



ugr

Universidad
de Granada



Laboratorio de Estudios Cristalográficos
Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra
C.S.I.C.-Universidad de Granada

Estudios de precipitación de CaCO_3 como herramienta para entender los procesos de biomineralización, usando como modelo biológico la cáscara de huevo de gallina.

Ma. de los Ángeles Hernández Y Hernández

TESIS DOCTORAL
Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María de los Ángeles Hernández Hernández
D.L.: GR. 2084-2009
ISBN: 978-84-692-2729-9

Ma. Ángeles Hernández Y Hernández
hernanh@ugr.es

LEC-I ACT-CSIC-UGR
Edificio P. B. López-Neyra. P.T. Ciencias de la Salud.
18100 Armilla (Granada-España).



ugr | Universidad
de Granada



Laboratorio de Estudios Cristalográficos
Instituto Andaluz de Ciencias de la Tierra
C.S.I.C.-Universidad de Granada

Estudios de precipitación de CaCO_3 como herramienta para entender los procesos de biomineralización, usando como modelo biológico la cáscara de huevo de gallina.

Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. Ma. de los Ángeles Hernández Y Hernández para optar al Grado de Doctor en el programa de Biotecnología, realizada en el Laboratorio de Estudios Cristalográficos. Esta Tesis Doctoral ha sido dirigida por el Dr. Juan Manuel García Ruiz, Jefe del Laboratorio de Estudios Cristalográficos y Profesor de Investigación del C.S.I.C. con la codirección del Dr. Alejandro Rodríguez Navarro, profesor del Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada.

En Granada, a 15 de mayo del 2009

Vº.Bº. del Director

Vº.Bº. del Director

Doctorando

Fdo.
Juan Manuel García Ruiz

Fdo.
Alejandro Rodríguez Navarro

Fdo.
Ma. de los Ángeles
Hernández Y Hernández

*Para Luis,
Alejandra,
Mis Padres,
y
Hermanos.*

Agradecimientos

Quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a toda la gente que de alguna manera me ha apoyado durante el desarrollo de mi tesis, ***Mil Gracias a Todos!!***

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Juan Manuel por la oportunidad que me ha brindado de introducirme al maravilloso mundo de la ciencia y por ser un gran ejemplo de tenacidad, pasión y entrega a todas las cosas que hace por el saber. Por su calidad humana, y por su ayuda ¡Gracias JuanMa!

Agradezco también a Alejandro por la ayuda inestimable en el desarrollo y la escritura de esta tesis; por las muchas horas compartidas de trabajo, su paciencia, dedicación y por dar prioridad a la revisión de este manuscrito, acelerando y haciendo más fluido su desarrollo, pero sobre todo un especial agradecimiento por hacer que nunca decayera mi ánimo.

Debo un especial agradecimiento a Jaime Gómez, primeramente por confiar en mí y ayudarme en el análisis de datos, por aportar sus conocimientos y ayuda en la escritura para la publicación de algunos trabajos producto del desarrollo de esta tesis y por su tiempo dedicado a la revisión de este manuscrito.

I'll never forget a very special person, Yves Nys, who (at the 2006 International School on Biological Crystallization), after a "break" from the science, he got me up and filled me with encouragement to take up again and finish my thesis work. Thank you, Yves and Ana Marie! I still have such grateful memories of my short stays at INRA.

También quiero agradecer a Ana Cámara por su gran disposición, ayuda (sacando tiempo de donde no lo había) y valiosos comentarios; por la revisión de una parte muy importante y poco trivial, "las proteínas", en este trabajo de tesis.

No puedo dejar de agradecer a Antonio Checa, por sus valiosos comentarios acerca de este apasionante tema y su motivación para llevar a término este trabajo de tesis y sobre todo por su amistad, también Antonio Sánchez por emocionarme con sus comentarios científicos sobre la biomineralización.



Thank you very much to Russ Messier and Gen Sazaki for our professional relationship and especially for the friendship that your stay in Granada brought us!

Debo un agradecimiento a todo el personal del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, con los que un día conté; y especialmente a Alicia, Conchi, Juan de Dios y Pepe por su buena disposición y trabajo y por hacerme muy agradables los momentos en cada sesión.

Estoy segura que hay personas que de alguna manera han colaborado conmigo y me las dejo en el tintero. Para los no nombrados, ¡Gracias!

A todos mis compañeros del LEC, Eva encabezando esta lista, incluidos los que un día formaron parte del equipo y que tuve la oportunidad de conocer y a los chicos de la factoría, por su amistad y ayuda ¡Gracias!

A las chicas de Triana encabezando la lista Martha, Luisa, por los momentos agradables y de relax a la hora del café (momento importante para todo buen español), a Loli y a Pascual.

No puedo dejar de mencionar mi especial gratitud a mi familia española, quienes en los momentos buenos y malos siempre han estado conmigo dándome la mano y han sabido alentarme con ese cariño: July y Pepe, Enrique y Paqui, James (cada día mas español) y Lore, Conchi, Giles y Loida, Alejandra y la familia incluida de todos ellos (de la cual me siento un integrante mas), sin duda vuestra compañía es una de mis mejores posesiones.

A toda mi familia en México: en especial a los que más han y siguen padeciendo nuestra ausencia, Abraham, Ángeles, Francis, Juani, José, Dña. Irma, Irma, Víctor, Abraham, Ciri y Reina, también a mis tíos Enrique, Alejandro, Andrea, Carmelita, Mauris, Jorge, Pati y Rebe, María, Queña y a todos mis sobrinos por su gran cariño y comprensión. Incluyo en este grupo a todos mis amigos de allá y de forma especial a Alejandro y Maylet, Toñi y Abel, Lulú, Margaritas, Carmen Oliver porque a pesar de la distancia el lazo que nos une permanece intactoa toda esa lista interminable, ¡gracias.... y les quiero a todos!

¡Y por supuesto!, a Luis y Alejandra porque sin su apoyo y comprensión no hubiera sido capaz de llevar a termino este proyecto.



AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. MECANISMOS DE FORMACIÓN Y CRECIMIENTO DE CRISTALES	7
1.2. BIOMINERALIZACIÓN	22
1.3. PROTEÍNAS	27
1.4. CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA COMO MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDIO	34
1.4.1 Biología del sistema reproductor de la gallina	34
1.4.2 Proceso de formación de la cáscara de huevo	38
1.4.3 Descripción de la parte mineral de la cáscara de huevo	40
1.4.4 Descripción de los componentes macromoleculares de la cáscara de huevo	44
1.5. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE LA TESIS	47
BIBLIOGRAFÍA	51

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. REACTIVOS QUÍMICOS	61
2.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS	62
2.2.1. Proteínas comerciales	62
2.2.1.1. Preparación de las soluciones de proteínas	68
2.2.2. Proteínas de origen animal	69
A) Extractos de la matriz orgánica de la cáscara de huevo	69
B) Fluido uterino	73
2.3. MÉTODOS DE CRISTALIZACIÓN	74
2.3.1. Técnica de cristalización por difusión de vapor	76
A) Gota sedente	76
B) Gota colgante	76
2.3.1.1. Descripción del sistema de cristalización la: “ <i>Seta de Cristalización</i> ”	79
2.4. TÉCNICAS DE SEGUIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN	83
2.4.1 Evolución del pH del sistema	83
2.4.2 Microscopía óptica	83

2.4.3. Microscopía electrónica de barrido (FESEM)	84
2.4.2.1. Tratamiento de las muestras	84
2.4.3. Difracción de rayos X de polvo	85
BIBLIOGRAFÍA	87

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Lista de manuscritos	97
3.1 MANUSCRITO 1. Resumen	98
Studies on Nucleation and Polymorphism of Calcium Carbonate by Sitting Drop Crystallization: the use of a Crystallization Mushroom	103
3.2. MANUSCRITO 2. Resumen	124
Influence of Model Globular Proteins with Different Isoelectric Points on the Precipitation of Calcium Carbonate	127
3.3. MANUSCRITO 3. Resumen	137
Influence of Eggshell Matrix Proteins on the Precipitation of Calcium Carbonate (CaCO ₃)	141
3.4. MANUSCRITO 4. Resumen	147
Identification of Some Active Proteins on the Process of Hen Eggshell Formation	151

CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones	163
Perspectivas	167

Capítulo 1

*Cuando ella llegó al País de las Maravillas, el Rey le preguntó:
- Alicia, ¿Qué sabes sobre este asunto?
- Nada su majestad – ella contestó.
- ¿Nada en absoluto? – insistió el Rey
- Nada en absoluto – contestó Alicia.
- “No saber nada en absoluto es muy importante”, - afirmó el Rey.*

Lewis Carroll



1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo, se introducen una serie de conceptos básicos sobre los mecanismos de formación de cristales en ambientes inorgánicos y biológicos, que son de gran importancia durante el desarrollo de esta tesis y que serán de especial utilidad para aquellos lectores que no estén familiarizados con este tipo de procesos. Además, se definen los objetivos de esta tesis.

1.1 MECANISMOS DE FORMACIÓN Y CRECIMIENTO CRISTALINO

La formación de cristales se lleva a cabo en dos etapas principales: la nucleación y el crecimiento cristalino. En la primera etapa tiene lugar la aparición de los gérmenes que pueden servir de semilla para la formación del futuro cristal. En la segunda etapa, una vez que se ha formado un núcleo estable, éste comienza a crecer por la incorporación de unidades de crecimiento adquiriendo un tamaño observable.

Para que tenga efecto el proceso de cristalización se requiere de cierta sobresaturación en la disolución y ésta es posible alcanzarla mediante diferentes mecanismos como por ejemplo: a través de la evaporación del disolvente, variando la temperatura, el pH o por adición de un disolvente en el que el soluto sea menos soluble o bien por reacción química.

Fuerza motriz de la cristalización

Desde el punto de vista termodinámico la cristalización es un fenómeno en el que se genera un cambio de fase por el que un sistema en estado de desequilibrio o relativamente

desordenado (como la disolución), pasa a un estado en equilibrio o estado ordenado (el cristal), (Buckley, 1951).

Los cristales se pueden formar a partir de disoluciones, fundidos y vapores. Al hablar de cristalización no nos referimos sólo a la obtención de cristales en masa, de capas delgadas o monocristales de compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, sino que también hacemos referencia a la biomineralización, ya que en todos estos casos son válidos los mismos principios y procesos, es decir la nucleación, crecimiento cristalino etc., aunque en este último caso, estos procesos están exquisitamente modulados por el organismo vivo en cuestión.

En muchos sistemas la nucleación no empieza en el momento en el que es posible desde el punto de vista termodinámico (alcanzada la sobresaturación), sino una vez superado un cierto valor de sobresaturación.

La concentración de saturación en un proceso de precipitación se alcanza cuando el producto iónico de los iones en disolución es igual al producto de solubilidad para una determinada fase cristalina. La sobresaturación se define como:

$$\beta = \text{IAP} / K_{\text{sp}}$$

Siendo:

IAP = Producto de Actividad de los Iones implicados
(del inglés Ionic Activity Product)

K_{sp} = producto de solubilidad, o producto de actividad de los iones de interés en condiciones de equilibrio termodinámico.

Si la sobresaturación de una disolución con respecto a una fase es uno ($\beta = 1$) se dice que la disolución está saturada con respecto a esa fase y que ésta se encuentra en equilibrio termodinámico con la fase sólida.

Si el producto iónico es mayor que el producto de solubilidad ($\beta > I$) se dice que la disolución está sobresaturada. Una disolución sobresaturada será estable durante un periodo de tiempo limitado (desde milisegundos hasta años). Cuanto mayor sea la sobresaturación menor será el tiempo de estabilidad aparente y la formación o precipitación de la fase sólida será posible.

Por el contrario, si el producto iónico es menor al producto de solubilidad ($\beta < I$) no será posible la precipitación y habrá disolución del precipitado.

Las sustancias, en función de cómo varía la solubilidad con la temperatura se clasifican en sustancias con solubilidad directa, inversa o constante. En muchos casos, a medida que disminuye la presión y/o temperatura, disminuye la solubilidad de una sustancia y la disolución se sobresatura y puede ocurrir la precipitación. Sin embargo, hay otros factores fisicoquímicos (p.ej., pH) que influyen en la solubilidad de una determinada sustancia y por tanto en su cristalización. No obstante, es posible preparar disoluciones que contengan más sólido disuelto del que corresponde a su saturación sin que ocurra la precipitación. Se dice entonces que la disolución está en un estado metaestable (Mullin y Söhnel 1977).

La formación de cristales tiene lugar a través de dos etapas bien diferenciadas: la nucleación y el crecimiento cristalino.

