ mm². El tamaño de los cristales se midió en el eje mayor de cada uno, obteniendo un promedio de 14,03 μm.

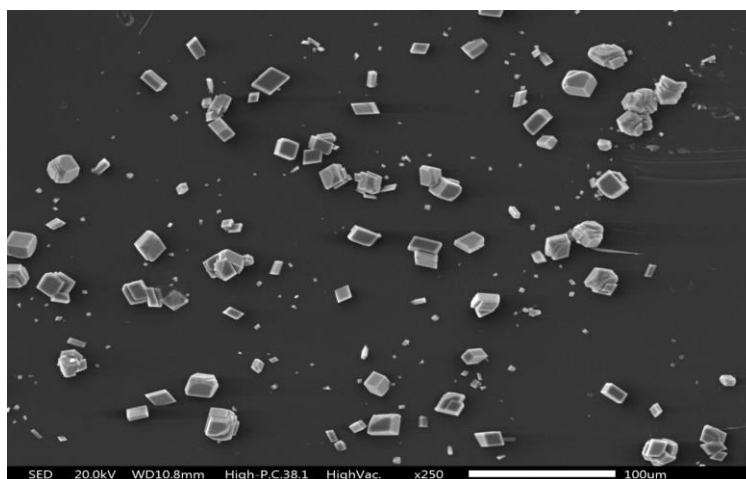


Figura 14. Imagen SEM del fondo de micropocillo de ESM PGlu con cristales de calcita aislados.

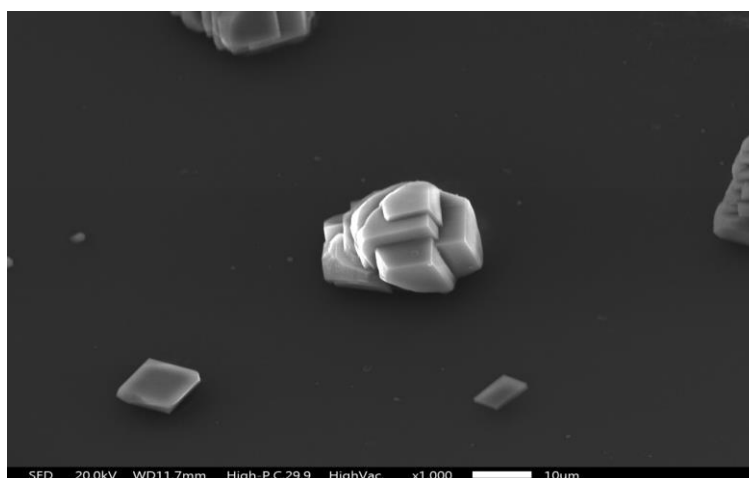


Figura 15. Imagen SEM del fondo de micropocillo de ESM PGlu, en donde se observan cristales fusionados y cristales aislados.

A continuación, se presentan los gráficos y el análisis de los resultados de número y tamaño de los cristales al comparar las ESM sin tratamiento y ESM PGlu; y los fondos de los micropocillo control, micropocillos ESM sin tratamiento y micropocillos ESM PGlu.

Gráficos ESM sin tratamiento y ESM PGlu

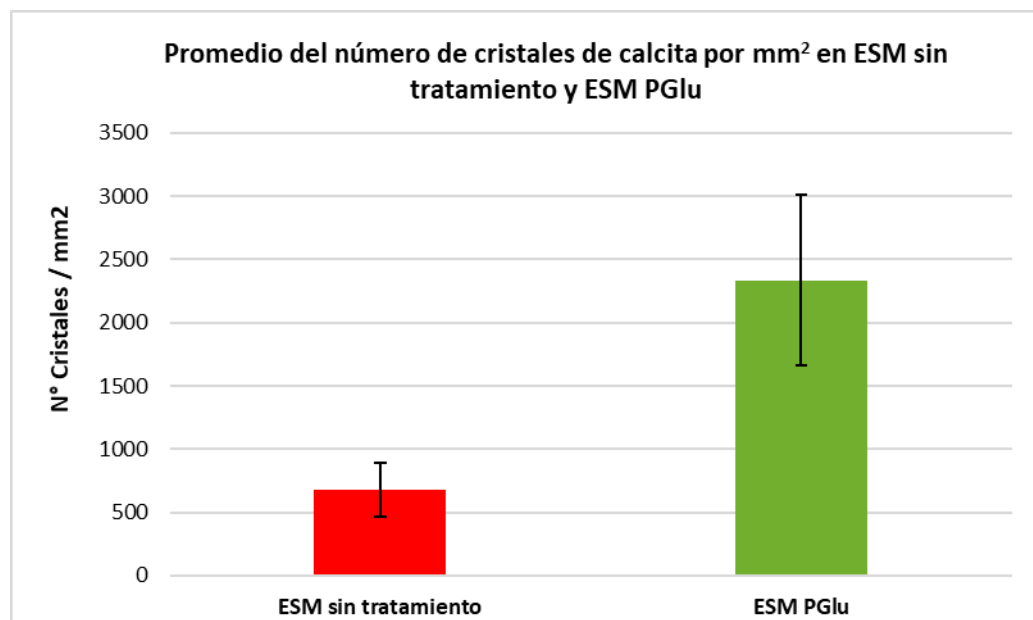


Gráfico 1. Número promedio de cristales de calcita por mm^2 obtenidos en ESM sin tratamiento y ESM PGlu. El gráfico muestra el promedio de cristales de calcita por mm^2 obtenidos en ESM sin tratamiento en color rojo y ESM PGlu en color verde; las desviaciones estándar del número promedio de cristales de calcita en ESM sin tratamiento y ESM PGlu son 212,71 y 676,07 respectivamente.

Los resultados se obtuvieron luego de dejar los micropocillos durante 24 horas expuestos a la solución de CaCl_2 . Se pudo apreciar que el número de cristales de calcita depositados en la membrana aumentó significativamente luego de que ésta fue policarboxilada con PGlu, obteniéndose un promedio de 674 cristales/ mm^2 ESM sin tratamiento; mientras que en ESM PGlu se obtuvo un promedio de 2.334 cristales/ mm^2 .

Tabla 1. Promedio de cristales/ mm^2 y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en ESM sin tratamiento y ESM PGlu.

	ESM sin tratamiento	ESM PGlu
Promedio cristales/mm^2	674	2.334
Desviación estándar	212,71	676,07

Con los datos obtenidos, se realizó la prueba de T de Student, obteniendo como resultado que el aumento de cristales presentes en ESM PGLu es atribuible al efecto de la funcionalización de la membrana.

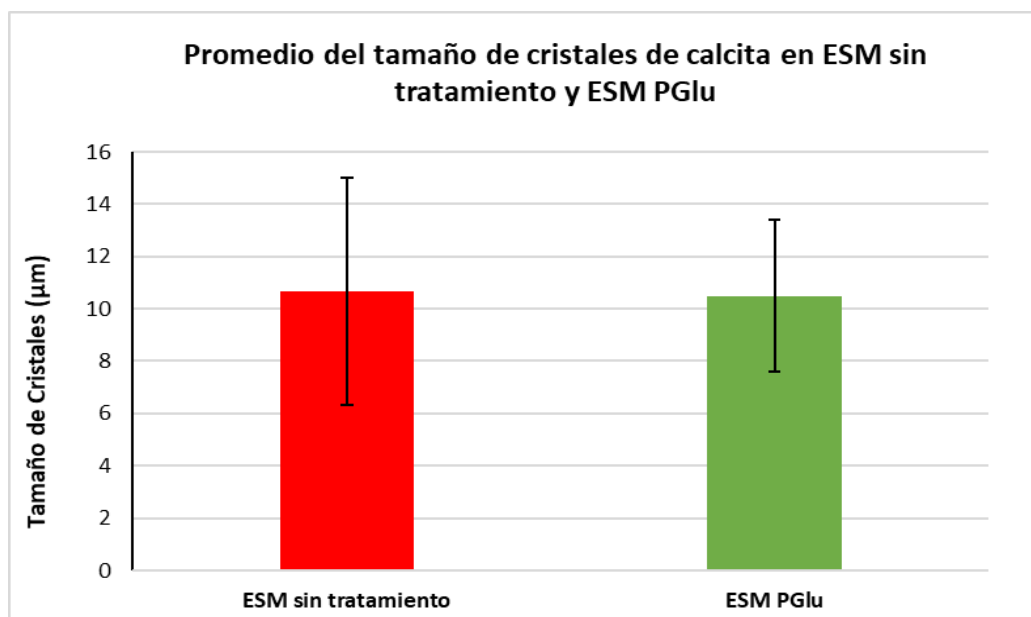


Gráfico 2. Tamaño promedio de cristales de calcita obtenidos en ESM sin tratamiento y ESM PGLu. El gráfico muestra el tamaño promedio de cristales de calcita obtenidos en ESM sin tratamiento en color rojo y ESM PGLu en color verde; las desviaciones estándar del tamaño promedio de cristales de calcita en ESM sin tratamiento y ESM PGLu son 4,32 y 2,90 respectivamente.