Nucleación

Se entiende por nucleación, el proceso por el que una fase sólida ordenada se segrega a partir de un fundido, vapor o de una disolución multicomponente. El cambio de fase tiene lugar mediante la formación y posterior crecimiento de “clusters” de la nueva fase en el sistema. Los “clusters” son cuerpos sólidos diminutos, embriones, núcleos o semillas que actúan como centros de cristalización. La formación de la nueva fase viene condicionada por la aparición de núcleos de la nueva fase en el sistema, es decir, por la nucleación. La nucleación es la formación de agrupaciones de átomos, iones o moléculas constituyentes de la nueva fase en pequeñas zonas separadas en el volumen de la antigua

fase. Estas agrupaciones formadas por iones o moléculas se conocen como “clusters”. Algunas de estas agrupaciones alcanzan una dimensión crítica, e inevitablemente aumentan su volumen en el sistema sobresaturado, logrando con el tiempo una dimensión macroscópica. Los “clusters” que no sobrepasan la dimensión crítica se disuelven. La velocidad del cambio de fase depende del número de gérmenes capaces de crecer que se forman por unidad de volumen del sistema en el que ocurre la nucleación y por unidad de tiempo. A esta magnitud se le conoce como velocidad de nucleación.

Dependiendo de los mecanismos que dan lugar a este proceso, se diferencia en: a) nucleación primaria: homogénea y heterogénea y b) nucleación secundaria

a) Nucleación primaria: homogénea y heterogénea.

En la nucleación primaria el sistema se encuentra o bien libre de partículas de la fase sólida o bien se trata de una disolución que contiene partículas extrañas a la fase sólida en formación. Así, dependiendo de si estas partículas extrañas influyen o no en la nucleación, se distinguen dos mecanismos de nucleación primaria: heterogénea y homogénea respectivamente.

Durante la nucleación homogénea la nueva fase no se origina por la presencia de otra fase sólida en el sistema en el que transcurre la nucleación, sino que los núcleos de la nueva fase aparecen tras la creación de agregados en el seno de la disolución homogénea, sin entrar en contacto con las paredes del cristizador u otras superficies. Este mecanismo es el menos frecuente y requiere los mayores valores de sobresaturación de la disolución (Figura 1.1.1). En este caso, el sistema no contiene partículas de la nueva fase sólida que se forma aunque no queda completamente descartada su presencia, pero éstas no deben sobretodo influir en el origen de las nuevas partículas.

Se entiende por nucleación heterogénea aquella en la que la nucleación se desarrolla sobre un soporte, substrato o superficies previamente formadas tales como semillas de cristales, partículas procedentes de contaminación, paredes del recipiente u otras superficies incorporadas al sistema. Estos agentes extraños inducen la nucleación debido

a que la barrera energética que se requiere es menor que para la nucleación homogénea, es decir, requiere valores de sobresaturación menores que en el caso anterior.

b) Nucleación secundaria

Se dice que la nucleación es secundaria cuando la formación de los cristales de la nueva fase esta condicionada por la presencia de cristales de la misma fase.

La nucleación secundaria aparente puede producirse por varios mecanismos: a) durante la siembra de cristales en una disolución sobresaturada donde, en general, el número de cristales formados es mayor que el número de cristales introducidos debido al uso de cristales con partículas microscópicas de la fase sólida en su superficie; b) otro mecanismo es producido por la inestabilidad de agregados cristalinos originados durante la cristalización a alta sobresaturación y que por acción de fuerzas hidrodinámicas son disgregados aumentando así el número de los cristales; c) otro mecanismo de este tipo de nucleación es el debido a la acción mecánica de un mezclado intenso de la disolución donde se genera desprendimiento de fragmentos de las aristas o esquinas de los cristales mas grandes, estos fragmentos sirven como núcleos de nuevos cristales.

La nucleación secundaria verdadera es debida a la interacción de los cristales con la disolución. Los nuevos gérmenes pueden originarse o bien en la superficie del cristal en crecimiento, en la capa límite de líquido contiguo al cristal, o bien en el volumen de la disolución sobresaturada que se encuentra en las cercanías del cristal.

En la nucleación secundaria de contacto, los núcleos se forman por la interacción de los cristales con otra superficie sólida, bien sea por la acción de una fuerza mecánica, ya sea por contacto de un objeto sólido con la superficie del cristal o en una disolución agitada, por choques mutuos entre cristales, o entre los cristales y el mezclador o con la pared del recipiente.

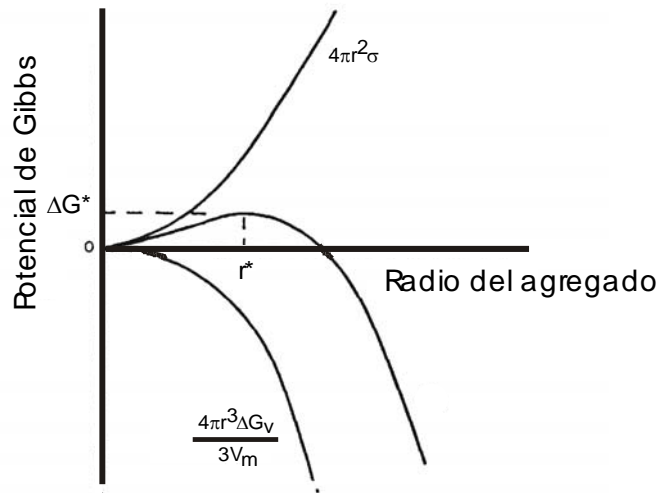


Fig. 1.1.1. Energía libre de formación de un agregado, en función de su radio.

En general, para que cristalice una nueva fase a partir de una disolución no es suficiente con que ésta esté sobresaturada. Antes de que se desarrollen los cristales de la nueva fase debe transcurrir un tiempo hasta que se formen en disolución un cierto número de núcleos o semillas, de tamaño suficiente (núcleo crítico), que actúen como núcleos de cristalización. Las fuerzas que actúan sobre estos agregados son de dos tipos: a) Atractivas, las cuales resultan de la interacción entre las partículas que forman el agregado. Tienden a mantenerlo unido y son proporcionales al número de enlaces compartidos y, por tanto, a su volumen; b) Repulsivas, son el resultado de la interacción del agregado con el solvente. Tienden a disolverlo y son proporcionales al número de enlaces libres y, en consecuencia, a la superficie del agregado. Para que el agregado sea estable, las fuerzas atractivas deben predominar sobre las repulsivas. El tamaño crítico de estabilidad del agregado ocurrirá cuando ambas fuerzas sean iguales.

La diferencia de energía libre de Gibbs (ΔG) nos define si un proceso es energéticamente favorable o no. En el caso de una agrupación de n átomos de la nueva fase viene dada por la expresión:

$$\Delta G = -\frac{4\pi r^3}{3v} kT \ln S + 4\pi r^2 \gamma$$

Siendo:

r = radio del agregado

v = volumen molecular,

k = constante de Boltzman

γ = energía libre de superficie

S = sobresaturación

Tomando r como variable continua, la expresión anterior presenta un máximo para el valor de

$$r^* = \frac{2V\gamma}{kT \ln S} \text{ (Ecuación de Gibbs-Thomson)}$$

Así, el radio necesario para que un agregado sea estable (r^*) viene determinado por la sobresaturación del sistema. A medida que aumenta la sobresaturación de una disolución respecto a una fase, disminuye el radio crítico necesario para que los agregados sean estables y se facilita, por tanto, la nucleación. Es por ello que a altas sobresaturaciones se forman muchos cristales pero de tamaño muy pequeño. En general, el flujo de nucleación es muy sensible al valor de sobresaturación siendo prácticamente cero en los casos de muy baja sobresaturación. En estas condiciones, los cristales formados tenderán a crecer, pero no se producirán nuevas nucleaciones. Para un mejor control de la nucleación además de regular la sobresaturación en el sistema, se utilizan sustancias específicas que tienen la capacidad de inhibir o promover la cristalización de una determinada fase.

Se ha observado que entre el establecimiento de la sobresaturación y la formación de la nueva fase, la cristalización, existe un periodo de incubación donde la nucleación no puede medirse, es decir, una región metaestable de sobresaturación. Este periodo de incubación puede ser sensiblemente alterado cuando se producen pequeños cambios en la composición del sistema. Este tiempo, durante el cual la disolución sobresaturada homogénea pasa a ser un sistema heterogéneo se cita en la bibliografía como periodo de inducción, tiempo de espera o periodo de incubación. El periodo de inducción de la

cristalización puede oscilar entre milisegundos y años, según el tipo del sistema y las condiciones existentes principalmente de temperatura y de sobresaturación. En general, se puede describir el comportamiento de una determinada sustancia con respecto a la cristalización mediante un diagrama de solubilidad (Figura 1.1.2) que puede dividirse en cuatro zonas:

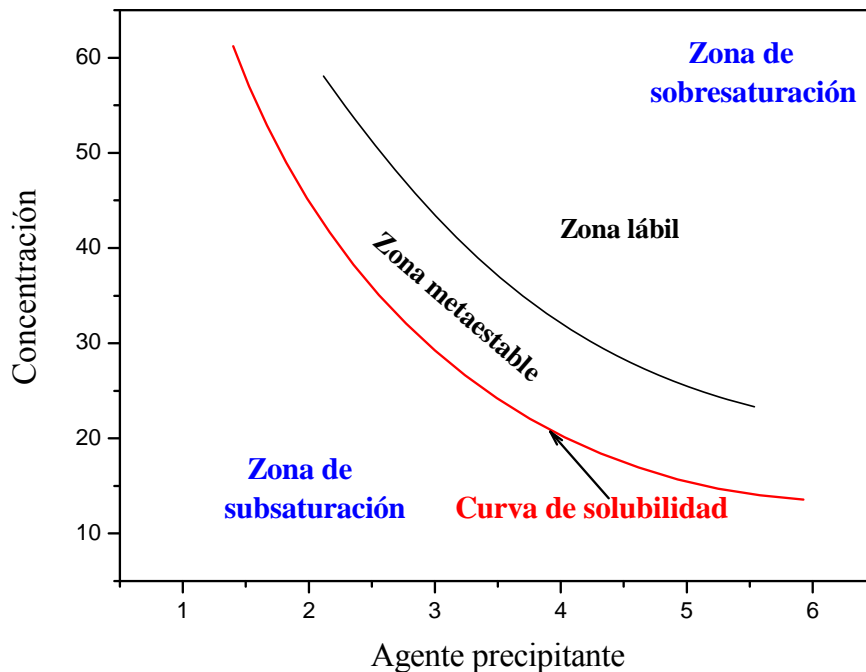


Fig. 1.1.2. Curva de solubilidad de una sustancia.

1. *Zona de subsaturación* (disolución subsaturada), donde la nucleación es termodinámicamente imposible. $\beta < 1$.
2. *Zona de metaestabilidad* (disolución sobresaturada), donde la nucleación espontánea es poco probable, pero donde si ponemos en la disolución un cristal-semilla, ésta crecerá. $1 < \beta < A$.
3. *Zona lábil* (disolución sobresaturada), donde la nucleación tiene lugar espontáneamente. La separación entre estas dos últimas zonas no está bien definida y depende de factores cinéticos (velocidad con que se genera la sobresaturación). $\beta > A$.

4. *Zona de sobresaturación* (disolución sobresaturada), donde la agregación se produce a una velocidad muy elevada generando precipitados desordenados y/o amorfos. $\beta > B$.

Crecimiento cristalino

La aparición de un núcleo proporcionará al sistema una superficie para favorecer el crecimiento cristalino. El crecimiento de un cristal inorgánico en una disolución pura requerirá de un aporte continuo de iones y su subsecuente incorporación a los sitios de la cara en crecimiento.

En numerosas ocasiones, la precipitación de una sustancia ocurre según un proceso secuencial que cumple la regla de Ostwald, que consiste en una nucleación en cadena en la que las fases más inestables e insolubles precipitan primero para después disolverse, dando lugar a fases termodinámicamente más estables (Ogino et al., 1987). Se observa habitualmente, en primer lugar, la formación de una fase amorfa que se disuelve para constituir núcleos del material cristalino en cuestión (Ostwald-ripening). El crecimiento de estos núcleos y el de fases inestables (p.ej., fases hidratadas) da lugar a la formación de cristalitos, precursores de los cristales que resultan en condiciones de equilibrio.

Mecanismos de crecimiento de cristales

Una vez formado un núcleo estable (de radio superior al radio crítico) de una fase cristalina en una disolución sobresaturada, éste comienza a crecer pudiendo adquirir un tamaño suficiente que sea visible, más o menos rápidamente dependiendo de la sobresaturación. Asimismo, este crecimiento cristalino ocurre a diferente velocidad en las diferentes caras del cristal.

El modelo clásico de crecimiento cristalino para un cristal que tiene una superficie plana con un escalón, sigue un mecanismo que puede dividirse en dos etapas: en la primera, se asume que las especies se mueven desde el seno de la disolución a la superficie del cristal y en la segunda, las unidades de crecimiento se adsorben sobre la superficie y difunden hacia los sitios de incorporación o rincones.

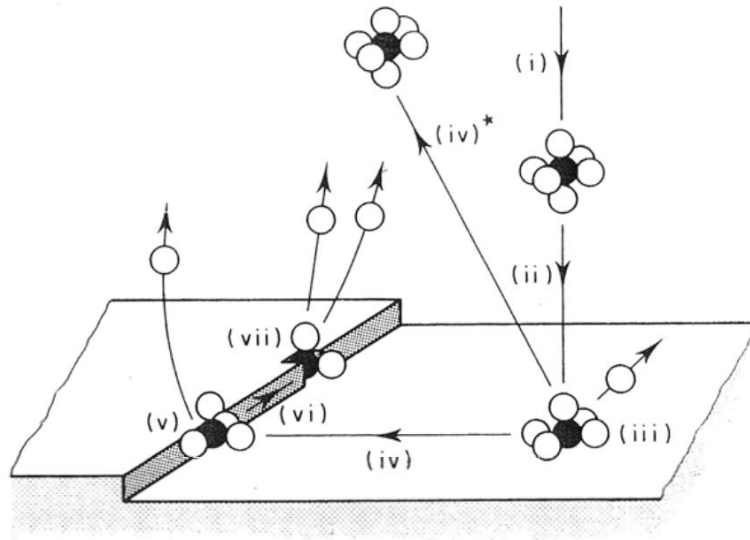


Fig. 1.1.3. Mecanismo de crecimiento cristalino en solución (Elwell 1975).