En los resultado obtenidos se puede apreciar que los tamaños promedio de cristales de calcita en ESM sin tratamiento y ESM PGLu son muy similares, siendo el tamaño promedio de cristales en ESM de 10,66 µm y en ESM PGLu de 10,49 µm. En ESM sin tratamiento se encontraron cristales de calcita con tamaños que iban desde los 5,078 µm hasta 24,63 µm. En ESM PGLu, los tamaños de los cristales fueron de 5,31 µm hasta 20,25 µm. Por lo tanto, no hay diferencias significativas en los tamaños de cristales de calcita en la ESM sin tratamiento y ESM PGLu.

Tabla 2. Promedio del tamaño de cristales y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en ESM sin tratamiento y ESM PGlu.

	ESM sin tratamiento	ESM PGlu
Tamaño promedio (μm)	10,66	10,49
Desviación estándar	4,32	2,90

A pesar de que los tamaños promedio de los cristales de calcita presentes en ambas membranas son similares y no existe una diferencia significativa, las desviaciones estándar obtenidas son distintas, esto porque se pudo evidenciar que en ESM sin tratamiento se encontraron cristales de calcita con tamaños mas amplios y cercanos a los valores extremos ya mencionados; mientras que en ESM PGlu, a pesar de encontrar valores extremos, los tamaños de los cristales en su mayoría son similares al tamaño promedio.

Gráficos micropocillo control, micropocillo ESM sin tratamiento y micropocillo ESM PGlu

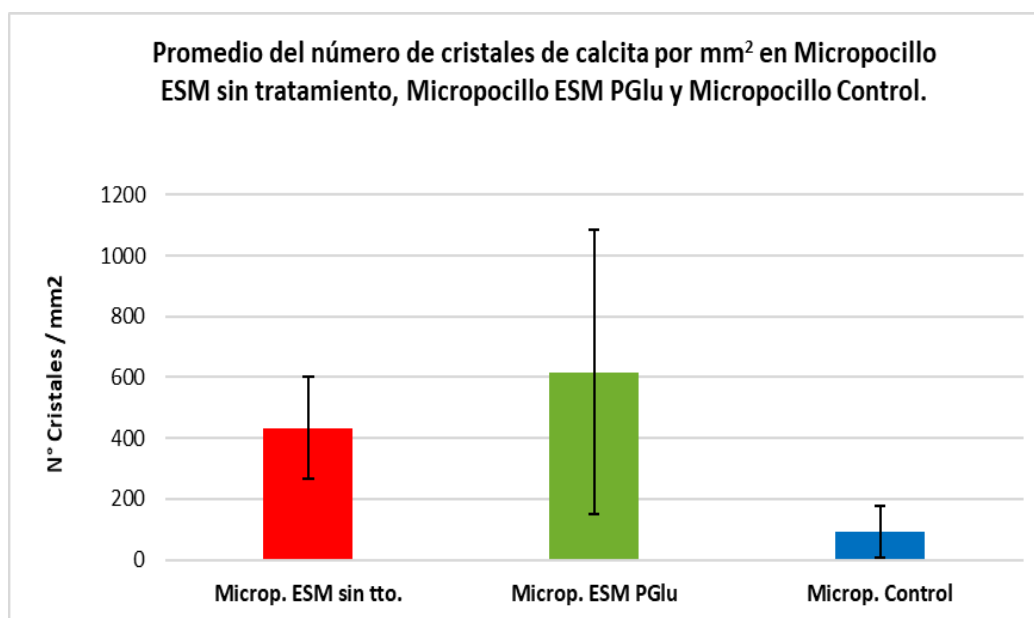


Gráfico 3. Número promedio de cristales de calcita por mm^2 en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control. El gráfico muestra el número promedio de cristales de calcita obtenidos en micropocillo ESM sin tratamiento en color rojo, micropocillo ESM PGlu en color verde y micropocillo control en color azul, cuyas desviaciones estándar son 168,68, 466,94 y 84,9 respectivamente.