Este mecanismo se desarrolla a través de una serie de procesos consecutivos de tal forma que el cristal crece por una adición secuencial de iones hacia estos sitios. Los procesos que ocurren son:

- (i) Transporte de soluto hacia las proximidades de la superficie del cristal.
- (ii) Difusión a través de la capa límite, adyacente a la superficie, en la que existe un gradiente de concentración de soluto por su desaparición de la interfase sólido/solución.
- (iii) Adsorción a la superficie y deshidratación de los iones sobre las terrazas del cristal.
- (iv) Difusión bidimensional a través de la superficie hacia los escalones.
- (v) Adhesión al escalón.
- (vi) Difusión unidimensional a lo largo del escalón hacia el rincón.
- (vii) Incorporación al rincón (figura 1.1.3).

Cada etapa tiene asociada una barrera energética y la magnitud relativa de ésta ejerce una gran influencia sobre la cinética de crecimiento cristalino. Las etapas cinéticamente limitantes en el proceso de crecimiento cristalino pueden ser el transporte de unidades de crecimiento hacia la superficie del cristal, los mecanismos de adsorción-difusión-

incorporación en esta superficie o una combinación de ambos (Nielsen et al., 1982). Con el fin de obtener cristales de alta calidad, en muchas ocasiones se modifica el mecanismo de transporte en la etapa cinéticamente limitante del proceso de crecimiento cristalino. Para ello, se han desarrollado numerosos sistemas experimentales de precipitación, en los que el transporte de unidades de crecimiento se realiza mediante un proceso difusivo, usando capilares o mediante crecimiento en geles (García-Ruiz, 2003).

Los factores cinéticos tales como la tasa de aporte de material, sobresaturación, etc., determinan asimismo los mecanismos mediante los cuales los cristales continúan su crecimiento. El modo de incorporación de una unidad de crecimiento en un cristal es diferente dependiendo de la densidad de dislocaciones y rugosidad de la superficie. La rugosidad aumenta a medida que lo hace la fuerza motriz del sistema (sobresaturación), aunque el tipo predominante de superficie cristalina a nivel atómico es el liso (figura 1.1.4). A altos niveles de sobresaturación, la superficie es rugosa y el tipo de crecimiento predominante es continuo o mediante nucleación tridimensional, con integración directa de unidades de crecimiento (fig. 1.1.4a). Por el contrario, a niveles de sobresaturación bajos, la superficie es lisa y las unidades de crecimiento se incorporan según dos procesos distintos: nucleación bidimensional (fig. 1.1.4b) a valores mayores de sobresaturación o crecimiento en espiral a partir del escalón de una dislocación helicoidal (fig. 1.1.4c) a valores muy bajos de sobresaturación (Sunagawa, 1987).

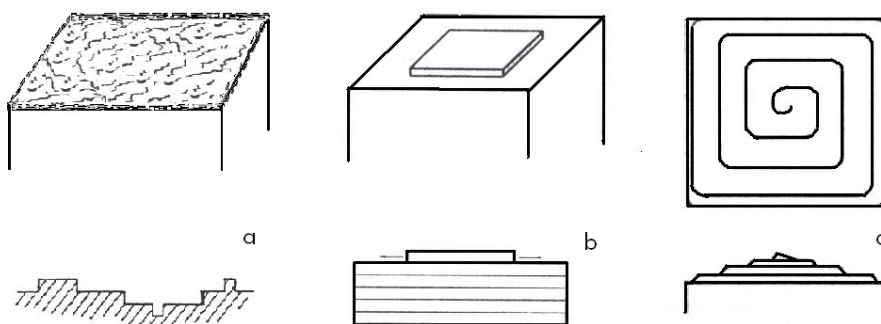


Fig. 1.1.4. Esquema de los diferentes tipos de interface cristal-solución y mecanismos de crecimiento asociados: (a) interface rugosa, crecimiento continuo, (b) y (c) interface lisa, nucleación bidimensional y crecimiento en espiral con sus respectivos perfiles en la parte inferior. (Sunagawa, 1987).

Al parecer, existe una correlación entre la evolución de la velocidad de crecimiento con la morfología de las caras en el cristal y la sobresaturación en el sistema (Sunagawa, 1982). Según esto, existe una sobresaturación β^{**} , por encima de la cual la interfase cristal/solución es rugosa y el mecanismo de crecimiento cristalino es continuo. Por debajo de β^{**} , la interfase es plana y el crecimiento puede producirse, por un mecanismo de tipo espiral o bien por crecimiento mediado por nucleación bidimensional. En la región que esta por debajo de β^* , el mecanismo que predomina es de crecimiento en espiral y las caras planas crecen debido a la formación de dislocaciones helicoidales. En la región $\beta^* < \beta < \beta^{**}$ el crecimiento se produce a partir de nucleación bidimensional (fig. 1.1.5)

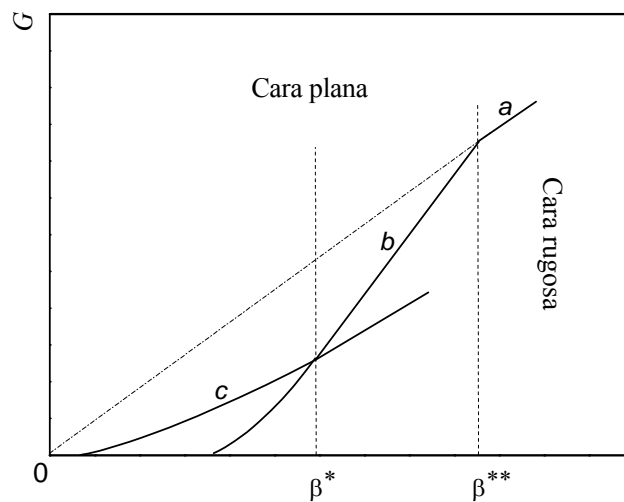


Fig. 1.1.5. Esquema de velocidad de crecimiento (G) frente a la sobresaturación relativa (β), en función del tipo de ley de velocidad: (a) lineal o crecimiento continuo, (b) exponencial o mediado por nucleación bidimensional y (c) parabólica o de crecimiento en espiral (Sunagawa, 1987).

Se suele representar la velocidad de crecimiento (G) en función de la sobresaturación relativa $\sigma = S-1$, para estudiar las cinéticas de crecimiento. A partir de $G = f(\beta)$, que es función del modelo utilizado, se puede conocer el mecanismo determinante de la velocidad de crecimiento. No obstante que la velocidad de crecimiento suele estar influenciada por varios mecanismos que tienen lugar simultáneamente, las siguientes expresiones muestran las tres leyes fundamentales de velocidad (Nielsen, 1984):

1. Lineal

$$G = K_G (S-1)$$

2. Parabólica

$$G = K_G (S-1)^2$$

3. Exponencial

$$G = K_G (S-1)^{2/3} S^{1/3} \exp(-B_{2D}/3 \ln S)$$

$$B_{2D} = \beta_{2D} \kappa^2 a / v (k T)^2$$

Siendo:

 G = velocidad de crecimiento S = sobresaturación K_G = constante cinética B_{2D} = factor numérico de forma
bidimensional a = el área molecular (m^2) v = número de iones por

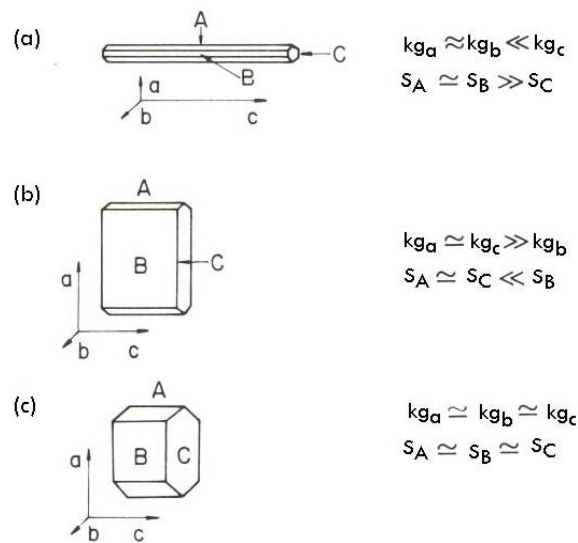
fórmula unidad

 k = constante de Boltzmann (J/K) T = temperatura (Kelvin) κ = Energía libre de borde (J/m)*

* A partir de la cual se puede calcular la energía libre de superficie $\sigma_\gamma = \kappa / a^{1/2}$ (J/m²).

Así mismo, la morfología puede modificarse por aditivos específicamente seleccionados (Addadi et al., 1985) que tengan afinidad estereoquímica por la estructura de las superficies a modificar y que puedan actuar como inhibidores. La actuación de estos inhibidores se pone de manifiesto por la morfología final del cristal que queda determinada por las tasas relativas de crecimiento del cristal en diferentes direcciones. Si se asume que el espacio para el crecimiento del cristal no está limitado, como regla general, las caras perpendiculares a los vectores de crecimiento más rápido tendrán un menor desarrollo y menor área superficial. Este concepto se ilustra en los esquemas de las tres morfologías representadas en la figura 1.1.6.

La forma de aguja (hábito acicular), fig. 1.1.6. (a), es el resultado de un crecimiento más rápido según la dirección de un eje, por ejemplo el eje c , en comparación con los otros dos ejes. Las caras que delimitan la aguja en la dirección de crecimiento rápido, C , tienen áreas superficiales pequeñas. La forma tabular, 1.1.6. (b), es el resultado de un crecimiento rápido en dos direcciones, ejes a y c en relación a la tercera dirección, b . Las caras más desarrolladas son las perpendiculares a la dirección de crecimiento lento, B . Un cristal equidimensional, 1.1.6. (c), normalmente es el resultado de tasas de crecimiento homogéneas en todas las direcciones.



$kg_{(a,b,c)}$ = velocidad de crecimiento a lo largo de a, b, c

$S_{(A,B,C)}$ = área de las caras de los cristales delimitadas a lo largo de a, b, c

Fig. 1.1.6. Esquemas de diferentes morfologías cristalinas, modificadas por la absorción selectiva de impurezas sobre caras específicas del cristal. (a) crecimiento rápido a lo largo de una dirección dando cristales en forma de aguja; (b) crecimiento rápido en dos direcciones, en relación a una tercera dando cristales en forma de placa; (c) tasas de crecimiento similar en todas las direcciones dando cristales casi isotrópicos (Addadi L. et.al., 1989).

Las tasas relativas de crecimiento de cristales en varias direcciones dependen de factores de energía intrínsecos de la capa así como de las interacciones con el medio de crecimiento. En este último caso pueden intervenir el disolvente y materiales extraños como impurezas de bajo peso molecular, proteínas u otras macromoléculas presentes en el sistema (Sunagawa, 1987).

El cese del crecimiento cristalino, entre otras razones, generalmente ocurre cuando caen los niveles de sobresaturación por un consumo de nutrientes. Ocasionalmente el cristal cesa su crecimiento debido a la acumulación de un gran número de defectos en la superficie de crecimiento debido a la incorporación de impurezas. Estos defectos superficiales interrumpen el crecimiento puesto que no pueden ser asimilados por el volumen de la estructura mediante la relajación de la superficie. Otra posibilidad que favorece el cese del crecimiento es por competición o bloqueo de otra fase cristalina

secundaria más soluble, es decir, un polimorfo o estructura hidratada que nuclea al cambiar las condiciones en la disolución sobresaturada.

Polimorfismo del CaCO_3

Mistcherlitz demostró en 1822 cómo ciertos compuestos químicos presentan polimorfismo (del griego "múltiples formas"; Bevan et al, 2002). Dependiendo de las condiciones fisicoquímicas del sistema (temperatura, presión, pH o determinados aditivos), una misma sustancia química puede cristalizar con diferentes estructuras y dar lugar por tanto a diferentes fases cristalinas. Uno de los compuestos más estudiados, que presentan polimorfismo, es el carbonato cálcico (objeto de estudio en este trabajo de tesis). El carbonato cálcico se distribuye ampliamente en la naturaleza y es el principal constituyente de muchas rocas sedimentarias. Además es un constituyente básico de muchos esqueletos de animales y algunos vegetales. Este compuesto al cristalizar puede adoptar seis estructuras diferentes: calcita, aragonito, vaterita, monohidrocalcita ($\text{CaCO}_3\text{-H}_2\text{O}$), $\text{CaCO}_3\text{-6H}_2\text{O}$ y $\text{CaCO}_3\text{-amorfo}$. De todas estas, la calcita y el aragonito son los polimorfos termodinámicamente más estables y los más ampliamente encontrados en estructuras biominerales.