Se comparó la cantidad de cristales presentes en el fondo de los micropocillos que tenían las membranas y el micropocillo control, observándose que la menor cantidad de cristales se obtuvo en este último micropocillo con un total de 94 cristales/mm²; y al igual que lo ocurrido con las membranas, en el fondo del micropocillo ESM PGlu fue en donde se encontró la mayor cantidad de cristales, 617 cristales/mm². En ESM sin tratamiento el total de cristales fue 434 cristales/mm².

Tabla 3. Promedio de cristales/ mm² y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control.

	Micropocillo ESM sin tratamiento	Micropocillo ESM PGlu	Micropocillo Control
Promedio cristales/mm²	434	617	94
Desviación estándar	168,68	466,94	84,9

A pesar de que existió una diferencia entre la cantidad de cristales presentes en micropocillo ESM sin tratamiento y micropocillo ESM PGlu, luego de analizar los datos se evidenció que no hay diferencias significativas entre la cantidad de cristales en los fondos de micropocillos con las membranas con y sin tratamiento. Sin embargo, si hay diferencias significativas entre las cantidades de cristales presentes en microp. ESM sin tratamiento, microp. ESM PGlu, ambas comparadas con el microp. Control.

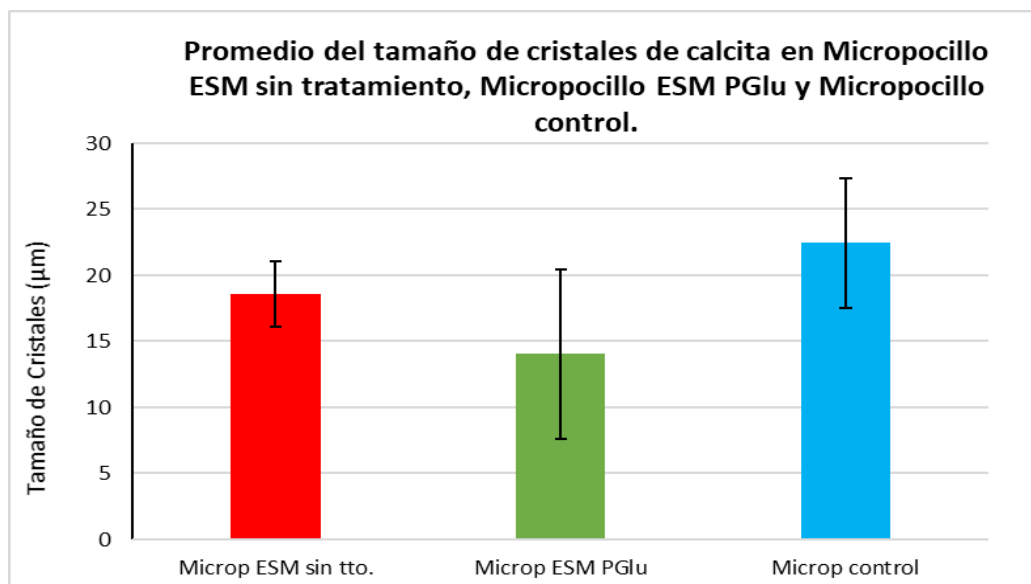


Gráfico 4. Tamaño promedio de cristales de calcita en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo control. El gráfico muestra el tamaño promedio de cristales de calcita en micropocillo ESM sin tratamiento en color rojo, micropocillo ESM PGlu en color verde y micropocillo control en color azul, cuyas desviaciones estándar son 2,48, 6,39 y 4,91 respectivamente.

Finalmente, se comparó el tamaño de los cristales de calcita en el fondo de los micropocillos. Se encontraron diferencias de tamaños de cristales de calcita significativas entre los tres micropocillos, teniendo que el mayor tamaño promedio de cristales fue el de el micropocillo control, cuyo tamaño promedio fue de 22,45 µm, y se encontraron cristales de calcita entre los 14,78 µm hasta 30,28 µm. Luego, en el micropocillo ESM sin tratamiento, el tamaño promedio fue de 18,57 µm, con cristales de calcita entre los 14,52 µm hasta 26,62 µm. Por último, en el micropocillo ESM PGlu el tamaño promedio fue de 14,03 µm, con cristales de calcita entre 3,41 µm hasta 31,09 µm; sin embargo, a pesar de que este micropocillo obtuvo el menor tamaño promedio, fue el micropocillo con mayor variabilidad de tamaños de cristales.

Tabla 4. Promedio del tamaño de cristales y desviación estándar de los cristales de calcita presentes en micropocillo ESM sin tratamiento, micropocillo ESM PGlu y micropocillo Control.

	Micropocillo ESM sin tratamiento	Micropocillo ESM PGlu	Micropocillo Control
Tamaño promedio (µm)	18,57	14,03	22,45
Desviación estándar	2,48	6,39	4,91

DISCUSIÓN

En el proceso de mineralización de la cáscara del huevo, los primeros cristales de CaCO_3 se depositan en la superficie de la membrana externa, en sitios de nucleación llamados mamilas (Arias *et al.*, 1993), las cuales están compuestas por un proteoglicano de queratán sulfato denominado mamilán, el cual está involucrado en la nucleación de los cristales, ya que tiene gran afinidad por el Ca^{2+} debido a las cargas negativas de los grupos sulfato. Luego, se produce el crecimiento de las columnas de los cristales de calcita (Fernández y Arias, 2000; Nys *et al.*, 2004). Este proceso se pudo evidenciar en la ESM sin tratamiento, en donde existió un crecimiento de los cristales CaCO_3 desde las mamilas de la ESM, los cuales fueron en su totalidad cristales de calcita distribuidos por la membrana en agrupaciones y en algunos casos se pudo ver el comienzo de la formación de columnas de cristales. Los cristales se encontraron en su mayoría fusionados entre sí y con formas redondeadas.

En la ESM policarboxilada con PGlu, se observó, al igual que en la ESM sin tratamiento, que la totalidad de cristales de CaCO_3 fue de calcita, por lo que no hubo una diferencia en el polimorfismo de los cristales luego del tratamiento. Con respecto a la morfología de los cristales observados, hubo una relación entre la funcionalización de la membrana y las características de los cristales, ya que, se vio que éstos presentaron bordes rectos y caras lisas, en su mayoría aglomerados, a diferencia de los cristales con bordes redondeados en la ESM sin tratamiento. Este cambio se condice con estudios que demuestran que la morfología de los cristales puede modificarse por aditivos específicamente seleccionados (Addadi y Weiner, 1985; Arias y Fernández, 2008).

Se observó, además, que el depósito de estos cristales se distribuyó ampliamente por la ESM y no solo en los sitios de nucleación, como se vio en la ESM sin tratamiento. Esto ya que durante la funcionalización se multiplicaron los grupos carboxilos presentes en toda la ESM, debido a la adición del PGlu a los grupos carboxilos libres de los residuos de aminoácidos Asp y Glu presentes en las proteínas que la conforman, permitiendo aumentar, de este modo, la carga negativa de la membrana. Existen evidencias que estos grupos carboxilos ionizados son los principales responsables del ligamiento a los iones de Ca^{2+} .

modificando el proceso de cristalización del CaCO_3 (Arias y Fernández, 1989; Ren *et al.*, 2011).

El depósito de cristales por toda la ESM policarboxilada con PGlu, tuvo además como consecuencia un significativo aumento en el número de cristales, siendo aproximadamente tres veces mayor la cantidad de cristales/ mm^2 en comparación a los presentes en la ESM sin tratamiento. Esto también se explica por la adición del PGlu a la ESM, ya que al tener más grupos carboxilos disponibles, se encontraron más sitios de nucleación para los cristales de calcita. Así mismo, en el fondo del micropocillo que contuvo la ESM policarboxilada con PGlu, se encontró una mayor cantidad de cristales que en ESM sin tratamiento.

Al analizar los tamaños de los cristales de calcita, si bien no se encontró diferencias significativas entre los tamaños promedio de los cristales en ESM policarboxilada con PGlu y ESM sin tratamiento, siendo 10,49 μm y 10,66 μm respectivamente, los cristales de la ESM policarboxilada fueron más homogéneos en cuanto a su tamaño, teniendo la mayoría un tamaño cercano al promedio; los cristales de la ESM sin tratamiento fueron cristales cuyo tamaño fue muy variable. Por otro lado, al observar los fondos de los micropocillos, se evidenció que a pesar de que en el fondo de micropocillo de ESM policarboxilada el tamaño promedio de los cristales fue menor que en el micropocillo control y micropocillo ESM sin tratamiento, se encontraron cristales muy grandes, algunos con tamaños de 31,09 μm , concluyéndose que estos cristales se formaron desde la membrana y luego al crecer se desprendieron por su gran tamaño cayendo al fondo del micropocillo.