Las estructuras de la calcita y aragonito se componen de capas alternas de iones calcio y grupos carbonatos paralelos al plano *ab*. En el aragonito, la disposición de los grupos carbonato difiere ligeramente de la que tienen en la estructura de la calcita (figs. 1.1.7a-b). Sin embargo, en la vaterita los grupos carbonatos están ordenados de manera perpendicular al plano *ab* (fig. 1.1.8).

La *calcita* (del latín *calx* que significa cal) es el polimorfo más estable del CaCO_3 , tiene una estructura con simetría trigonal y grupo espacial $R\bar{3}c$ [Lippman, 1973]. La calcita es un cristal iónico constituido estructuralmente por capas alternas de grupos carbonato y calcio, apilándose a lo largo del eje *c*. La forma más común de la calcita es la de romboedro puesto que las caras $\{10\bar{1}4\}$ son las de menor energía, de mayor densidad y contienen el mismo número de iones carbonatos que de calcio.

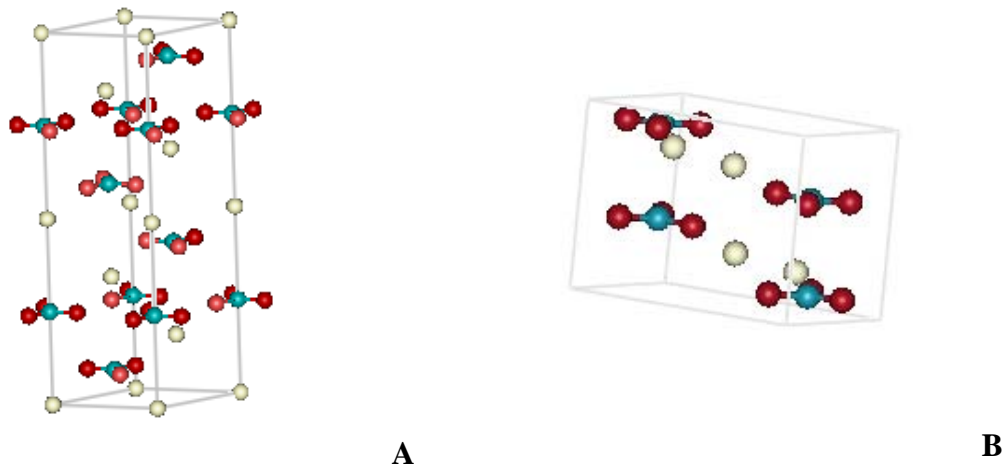


Fig. 1.1.7. A) Estructura de la calcita con un grupo espacial $R\bar{3}c$, B) Estructura del aragonito con un grupo espacial $Pmcn$.

Las caras de la calcita paralelas al eje c están formadas por grupos carbonato orientados perpendicularmente a la superficie. De todas estas caras, las $\{11\bar{2}0\}$ son las que tienen la mayor densidad de empaquetamiento de oxígenos [Rodríguez-Navarro et al., 2000].

El *aragonito*, se denomina así en 1797 por el nombre de la localidad donde se descubrió (Molina de Aragón, España), cristaliza en el sistema rómbico, grupo espacial $Pmcn$ [Lippman, 1973].

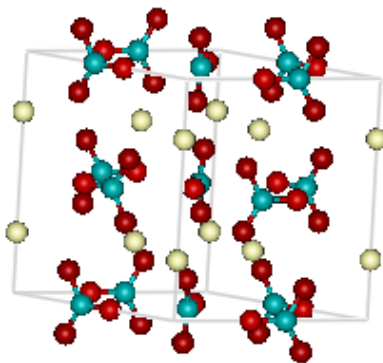


Fig. 1.1.8. Estructura de la vaterita con un grupo espacial $P6_322$.

La *vaterita* es una fase metaestable del carbonato cálcico mucho más inestable y rara que el aragonito y la calcita en condiciones ambientales. Bradley, Grafo y Roth (1966) determinaron que la *vaterita* cristaliza en el sistema hexagonal, con un grupo espacial $P6_322$ (García Ruiz, et al., 1980).

Tabla 1.1. Propiedades más relevantes de los tres polimorfos más estudiados del carbonato cálcico.

Propiedades	Calcita	Aragonito	Vaterita
Color	Incoloro, blanco, amarillo, rosa, amarillo o marrón etc.	Incoloro, blanco, gris blanco-amarillento, o blanco-rojizo.	Incoloro.
Diafanidad	Transparente a traslucido a opaco.	Transparente a traslucido.	Transparente
Exfoliación	Perfecta en $\{10\text{-}11\}$	Bien Definida Definida en $\{010\}$	Buena [?]
Composición	Ca (40.04%), CaO (56.03 %) C (12.00%), CO ² (43.97%) O (47.96%).	Ca (40.04%), C (12.00%), O (47.96%).	Ca (40.04%), CaO (56.03 %) C (12.00%), CO ² (43.97%) O (47.96%).
Sistema cristalográfico	Trigonal	Ortorrónico	Hexagonal
Dureza	3	3.5 - 4.0	3
Volumen de celda (Å³)	367.5	226.9	375.8
Volumen Molar (cm³)	36.934 ± 0.15	34.15 ± 0.5	37.13 ± 0.5
Densidad (gr/cm⁻³)	2.712	2.93	2.653
Constante de red (26°C) (Å)	a= 6.412 α = 101°55'	a= 7.968 b=	a= 7.15 c=16.98
Grupo Espacial	R-3c	Pmcn	P6 ₃ 22
Formas más comunes	$\{2\ 1\ \bar{1}\}$	$\{0\ 0\ 1\}$ $\{0\ \bar{1}\ \bar{1}\}$ $\{0\ 1\ 0\}$ $\{1\ 1\ 0\}$	

Web-1: <http://www.mindat.org/> (A: calcita, B: aragonito, C: vaterita)

1.2 BIOMINERALIZACIÓN

La *biomineralización* estudia la formación, estructura y propiedades de sólidos inorgánicos depositados en sistemas biológicos. También se define a la *biomineralización* como el proceso mediante el cual los organismos vivos precipitan minerales bajo un estricto control biológico, mediante una extracción selectiva y absorción de iones de un ambiente local, para formar cristales que se incorporan a estructuras funcionales. Estos procesos dan lugar a materiales con formas exquisitas y microestructuras con un alto grado de organización. Ejemplos de estas son: conchas de moluscos, cáscaras de huevos, dientes, huesos, otolitos, cocolitos, cálculos biliares o renales (en situaciones patológicas), etc. (Lowenstam & Weiner 1989, S. Mann, 2001).

Los procesos de biomineralización tienen consecuencias importantes a nivel geológico y evolutivo. Ha tenido un impacto a escala global a lo largo de la historia de la vida. Por consiguiente, es una disciplina interdisciplinaria, principalmente en la interface entre la química, biología y ciencia de los materiales, pero que también tiene importantes implicaciones en otros campos como la paleontología, química marina, sedimentología, medicina y odontología. El estudio de la biomineralización es una disciplina relativamente nueva que tiene sus raíces entre 1850-1900, con el descubrimiento y descripción sistemática de muchos organismos. Esta se inició, con sólidos cimientos, gracias al apasionado trabajo de investigadores como Haeckel, Gegenbauer, Grobben, Hatschek, Huxley, Lankester, Lamarck, Bronn y Bütschli (Lowenstam et al., 1989).

Existen evidencias desde al menos 3500 millones de años de mineralizaciones de origen biológico, tales como estromatolitos formados por colonias de organismos procariotas (bacterias). Desde entonces los organismos han ido mejorando la habilidad para controlar la formación de los diferentes biomateriales que hoy conocemos. Desde hace unos 540 millones de años, un gran número de organismos multicelulares empezaron a producir tejidos mineralizados: endo- y exo- esqueletos. En la actualidad existen una gran variedad de organismos de los cinco reinos que forman biominerales que utilizan para muy diferentes funciones (Addadi y Weiner, 1992).

Tipos de Biominerales y distribución

Los biominerales están constituidos por una fase inorgánica que puede ser: carbonatos, fosfatos y oxalatos cálcicos, sulfatos de metales del grupo IIA, sílice y óxidos de hierro (S. Mann et al., 1989) y una fase orgánica que puede estar compuesta por proteínas (fosfoproteínas, glicoproteínas), polisacáridos, lípidos y con frecuencia una mezcla de ellos. Los minerales más utilizados por los organismos son los carbonatos y fosfatos de cálcico y la sílice. Esto no es sorprendente si consideramos que existe una alta concentración de calcio, CO₂ y sílice disueltos en los océanos. De los 20 a 25 elementos esenciales para la vida de los organismos vivos, carbono, hidrógeno, oxígeno, magnesio, calcio, silicio, fósforo, azufre, manganeso y hierro, son los constituyentes más comunes de los aproximadamente 60 minerales biológicos diferentes que se han descrito. Más de la mitad de los elementos esenciales para la vida se encuentran incorporados en depósitos biominerales. Sin embargo, de estos el calcio destaca por estar ampliamente distribuido y por ser el constituyente común de huesos, dientes y cáscaras. El calcio es un elemento fundamental para mantener las funciones vitales celulares.

En este trabajo de tesis nos restringimos al estudio de procesos de formación de carbonato cálcico en sistemas biológicos, en particular durante la formación de la cáscara de huevo en aves. De los seis polimorfos que presenta el carbonato cálcico la calcita y el aragonito son los polimorfos termodinámicamente más estables y los mas ampliamente distribuidos en estructuras biominerales. Los mecanismos de selección polimórfica son de especial interés a la hora de entender los procesos de biomineralización.

Procesos de biomineralización

A pesar de que se conoce mucho acerca de estructuras biominerales y se sabe como varían éstas de un organismo a otro, se sabe relativamente poco sobre los mecanismos e interacciones moleculares que gobiernan la producción controlada de estos biomateriales tan complejos. Otro de los grandes desafíos que se plantean en el estudio de la biomineralización es cómo los organismos biológicos controlan exhaustivamente la composición mineralógica del material y seleccionan una estructura polimórfica u otra de un compuesto. En este respecto, existen algunos principios generales bien establecidos

sobre los mecanismos químicos, genéticos y celulares que controlan estos procesos. Por ejemplo, los procesos de formación de minerales en ambientes biológicos o biomineralización están regulados por los mismos factores fisicoquímicos (sobresaturación, temperatura, pH, aditivos, etc.) que rigen los procesos de precipitación inorgánica. Sin embargo, los seres vivos son capaces de regular estos procesos y los factores fisicoquímicos que los controlan dentro de unos límites determinados. Así, dependiendo de la capacidad de regulación que los organismos ejercen sobre estos procesos se distinguen los siguientes tipos de biomineralización:

- a) biomineralización inducida biológicamente,
- b) biomineralización controlada biológicamente y
- c) biomineralización controlada por el sitio biológico

Se entiende por *mineralización inducida biológicamente* a aquella que involucra una precipitación accidental de minerales inorgánicos y que surge de interacciones secundarias entre varios procesos metabólicos y el medio circundante. Un ejemplo de esta mineralización es el caso de cierto tipo de algas verdes, donde el carbonato cálcico precipita a partir de disoluciones saturadas de bicarbonato cálcico, por eliminación de dióxido de carbono durante la fotosíntesis. De manera semejante, la expulsión de productos metabólicos a través de o dentro de la pared celular de bacterias da lugar a la precipitación inducida biológicamente de varios minerales inorgánicos, por reacción posterior con iones metálicos extraños. Una característica distintiva de este tipo de biomineralización es que los minerales normalmente se forman a lo largo de la superficie de la célula, donde permanecen firmemente sujetos a la pared celular. Dado que los biominales producidos por mineralización inducida biológicamente son depositados de manera accidental, no están bajo un estricto control celular. En consecuencia, el tamaño, forma, estructura, composición y organización de las partículas minerales la mayoría de las veces son heterogéneas y están pobremente determinadas (Lowenstam 1981; S. Mann, 2001).

En los procesos de *mineralización controlada biológicamente* existe, por el contrario, una regulación completa del proceso de precipitación, dando lugar a una fase

mineral en la que los cristales presentan una morfología y tamaño muy bien definidos y característicos de cada especie (Weiner y Dove 2003). Como resultado de estos procesos se obtienen materiales funcionales como huesos, dientes, cáscaras de huevos, conchas de moluscos etc. Estos biominerales presentan propiedades cristal químicas específicas y características para cada especie como tamaño de partícula constante, estructuras y composición bien definidas, un alto nivel de organización estructural, morfologías complejas, agregación y textura controlada y orientación cristalográfica preferencial. Este tipo de biomineralización se da en algunos organismos unicelulares (bacterias magnetotácticas) y es extremadamente común en organismos multicelulares.