Todo lo anteriormente descrito demuestra la influencia de los aditivos en la cristalización, ya que, efectivamente la adición del PGlu a la ESM tuvo un efecto sobre la morfología, número, tamaño de los cristales de CaCO_3 .

CONCLUSIÓN

La cáscara de huevo ha sido ampliamente utilizada para estudios de biomineralización *in vitro* ya que posee características distintivas; en este estudio la membrana de la cáscara resultó ser un excelente soporte para la mineralización de CaCO_3 . Se utilizó el método de difusión de gases, el cuál fue un método sencillo y rápido que permitió generar gran cantidad de cristales, para posteriormente, poder analizar el efecto de la ESM policarboxilada con PGlu sobre la cristalización de CaCO_3 .

En relación a los métodos utilizados en este estudio, primero se utilizó la técnica espectroscópica FTIR, mediante el cual se pudo apreciar un pico diferencial de transmitancia a 1441 cm^{-1} al desbloquear los grupos carboxilos, correspondiente a grupos carboxilos simétricos ionizados en la ESM con PGlu, el cual no se encontró en la ESM sola y en ESM PGlu- CH_3 , lo cual nos permitió demostrar que efectivamente el PGlu se acopló a la ESM. Posteriormente, el análisis de los cristales se realizó mediante SEM, el cual fue un buen método conocer la morfología de los cristales de CaCO_3 . Además, mediante herramientas propias del SEM se pudo medir el eje mayor de los cristales para posteriormente calcular el tamaño promedio y además permitió contar el número de cristales presentes en la ESM.

El gran número de cristales, las diferencias en la morfología y los tamaños de los cristales de calcita presentes en la ESM policarboxilada con PGlu en comparación con la ESM sin tratamiento, mostraron el efecto que tienen los aditivos, en este caso PGlu, en la cristalización de CaCO_3 . Si bien existen estudios sobre el efecto que tienen distintos tipos de aditivos en la mineralización del CaCO_3 , faltan estudios que determinen el efecto de estos aditivos en el número y tamaño de cristales, ya que la mayoría se centra en los cambios en la morfología y polimorfismo del CaCO_3 .

Finalmente, los resultados obtenidos durante este estudio demostraron la influencia que tiene la ESM policarboxilada con PGlu en el proceso de mineralización *in vitro*. Considerando que entre los aminoácidos presentes en las proteínas de la ESM se encuentra Glu, se hace interesante pensar en nuevos estudios, considerando distintas variables, para analizar el efecto que tiene sobre la cristalización del CaCO_3 .

BIBLIOGRAFÍA

ADDADI, L.; WEINER, S. 1985. Interactions between acidic proteins and crystals: stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82 (12): 4110-4114.

ALBERT, R.; DANKLMAIER, J.; HONIG, H.; KANDOLF, H. 1987. A simple and convenient synthesis of β -aspartates and γ -glutamates. *Synthesis* 1987 (7): 635-637.

AL-RAWAJFEH, A. 2008. Simultaneous desorption–crystallization of CO_2 – CaCO_3 in multi stage flash (MSF) distillers. *Chem Eng and Process.* 47 (12): 2262–2269.

ARIAS, J. L.; FERNÁNDEZ, M. S. 1989. La cáscara del huevo: un compartimiento acelular compuesto de matriz extracelular mineralizada. *Monog. Med. Vet.* 11(2): 43-49.

ARIAS, J.L.; FERNANDEZ, M.S. 2008. Polysaccharides and proteoglycans in calcium carbonate-based biomineralization. *Chem. Rev.* 108(11):4475-4482.

ARIAS, J. L.; FINK, D. J.; XIAO, S. Q.; HEUER, A. H.; CAPLAN, A. I. 1993. Biomineralization and eggshell: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Inter. Rev. Cytol.* 145: 217-250.

ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; FERNÁNDEZ, M. 2007a. Chapter 6. Avian eggshell as a template for biomimetic synthesis of new materials. **In:** Bäuerlein, E.; Behrens, P. *Handbook of biomineralization: Biological aspects and structure formation.* Wiley-VCH. Alemania. pp. 109-117.