Biomíneralización controlada por el sitio biológico. Para controlar el proceso de cristalización, los organismos usan determinados compartimentos aislados del medio externo donde ocurre la mineralización. Estos compartimentos suponen una barrera que evita la difusión libre de los iones. Así la precipitación tiene lugar principalmente dentro de cuatro sitios: *i*) epicelular, sobre la pared de la célula, *ii*) intercelular, dentro de los espacios entre los paquetes celulares, *iii*) intracelular, dentro de los compartimentos celulares, *iiii*) extracelular, sobre o dentro de una red macromolecular insoluble ubicada fuera de la célula. Los sitios intra- o extra-celulares, a menudo están involucrados en la mineralización controlada biológicamente. De este modo, muchos organismos unicelulares forman biocomposites mediante un proceso controlado biológicamente dentro de vesículas intracelulares. En ambientes acuosos, grupos de moléculas de lípidos se auto-ensamblan de manera espontánea formando estas vesículas. Estos microambientes, formados de manera especial, son compartimentos llenos de un fluido (o solución saturada con respecto a la fase mineral), y que usualmente están delimitados por una membrana formada por una bicapa de moléculas de lípidos con proteínas embebidas en ésta. Estas estructuras esféricas, juegan un papel importante como sitios para biomineralización intracelular. Sin embargo, estos pequeños compartimentos no son compatibles con la formación de estructuras de gran tamaño como huesos, dientes o cáscaras; los cuales, por lo tanto, son construidos en espacios extracelulares. En este último caso, los procesos están regulados de manera precisa a través de la actividad especializada de células que sellan un espacio, en el cual se segrega una matriz orgánica, constituida de proteínas insolubles y polisacáridos como colágeno o quitina

respectivamente. De esta forma, la fase mineral se deposita, íntimamente asociada con la matriz orgánica. Estos componentes orgánicos (especialmente proteínas) juegan un papel muy importante en el proceso de cristalización y en particular en el control de la fase polimórfica, morfología y orientación de los cristales (Falini et al., 1995; Belcher et al., 1996; Nudelman et al., 2005). Ejemplos de este tipo de biomineralización son la formación de huesos donde cristales de hidroxiapatito están situados dentro espacios regulares, que se producen entre fibras de colágeno. En el caso de conchas de moluscos, los cristales de aragonito crecen orientados entre láminas de proteínas insolubles, y en cáscaras de huevo de aves, los cristales de calcita crecen sobre una matriz fibrosa extracelular y que describiremos mas adelante con mayor detalle.

1.3 PROTEÍNAS

Las proteínas son macromoléculas biológicas que desempeñan una gran variedad de funciones en los organismos vivos. Entre ellas podemos citar las siguientes: pueden actuar como moléculas de transporte o de almacenamiento de moléculas pequeñas, forman parte de la organización estructural de las células y tejidos, actúan en el sistema inmunológico, etc. Pero de todas las funciones que desempeñan las proteínas, quizás la más importante sea la que desempeñan las llamadas enzimas, que actúan como catalizadores que facilitan la enorme variedad de reacciones que conforman el metabolismo de los seres vivos.

Las unidades monoméricas que forman las proteínas reciben el nombre de α -aminoácidos. Cada aminoácido esta formado por un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (NH_2) unido al carbono α , el carbono contiguo al grupo carboxilo, de donde toman el nombre de α -aminoácidos. Al carbono α de cada aminoácido también están unidos un átomo de hidrogeno y una cadena lateral (R). La diferencia entre los distintos α -aminoácidos esta dada por sus cadenas laterales, de forma que según su naturaleza presentan diferentes características lo que permite a las proteínas exhibir una gran

variedad de estructuras y propiedades. Los aminoácidos pueden unirse entre sí de modo covalente mediante la formación de un enlace amida entre el grupo α -carboxilo de un aminoácido y el grupo α -amino de otro. Este enlace se denomina enlace peptídico (Fig. 1.3.1.) y los productos que se forman a partir de esta unión se denominan péptidos. La unión de dos aminoácidos forma un dipéptido y esta reacción puede considerarse una simple eliminación de una molécula de agua entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino en la posición α del otro. De esta forma los aminoácidos, mediante la formación consecutiva de enlaces peptídicos, forman cadenas con secuencias y longitudes definidas que son características para cada proteína. Si la cadena resultante solo tiene unos pocos residuos de aminoácidos, menos de 50, recibe el nombre de péptido. Cuando el número de residuos es mayor de 50 recibe el nombre de polipéptido.

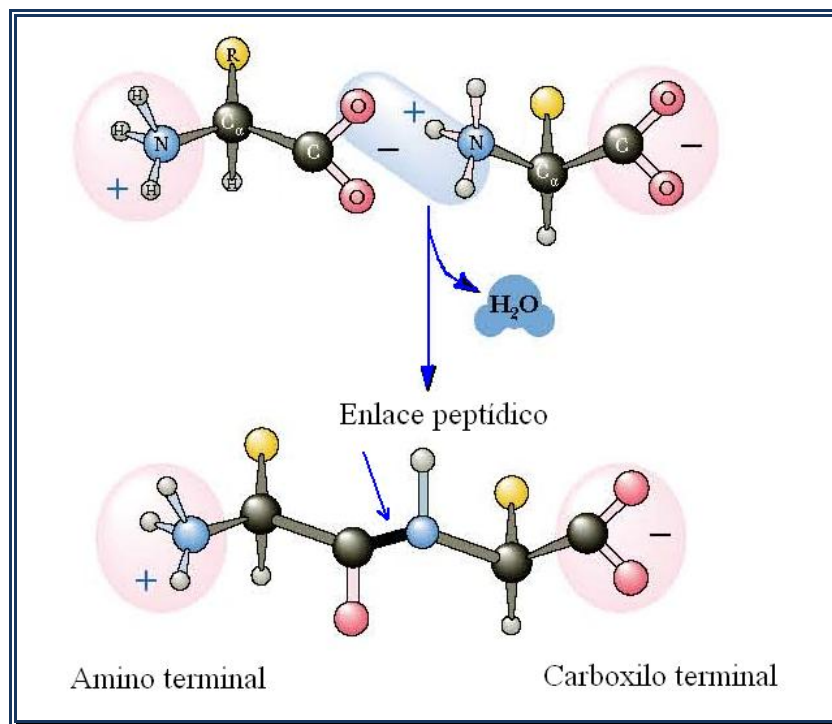


Fig. 1.3.1. Enlace peptídico formado entre el grupo carboxil (-COOH) y los grupos amino (NH₂) de residuos de aminoácidos adyacentes. (Garrett y Grisham, 1999.)

En todas las cadenas de proteínas existe un grupo amino que no ha reaccionado en un extremo, que se llama amino terminal o N-terminal, y un grupo carboxilo en el otro extremo, conocido como carboxilo terminal o C-terminal. Estos grupos terminales de la

cadena se encuentran ionizados a pH neutro, presentando una carga positiva y negativa, respectivamente.

En los genes de todos los organismos están codificados 20 aminoácidos distintos que son los que constituyen las proteínas. En la figura 1.3.2., se representan las estructuras completas de estos aminoácidos agrupados según su naturaleza química dominante, ordenados desde el más simple hasta el más complejo. Estas características incluyen el carácter hidrófobo o hidrófilo, la naturaleza polar o no polar, y la presencia o ausencia de grupos ionizables.

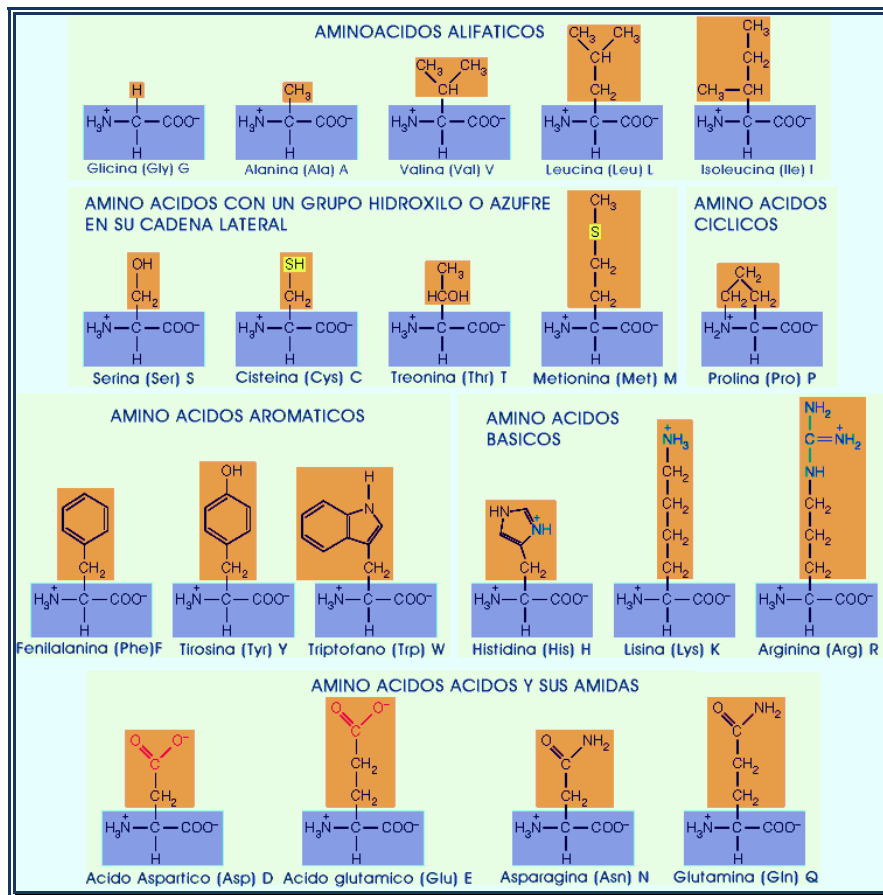


Fig. 1.3.2. Esquema de los 20 amino ácidos que conforman las proteínas y su clasificación según las propiedades de su cadena lateral. (Mathews, et al., 2002)

Además de las cargas del grupo amino libre en el N-terminal y el grupo carboxilo en el C-terminal, los polipéptidos suelen contener algunos aminoácidos que tienen grupos ionizables en sus cadenas laterales, los cuales poseen una amplia gama de valores de pK_a , (son todos grupos débilmente ácidos o básicos) por lo que los polipéptidos son considerados polianfolitos, ya que contiene grupos con valores de pK_a ácidos y básicos. Como tales anfólitos, los aminoácidos, los péptidos y las proteínas tienen un punto isoelectrico (pI), que es el pH al cual la carga neta es cero (figura 1.3.3).

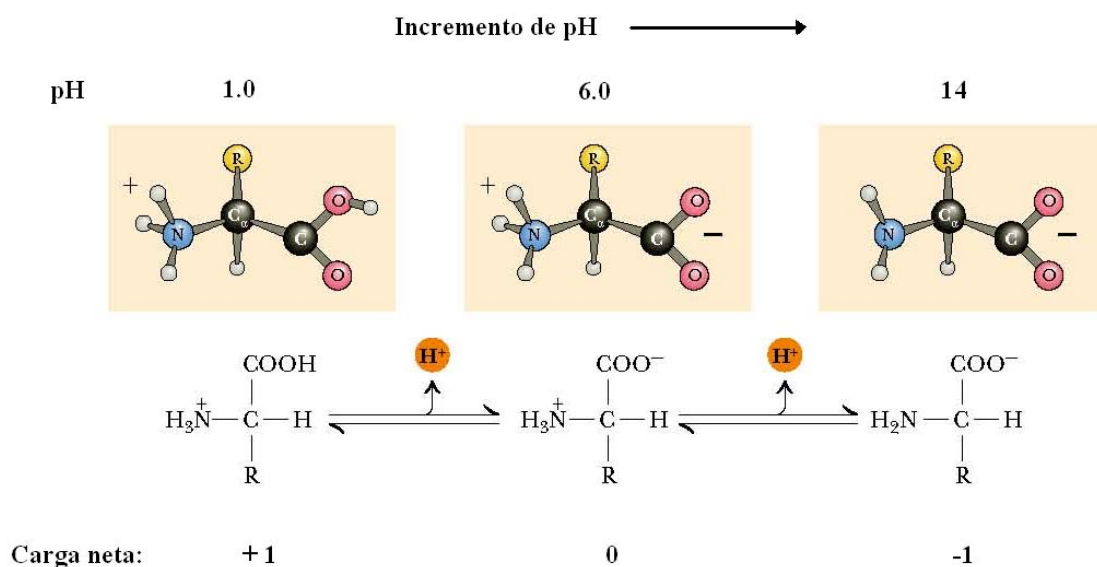


Fig. 1.3.3. Comportamiento químico de los aminoácidos en función del pH. (Garrett y Grisham, 1999.)

En el contexto de la proteína, a pH ácido los aminoácidos se encuentran mayoritariamente en su forma catiónica (cargados positivamente) y a pH básico se encuentran en su forma aniónica (cargados negativamente). Sin embargo, para cada proteína hay un pH específico donde la carga positiva y la carga negativa se encuentran en equilibrio y la molécula en su conjunto es eléctricamente neutra. Por esta razón una de las propiedades que presentan las proteínas es su capacidad amortiguadora, o efecto tampón ya que actúa como tal debido a su carácter anfótero, es decir, que pueden comportarse como ácidos o como bases.

En ocasiones, un pequeño cambio del pH modificará de manera significativa el conjunto de cargas presentes en la molécula de proteína y como consecuencia cambiará significativamente su comportamiento en disolución. Por ejemplo, la solubilidad de muchas proteínas es mínima en el punto isoeléctrico, debido a que las moléculas ya no se repelen unas a otras cuando su carga neta es igual a cero. Además, el hecho de que las distintas proteínas tengan diferente carga neta a un determinado pH puede aprovecharse para su separación o bien sea por electroforesis o por cromatografía de intercambio iónico.

Las proteínas presentan cuatro niveles de organización estructural: primaria (secuencia), secundaria (plegamiento local), terciaria (plegamiento global) y cuaternaria (asociación de varias cadenas).

Estructura primaria de las proteínas: Los polipéptidos que forman una determinada proteína tienen una secuencia bien definida, la cual viene dada por la secuencia de nucleótidos del ADN del gen que codifica la proteína. Esta secuencia se denomina estructura primaria e indica la composición de la cadena polipeptídica y el orden de sus aminoácidos. Existen evidencias experimentales que establecen que la secuencia de aminoácidos determina la estructura tridimensional de una proteína.

Estructura secundaria de las proteínas: la cadena polipeptídica se encuentra plegada en regiones de estructura regular. A este plegamiento regular local se le denomina estructura secundaria de la molécula. Linus Pauling y colaboradores en 1950, llevaron a cabo un análisis sistemático de las posibles conformaciones regulares de la cadena polipeptídica y propusieron las dos estructuras más probables: la hélice α y lámina β . La resolución de la primera estructura de una proteína, la mioglobina, a finales de los años 50, confirmó la existencia de la hélice α , y estructuras posteriores, la presencia de las láminas β como estructuras secundarias más comunes de las proteínas. En las hélices α la cadena polipeptídica se pliega de forma helicoidal a derechas sobre sí misma, dando lugar a vueltas que contienen 3.6 residuos. Esta disposición tridimensional permite la formación de enlaces de hidrógeno entre el hidrógeno de grupo amino de un residuo i y el oxígeno carbonílico del residuo $i-4$, y son casi paralelos al eje de la hélice. Las láminas β están constituida por cadenas adyacentes unidas entre sí mediante enlaces de hidrogeno

entre los grupos amino y carbonílico, los cuales son casi perpendiculares a las cadenas polipeptídicas.

Existen otras estructuras secundarias posibles: la hélice 3_{10} que se encuentra en las proteínas pero es menos común que la α -hélice y la hélice π que es posible estéricamente pero que aún no se ha observado en las proteínas. Además interconectando estos elementos de estructura secundaria se encuentran los giros β , que se encuentran por lo general en la superficie de las proteínas y están constituidos por cuatro residuos unidos por un enlace de hidrógeno entre el residuo 1 y 4.

Estructura terciaria de las proteínas: En este nivel de estructura, los elementos de estructura secundaria se pliegan a su vez formando una estructura compacta específica de la cadena polipeptídica, y determinada por el tipo de interacciones entre las α -hélices y hojas β -plegadas al plegarse sobre si en una conformación globular. Esta conformación es estabilizada por la presencia de enlaces entre las cadenas laterales de sus aminoácidos mediante: 1) puentes disulfuro, 2) puentes de hidrogeno, 3) interacciones electrostáticas y 4) interacciones hidrofóbicas. En el caso de proteínas solubles en agua, su estructura terciaria se caracteriza porque los aminoácidos que se encuentran en la superficie de la proteína son en general de naturaleza polar, mientras que los aminoácidos apolares aparecen enterrados en el núcleo hidrofóbico de la proteína.

Estructura cuaternaria de las proteínas: Algunas proteínas constan de varias cadenas polipeptídicas, dispuestas de modo regular, la cual es conocida como nivel de organización cuaternario. Existen muchas proteínas (dentro de la célula y en condiciones fisiológicas) que forman agregados específicos de dos o más cadenas polipeptídicas plegadas o subunidades. Esta organización cuaternaria puede ser de dos tipos: homoméricas, asociación entre cadenas polipeptídicas idénticas o heteroméricas, interacciones entre subunidades con estructuras muy distintas. Las proteínas que carecen de estructura cuaternaria se llaman monoméricas. Cuando están formadas por dos cadenas se llaman dímeros; si tienen tres, trímeros; si tienen cuatro, tetrámero, y así sucesivamente (Mathews, et al., 2002).

La figura 1.3.4, representa los cuatro niveles de estructura proteica, usando como ejemplo la molécula de hemoglobina.

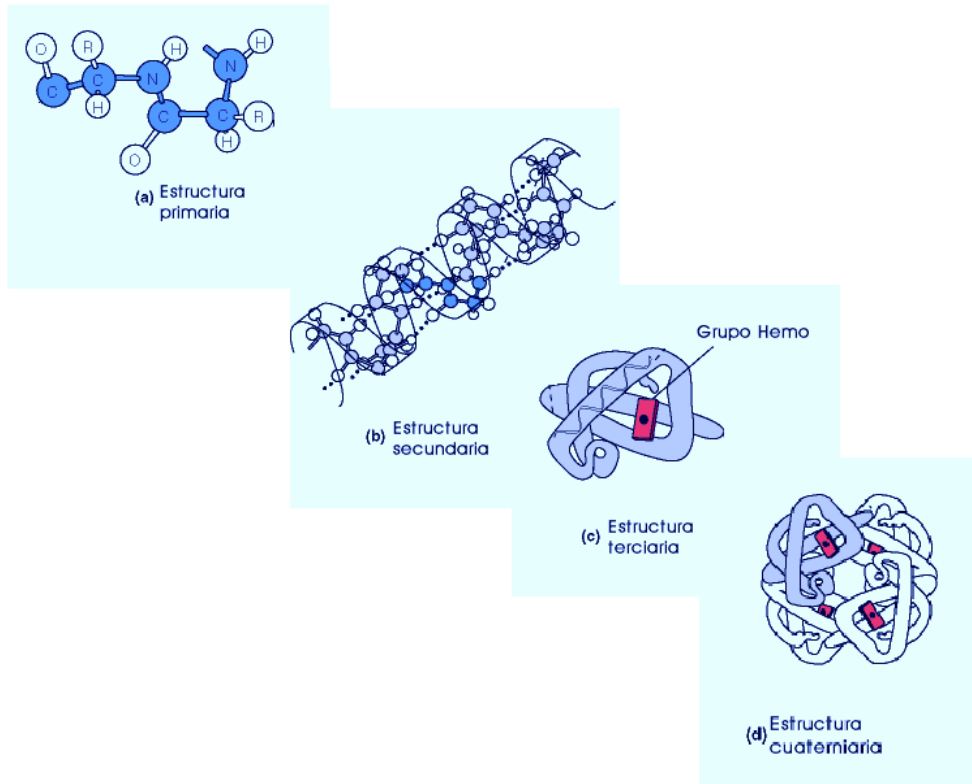


Fig. 1.3.4. Niveles de organización de las proteínas en función de su arreglo en el espacio (Mathews, et al., 2002).

1.4 CÁSCARA DE HUEVO DE GALLINA COMO MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDIO.

A continuación describiremos los procesos de formación y estructura de la cáscara de huevo de aves, que se estudia como modelo de biomineralización de carbonato cálcico en esta tesis.

1.4.1. *Biología del sistema reproductor de la gallina.*

Las aves tienen el aparato reproductor formado por un solo ovario funcional, el izquierdo y un oviducto. El oviducto, en gallinas ponedoras, mide entre 60-80 cm de largo, tiene un peso aproximado de 40 gr y se extiende desde el ovario a la cloaca. Por su morfología y función, el oviducto puede dividirse en seis regiones: infundibulum, magnum, istmo, istmo rojo (o glándula tubular de la cáscara), glándula de la cáscara (o útero) y vagina. Mediante un corte transversal se observa que estas regiones están formadas por varias capas, un tejido secretor, un tejido muscular y uno conectivo (Sauvers et al., en Fernández 2000). Estas regiones, con funciones y tamaños diferentes, actúan en conjunto para asegurar que el paso de la yema a través de estas sea suave. Se cree que probablemente el huevo se mueve por acción peristáltica ayudado por cilios de la pared interna del oviducto. En la figura 1.4.1, se muestra un esquema del oviducto de la gallina (órgano donde se forma el huevo) y las diferentes partes que lo componen, así como su función en la formación del huevo y el tiempo que éste permanece en cada parte del oviducto.

El tejido de cada sección está formado por células especializadas. Estas células producen y liberan los componentes que se incorporan de manera continua al huevo o ejercen control sobre la formación de este.

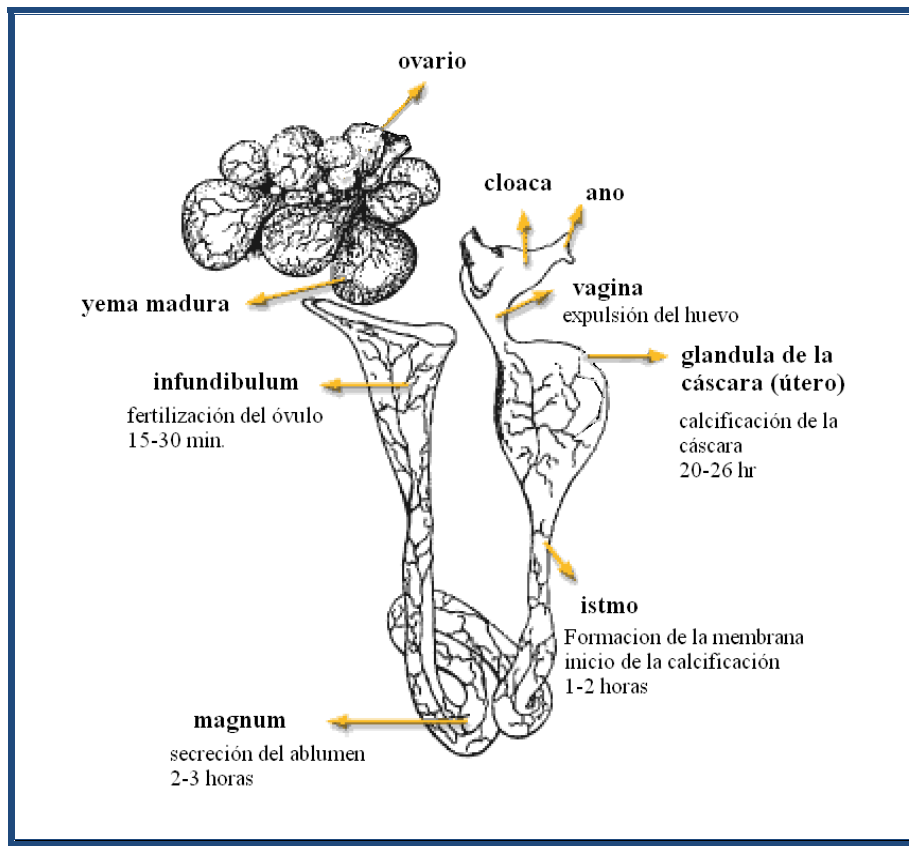


Figura 1.4.1. Esquema del oviducto de la gallina con sus diferentes partes y su papel en la formación de la cáscara de huevo (Esquema modificado de [pág. http://www.agroconnection.com.ar](http://www.agroconnection.com.ar)).

Un pollo hembra, al nacer, tiene cerca de 3000 óvulos capaces de poder desarrollarse y formar un huevo. Llegada la pubertad, solo algunos se desarrollan, desprendiéndose de una envoltura llamada folículo de De Graaf y cayendo de uno a uno en el infundibulum o primera parte del oviducto.

Infundibulum: órgano hueco que mide de 8-9 cm de largo con una terminación ancha en forma de embudo. En esta zona los pliegues de la mucosa son bajos, éstos están tapizados por células ciliadas no secretoras y una terminación posterior angosta donde los pliegues de la mucosa se hacen más pronunciados, originando los pliegues secundarios y terciarios. El tejido que tapiza la región media y caudal del infundibulum es pseudoestratificado y contiene células ciliadas y células secretoras no ciliadas. Las glándulas tubulares aparecen sólo en la unión infundibulum-magnum. A medida que se avanza caudalmente, las criptas dan origen a verdaderas glándulas (Solomon en

Fernández, 2000). La yema tarda en pasar a través de esta región alrededor de 15-30 minutos y es en esta zona donde se produce la fecundación en caso de haber espermatozoides.

Magnum: porción más larga del oviducto, mide alrededor de 35 cm. En esta región los pliegues de la mucosa son prominentes y están tapizados por células ciliadas y no ciliadas, las que se hacen más altas caudalmente. El huevo, al pasar a través de esta región, comprime los pliegues lateralmente y su estimulación mecánica por el descenso del huevo provoca la liberación de la albúmina. En esta región son sintetizadas todas las proteínas de la albúmina. Estudios electroforéticos de la albúmina revelan 19 bandas de proteínas, donde destacan las ovoalbúminas, que representan el 54% del total de proteínas del huevo. Otras bandas importante corresponden a la ovotransferrina (13%), ovomucoide (11%), ovoglobulinas (4%), lisozimas (3,5%), ovomucina (2%). De estas proteínas, son muy importantes para salvaguardar la calidad del huevo por su actividad bactericida o bacteriostática las lisozimas, catalasas, ovoinhibidor y ovomucoide (Crossley C. J., 1982). El tiempo que permanece la yema en esta región varía entre 3-4 horas aproximadamente. El magnum está separado del istmo por una zona delgada o línea traslúcida no glandular tapizada por células ciliadas y no ciliadas (Solomon, en Fernández, 2000).