ARIAS, J. L.; MANN, K.; NYS, Y.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, M. 2007b. Chapter 18. Eggshell growth and matrix macromolecules. **In:** Bäuerlein, E.; Behrens, P. *Handbook of biomineralization: Biological aspects and structure formation.* Wiley-VCH. Alemania. pp. 309- 328.

BRITTON, W.; HALE, K. 1976. Amino acid analysis of shell membranes of eggs from young and old hens varying in shell quality. *Poult. Sci. J.* 56: 865- 871.

- CHEN, T.; SHI, P.; LI, Y.; ZHANG, J.; DUAN, T.; YU, Y.; ZHOU, J.; ZHU, W.** 2018. Crystallization of calcium carbonate mineral with hierarchical structures regulated by silk fibroin in microbial mineralization system. *J. Cryst. Growth.* 493: 51-57.
- COREY, E. J.; SZÉKELY, I.; SHINER, C. S.** 1977. Synthesis of 6, 9 α – oxido – 11 α , 15 α - dihydroxyprosta-(e)5, (e)13-dienoic acid, an isomer of PGI₂ (Vane's PGx). *Tetrahedron Lett.* 40: 3529 – 3532.
- ENRIONE, J.; DÍAZ-CALDERÓN, P.; WEINSTEIN-OPPENHEIMER, C. R.; SÁNCHEZ, E.; FUENTES, M.; BROWN, D. I.; HERRERA, H.; ACEVEDO, C. A.** 2013. Designing a gelatin/chitosan/hyaluronic acid biopolymer using a thermophysical approach for use in tissue Engineering. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36:1947–1956.
- ESTROFF, L.** 2008. Introduction: Biomineralization. *Chem. Rev.*108 (11): 4329-4331
- FERNÁNDEZ, M. S.; ARIAS, J. L.** 2000. La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. *Monograf. Med. Vet. (Chile)* 20:50-60.
- GRABAREK, Z.; GERGELY, J.** 1990. Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Biochem.* 185(1):131-135.
- KUMARAN, P.; LAKSHMINARAYANAN, R.; VALIYAVEETTI, S.** 2003. Controlled deposition of thin films of calcium carbonate on natural and synthetic templates. *Cryst. Growth Des.* 4 (2): 331- 335.
- LOWENSTAM, H.; WEINER, S.** 1989. *On biomineralization.* Oxford Univ. Press, N.Y. pp 324.
- MANN, S.** 2001. *Biomineralization.* Oxford Univ. Press. Oxford. pp 198.
- NYS, Y.; GAUTRON, J.; GARCÍA-RUIZ, J. M.; HINCKE, M.** 2004. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *CR Palevol.* 3 (6-7): 549-562.
- PARK, S.; SONN, K.; LEE, D.; KIM, D.; TAEK, K.; LEE, K.; SEONWOO, H.; KIM, J.** 2016. Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosyst. Eng.* 151: 446-463.

- REN, D.; FENG, Q.; BOURRAT, X.** 2011. Effects of additives and templates on calcium carbonate mineralization *in vitro*. *Micron*. 42 (3): 228-245.
- SARATHI, P.; DASH, S.** 2014. Sorption on eggshell waste—A review on ultrastructure, biomineralization and other applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 209: 49-67.
- STAJNER, L.; KONTREC, J.; NJEGIC, B.; MALTAR- STRMECKI, N.; PLODINEC, M.; LYONS, D.; KRALJ, D.** 2018. The effect of different amino acids on spontaneous precipitation of calcium carbonate polymorphs. *J. Cryst. Growth*. 486: 71-81.
- WADA, N.; HORIUCHI, N.; NAKAMURA, M.; NOZAKI, K.; HIVAMA, T.; NAGAI, A.; YAMASHITA, K.** 2014. Cooperative effects of polarization and polyaspartic acid on formation of calcium carbonate films with a multiple phase structure on oriented calcite substrates. *J. Cryst. Growth*. 402: 179-186.
- WEINER, S.; DOVE, P.** 2003. An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect. *Rev. Mineral. Geochem.* 54 (1): 1-29.
- ZHENG, L.; HU, Y.; MA, Y.; ZHOU, Y.; NIE, F.; LIU, X.; PEI, C.** 2012. Egg-white-mediated crystallization of calcium carbonate. *J. Cryst. Growth*. 361: 217-224.