Istmus: región de 10 cm de longitud; es más angosta que el magnum y sus pliegues son menos voluminosos, su límite superior está visiblemente determinado por la zona aglandular. Está tapizado por un epitelio pseudoestratificado columnar con células ciliadas y no ciliadas. En esta región se lleva a cabo la formación de las membranas interna y externa del cascarón. En las glándulas tubulares del istmo se sintetiza el colágeno tipo X, el cual es el componente principal de las membranas (Fernández et al., 1997). Ambas membranas son depositadas sobre el albumen en aproximadamente 60-75 minutos. Aunque estas membranas no participen directamente en el proceso de mineralización de la cáscara, su presencia es indispensable para su formación (Krampitz, en Fernández, et al., 2000). Alteraciones en su formación reducen la mineralización de la cáscara (Nys Y. et al., 2001, Arias et al., 1997a).

Istmo rojo o glándula tubular de la cáscara: región tapizada de un epitelio columnar compuesto por células ciliadas y no ciliadas con microvellosidades. En la base

de este tejido se encuentran las glándulas tubulares, las cuales producen queratán sulfato o mamilán, presente en los núcleos mamilares de la cáscara de huevo. Los núcleos mamilares se depositan durante el tiempo que permanece el huevo en esta región (Fernández et al., 1997) y son los centros de nucleación a partir de los cuales se inicia la mineralización de la cáscara de huevo.

Glándula del cascarón o útero: región formada por paredes gruesas y muy vascularizadas, compuesta por un tejido laminar que recubre los pliegues y por las glándulas tubulares contenidas en estos pliegues. Esta región está formada por células ciliadas y no ciliadas con microvellosidades (Solomon, en Fernandez et al., 2000). Las células epiteliales no ciliadas producen dermatán sulfato u ovoglicán, el cual es un componente importante de la matriz orgánica de la cáscara. La producción del ovoglicán coincide con el comienzo del crecimiento de los cristales de calcita (Fernández et al., 2000). En la región del útero es donde el huevo permanece más tiempo, aproximadamente unas 20 horas. En este fragmento se producen dos fenómenos: 1) en la fase inicial de la formación del cascarón, la parte distal del útero secreta iones y agua los cuales son bombeados hacia dentro del huevo. Se piensa que los poros del cascaron son formados como un subproducto de este proceso, 2) el segundo fenómeno y de mayor importancia es la mineralización de la cáscara mediante la precipitación del carbonato cálcico en asociación con una matriz orgánica. Durante las primeras 2-3 horas desde que empieza la precipitación del carbonato cálcico, el proceso de mineralización es muy lento haciéndose mas rápida entre las 10-22 horas, que transcurren desde la ovulación. Durante las dos últimas horas de formación de la cáscara, cesa la mineralización y se inicia la deposición de la cutícula, ya depositada la cutícula, el útero se contrae y expulsa el huevo hacia la vagina (Solomon, en Fernández et al., 2000).

Vagina: esta región no participa en la formación del huevo, inclusive no entra en contacto con él. Su expulsión se lleva a cabo, mediante un prolapso de la parte posterior del útero.

Desde el momento en que un óvulo es liberado del ovario (ovulación) hasta que es expulsado por la vagina (ovoposición), transcurren alrededor de 26 horas. La mejora

genética ha conseguido disminuir el tiempo entre la postura de dos huevos y lograr 1 huevo cada 24 hrs (Crossley, 1982; pág. <http://www.agroconnection.com.ar>).

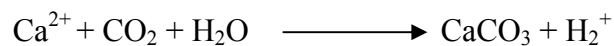
1.4.2. *Proceso de formación de la cáscara de huevo*

La mineralización del cascarón de huevo de gallina es uno de los procesos de mineralización biológica más rápidos: 5 gr. de CaCO_3 son depositados en tan solo 20 hrs. bajo un preciso control espacio temporal durante su formación secuencial.

La calcificación de la cáscara de huevo es el resultado de un fenómeno de precipitación que ocurre sobre la membrana externa del cascarón. En el istmo, donde el huevo permanece de 1-2 horas, ocurre la deposición de las membranas interna y externa de la cáscara mediante un proceso secuencial conocido como fibrilogénesis. Durante éste proceso las fibras de colágeno adquieren de manera gradual una superficie uniforme. Se piensa que el colágeno tipo X desempeña el papel de inhibidor de la mineralización, ya que se ha determinado su presencia en zonas de biocomposites que nunca mineralizan, como en la capa interna del cascarón de huevo (Arias et al., 1997) o en espacios producidos por estas fibras en el tejido óseo. No obstante, el papel que desempeña este tipo de colágeno en el proceso de biomineralización es desconocido.

La mineralización de la cáscara se lleva a cabo durante el paso del huevo a través del las distintas regiones del oviducto (Nys Y. et al., 2001). En el istmo rojo son depositados los núcleos mamilares, los cuales son pequeños agregados esféricos de aproximadamente 10 μm , formados por diferentes proteínas incluyendo anhidrasa carbónica (Krampitz, en Fernández, et al., 2000), como componente importante queratán sulfato o mamilán y ácido siálico sobre su superficie. Estos componentes poseen una alta afinidad por el calcio (Fernández et al., 2000; Cooke et al., 1970). Sobre los núcleos mamilares los iones calcio son complejados fácilmente, por lo que se cree que intervienen en el proceso de nucleación del carbonato cálcico, para dar lugar a la formación de agregados esféricos de calcita (Arias et al., 1992). A partir de estos esferulitos, y con la participación de los diversos componentes de la matriz orgánica y la intervención de la

anhidrasa carbónica, se continuará el crecimiento de los cristales de calcita para dar lugar a la formación de la capa palizada formada por cristales columnares (García-Ruiz et al. 1994, Arias et al. 1993, Nys et al 1999). Durante este proceso, hay cambios en el balance ácido-base del ave y se producen iones carbonato (CO_3^{-2}) por la hidratación del dióxido de carbono metabólico (Lörcher et al., 1969). Las células epiteliales de la glándula del cascarón suministran anhidrasa carbónica (Gay et al., 1973), que producen una alta concentración de iones carbonato, a partir de bicarbonato o de dióxido de carbono metabólico. De este modo, esta enzima es capaz de catalizar la reacción que produce carbonato cálcico:



Los protones que son liberados por esta reacción durante la formación de la cáscara del huevo, inducen una acidosis en el ave. Como consecuencia, las gallinas ponedoras incrementan su actividad respiratoria por jadeo, al tiempo que los protones son excretados por el riñón, por lo que la orina de una gallina ponedora es ácida durante el proceso de calcificación del cascarón de huevo (Simkis, 1971). Por tanto, la glándula del cascarón de las aves está transportando iones a través del epitelio para depositar calcio e iones carbonato dentro del oviducto y moviendo protones y contraiones hacia fuera en la sangre. Por otra parte, el calcio que se deposita sobre la cáscara se obtiene directamente de la sangre, ya que no existe un almacenamiento de calcio en la glándula de la cáscara antes de la calcificación. La formación de la cáscara implica la movilización de 2 g de calcio, que corresponde de un 8% a un 10% del contenido corporal de calcio. La fuente principal de calcio proviene de la dieta y se absorbe durante la digestión por la pared intestinal. El depósito de calcio en la cáscara (150 mg/h) es tan rápido que obliga a la renovación total del calcio sanguíneo cada 12 horas (Nys, 1990; Sauvers en [pág. http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/](http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/)). Aunque la principal fuente de calcio proviene de la dieta y el intestino (durante la formación de la cáscara, la retención intestinal de calcio pasa del 40 al 80%), no todo el calcio que se deposita en la cáscara procede del intestino, una parte tiene su origen en el esqueleto.

Mientras el huevo permanece en la glándula de la cáscara o útero, es depositada la parte mineral del cascarón. Este proceso dura aproximadamente unas 20 hrs. Durante las

primeras horas la tasa de deposición de carbonato cálcico es muy lenta, luego se hace más intensa hasta llegar a 330 mg/h entre las 10 y 22 horas después de la ovulación. La calcificación de la cáscara se produce mientras el huevo se encuentra bañado en el fluido uterino. En este fluido, el calcio y los iones bicarbonatos se encuentran en concentraciones tan elevadas que el producto de solubilidad de la calcita es superado cien veces. Por tanto, la deposición del carbonato cálcico ocurre en condiciones de muy alta sobresaturación, de modo que en estas condiciones es posible la precipitación espontánea del carbonato cálcico. Curiosamente, este alto grado de sobresaturación se mantiene incluso en la fase terminal en la que se detiene la deposición de la cáscara y en la que el producto iónico supera aun sesenta veces el producto de solubilidad de la calcita. Por tanto, la concentración de calcio e iones carbonatos no es el factor determinante para el cese de la mineralización (Nys et al., 1991). Por el contrario, se cree que el cese de la mineralización, es debido a la presencia de un inhibidor determinado. Los iones fosfatos son unos inhibidores muy potentes de la formación de calcita, por lo que es posible que esta inhibición pueda deberse a un compuesto orgánico fosforilado, que hace que los grupos fosfatos compitan por el ion calcio y que se produzca hidroxiapatito (fosfato de calcio), que aparece en cantidades traza en la superficie externa de la cascara (Dennis et al., 1995). La presencia de fósforo en las capas superficiales de la cáscara (Fink et al., 1993 en Cusack et al., 2003) junto con la fuerte modificación de la morfología de los cristales en la capa superficial (Quintana y Sandoz, 1978) refuerzan esta hipótesis. Por otra parte, el hecho que cese la precipitación de carbonato cálcico a pesar de mantenerse un medio sobresaturado apoya esta hipótesis (Nys et al., 1991). Durante las dos últimas horas de formación de la cáscara, se detiene la mineralización y se inicia el depósito de cutícula. Una vez que esta capa se deposita, la glándula de la cáscara se contrae y expulsa el huevo hacia la vagina (Solomon en Fernández, 2000).

1.4.3. *Descripción de la fracción mineral de la cáscara de huevo.*

La cáscara de huevo de gallina es una estructura calcificada esencial para la propagación de todas las especies de aves; es una estructura sofisticada cuyas propiedades reflejan su papel crucial en la reproducción. Sus funciones básicamente son: 1) funcionar como una barrera protectora del contenido del huevo, frente al medio físico y microbiano,

2) controlar el intercambio de agua y gases a través de sus poros durante el desarrollo extrauterino del embrión, 3) como reserva de calcio una vez que el calcio almacenado en la yema se ha agotado (Nys et al., 2004). La cáscara de huevo es una estructura biocerámica formada por componentes orgánicos e inorgánicos. La zona calcificada esta formada de CaCO_3 (95% en peso) en forma de calcita. Del material remanente el 3.5% está constituido principalmente de proteínas fibrilares con enlaces disulfuro entrecruzados, colágenos del tipo I, V y X en las membranas de la cáscara (Arias et al., 1997; Wang et al., 2002; Won et al., 1984) y proteoglicanos y glicoproteínas en la capa calcificada (Simkiss et al., 1989; Nys et al., 1999). Es un material cerámico poroso, con excelentes propiedades mecánicas que lo hace suficientemente resistente para resistir los impactos y agresiones externas ante depredadores pero cuyas características le permiten al pollito romper desde la parte interior el cascarón. Por otra parte, el huevo es un alimento fundamental y en el mercado de alimentos la calidad e integridad de la cáscara, que es básicamente un empaque natural, es crucial para la seguridad del consumidor. Es por ello que las propiedades del cascaron y en particular su resistencia ha sido sujeto de numerosas investigaciones. Como hemos visto anteriormente, el proceso de formación de la cáscara de huevo es un proceso exquisitamente regulado y como resultado de éste se genera un material con una composición y estructura muy bien definida y característica para cada especie, por lo que se piensa que ésta regulación tiene un componente genético. La formación de la cáscara se inicia con la agregación de esferulitos de calcita que se depositan sobre los núcleos mamilares, actuando estos últimos como centros de nucleación. Esta etapa inicial continúa hasta que los esferulitos adyacentes se funden y a partir de ellos surgen cristales columnares de calcita (de alrededor de 50 μm de ancho y 400 μm de alto en el huevo de gallina) que componen la capa palizada, capa que se forma durante un estadio de crecimiento muy rápido de la cáscara. El crecimiento de estas unidades columnares continúa hasta que se termina el proceso de calcificación de la cáscara (etapa terminal) con la deposición de la capa orgánica denominada cutícula. En la figura 1.4.3.1. se muestra la cáscara de huevo y sus diferentes partes estructurales. La cáscara de huevo, tiene una organización estructural muy bien definida y constante para todas las especies de aves. Básicamente, la ultraestructura de la cáscara de huevo se caracteriza por estar formada por unidades columnares de cristales de calcita que tienen un cierto grado de orientación preferencial. Sin embargo, las características

microestructurales, tales como el tamaño de los cristales así como su grado de orientación, varían de unas especies a otras como se ilustra en la figura 1.4.3.2.

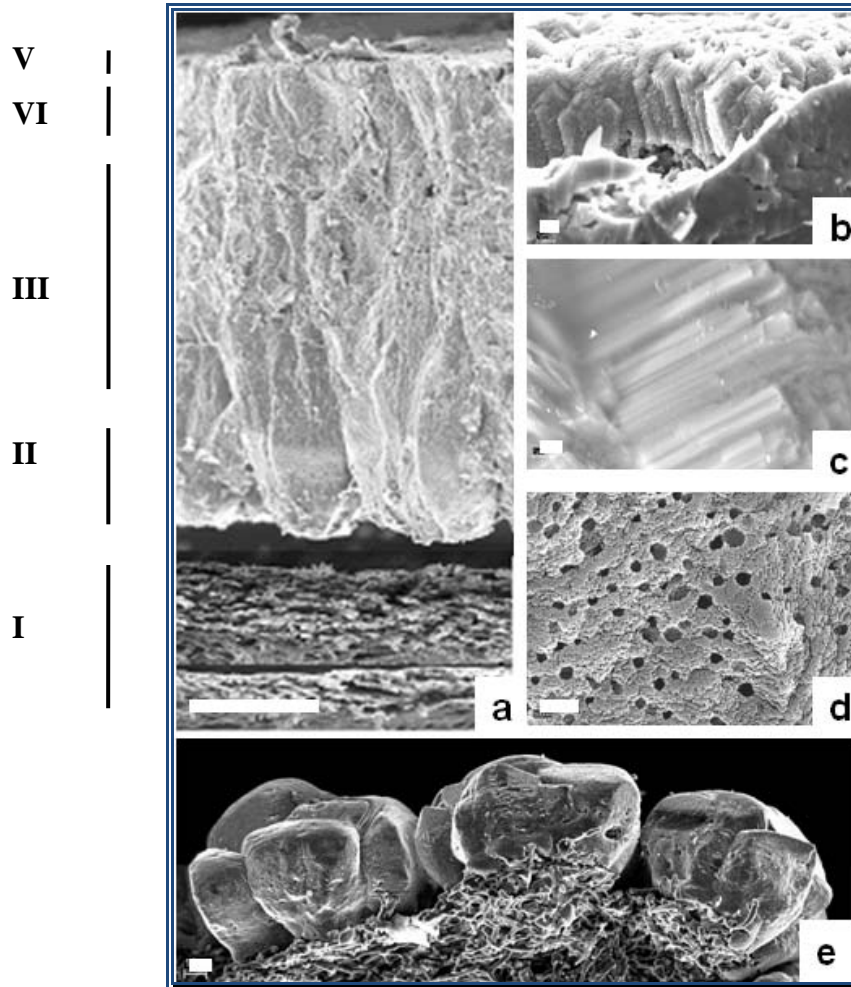


Fig. 1.4.3.1. Observación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) de una sección transversal de la cáscara de huevo de gallina. a) sección completa de la cáscara de huevo donde se observan las diferentes partes estructurales de esta. De abajo a arriba aparecen las dos membranas del huevo (I), la capa mamilar (II), la capa palizada formada por cristales columnares de calcita (III), la capa de cristales verticales (IV) y la cutícula (V); b) detalle de la capa de cristales verticales depositados sobre la capa palizada; c) detalle de la palizada; d) detalle de un núcleo mamilar; e) cáscara de huevo en su etapa inicial de crecimiento, en la que se observan los agregados esféricos de cristales de calcita formando la capa mamilar depositada sobre las membranas no mineralizadas de la cáscara del huevo (Rodríguez-Navarro et al. 2008).

Tanto la estructura columnar y la orientación preferencial de los cristales es el resultado de un proceso de crecimiento competitivo de cristales, debido a que estos crecen

simultáneamente y compiten con los cristales adyacentes por el espacio disponible que tienen para crecer, con lo cual el crecimiento está restringido lateralmente y hace que los cristales crezcan solo hacia arriba, desarrollándose una estructura columnar (Rodríguez-Navarro et al., 1999).

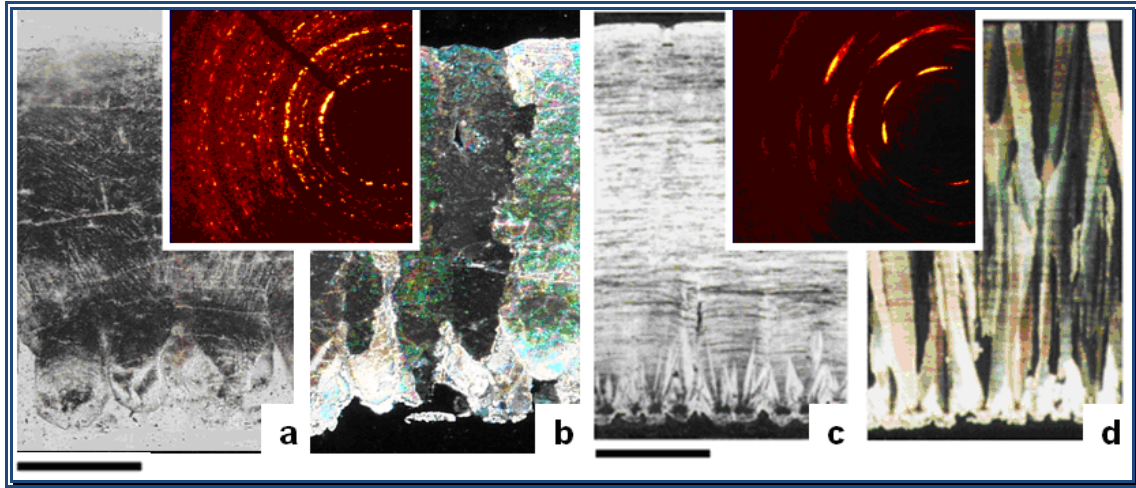


Fig. 1.4.3.2. Microestructura de cáscaras de huevo de diferentes especies, según se observan con microscopía óptica y con luz polarizada plana o con Nícoles cruzados en láminas delgadas petrográficas. a) y b) Microfotografías de la cáscara de huevo de gallina en la que se muestra la distribución de materia orgánica y la estructura de cristales columnares con diferente orientación cristalográfica y que presentan diferentes grados de extinción. La barra de escala corresponde a 100 micras. c) y d) Microfotografías de la cáscara de avestruz, en la que se muestra la distribución de materia orgánica, según líneas de crecimiento paralelas, y la estructura de cristales columnares muy alargados y altamente orientados. La barra de escala corresponde a 300 micras. Entre las microfotografías de las láminas delgadas se muestran un patrón de difracción de rayos X de la superficie externa de la cáscara. En el caso de la cáscara de gallina, se observa anillos concéntricos formados por reflexiones aisladas. Esto es debido a que la cáscara está formada por cristales de calcita de gran tamaño y con una orientación casi aleatoria. Por el contrario, en el caso de la cáscara de avestruz, en el patrón de difracción aparecen arcos en vez de anillos completos, lo cual indica que existe un alto grado de orientación preferencial de los cristales (Rodríguez-Navarro et al. 2008).

Al mismo tiempo, el crecimiento de determinados cristales está favorecido por su orientación. Si éstos se encuentran orientados con las direcciones de máxima velocidad de crecimiento (el eje c en el caso de la calcita) en vertical, avanzando más rápidamente y

bloqueando el crecimiento de los cristales con una orientación más desfavorable. Esto hace que se desarrolle una orientación preferencial o textura fibrosa de los cristales que componen la cáscara de huevo que se orientan con el eje c perpendicular a la superficie externa de la cáscara (ver figura 1.4.3.2. d).

1.4.4. *Descripción de los componentes macromoleculares de la cáscara de huevo*

En los últimos 20 años, se ha hecho una gran labor investigadora con objeto de identificar y caracterizar los componentes moleculares presentes en la matriz orgánica de la cáscara de huevo. Este interés se debe a que al igual que en otros biominerales, se considera que el proceso de formación de la cáscara de huevo está regulado por la matriz orgánica.

Sin embargo, poco se sabe aún acerca de los mecanismos moleculares precisos que regulan su formación. La bioquímica de la matriz orgánica del cascarón del huevo ha sido estudiada por Leach (1982), Hamilton (1986) y Fernández (1993) pero el conocimiento que se tiene de esta aún es muy básico. Para caracterizar la matriz orgánica presente en la capa mamilar o en la capa palizada es necesario solubilizar las proteínas integradas en estas estructuras. Para ello es necesario descalcificar estas capas, lo cual se hace comúnmente usando un agente quelante de calcio como el EDTA¹ ó ácido acético (que forman complejos de coordinación con el calcio). Sin embargo, estos métodos de extracción son un tanto agresivos para las proteínas, ya que afectan a su estado de agregación y dificultan su subsiguiente resolución mediante técnicas cromatográficas de purificación. Una alternativa, para la caracterización de la matriz orgánica, es estudiar el fluido uterino el cual contiene los precursores de las proteínas de la matriz en su forma nativa y funcional antes de incorporarse a la cáscara del huevo.

La identificación y caracterización de numerosas proteínas de la cáscara de huevo se ha logrado mediante técnicas bioquímicas tales como la microsecuenciación de

¹ EDTA del ingles Ethylene Diamine Tetraacetic Acid

aminoácidos extraídos de las bandas transferidas a membranas PVDF² obtenidas a partir de geles SDS-PAGE³ de extractos de la cáscara de huevo y del fluido uterino. Asimismo, se pueden generar anticuerpos específicos contra esos componentes aislados mediante SDS-PAGE preparativa (Gautron et al., 1997; Hincke et al., 1995). Estas técnicas permiten además localizar a las proteínas en zonas específicas de la cáscara de huevo o del oviducto mediante inmunofluorescencia y usando inmunquímica de plata coloidal. Estos estudios han permitido la identificación de una gran variedad de proteínas de la matriz de la cáscara y su agrupación en tres principales grupos: 1) proteínas que se encuentran en otros tejidos del cuerpo (componentes ubicuos), 2) proteínas de la clara del huevo y 3) proteínas del útero exclusivamente asociadas al proceso de calcificación de la cáscara.

Dentro del primer grupo se encuentra principalmente la *osteopontina* (glicoproteína fosforilada) presente en hueso y riñón y en la cáscara de huevo (Pines et al., 1995). En la cáscara de huevo aparece localizada en el núcleo de las fibras de la membrana de la cáscara, en la base de la capa mamilar, en la capa palizada así como en su parte externa (Fernández et al., 2003). Se le atribuye un potente efecto inhibitor (fosfato dependiente) de la precipitación del carbonato cálcico (Hincke et al., 1998). Otra proteína ubicua es la *clusterina* (glicoproteína heterodimerica) que aparece distribuida en las capas mamilar y palizada, además de encontrarse en otros muchos tejidos (Mann et al., 2003).

De las proteínas de la clara del huevo, la *lisozima*, *ovoalbúmina* y *ovotransferrina* son los constituyentes principales de la clara de huevo y representan el 3.5, 54 y 12 % de la clara. Gautron (2001) y Hincke (1995, 2000) muestran como la ovoalbumina está presente en el fluido uterino, predominantemente en la etapa inicial de formación de la cáscara, y aparece también localizada en la capa mamilar. Estos autores describen que lisozima y ovotransferrina están presentes de manera importante en el fluido uterino, durante la etapa inicial de formación de la cáscara, en las membranas de la cáscara y en la capa mamilar. Sin embargo, no se les atribuye un papel importante en el proceso de

² PVDF del inglés Poly Vinyl Dene Fluoride

³ SDS-PAGE del inglés Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis

mineralización de la cáscara y sólo se piensa que tienen una función como agentes antimicrobianos.

En el último grupo se encuentran las proteínas que están exclusivamente relacionadas con el proceso de biomineralización de la cáscara y de las que hablaremos en detalle a continuación. Dentro de este grupo destaca la *ovocleidina-17* (glicoproteína fosforilada) que fue la primera proteína caracterizada y purificada por métodos cromatográficos a partir de la matriz de la cáscara de huevo. Esta proteína se ha localizado por técnicas inmunohistoquímicas en las capas mamilar y palizada. Asimismo aparece en el fluido uterino en todas las etapas de formación de la cáscara, aunque aparece a más alta concentración en la etapa rápida de crecimiento de la cáscara (Gautron et al., 1997).

Otras proteínas de este grupo y que han sido clonadas recientemente son la *ovocalixina-21* y *ovocalixina-25*. Estas aparecen en los tejidos donde se lleva a cabo la mineralización de la cáscara (en el útero y en el istmo rojo). La *ovocalixina-32* está presente en el fluido uterino durante la fase de crecimiento pero aparece principalmente en la fase terminal de la calcificación, y consecuentemente se le localiza en la región externa de la capa palizada, en la capa de cristales verticales y en la cutícula (Gautron et al., 2001). Es por ello que se piensa que esta proteína puede estar involucrada en el cese de la mineralización de la cáscara y por tanto podría tener un papel muy importante en el proceso de regulación de la formación de la cáscara.

La *ovocalixina-36* ha sido también clonada, y aparece en los extractos orgánicos de la cáscara y a altas concentraciones en el fluido uterino durante la fase rápida de crecimiento. Además esta proteína es expresada solamente en el tejido uterino en el momento en el que el huevo entra en el útero, por lo que se trata de un buen candidato como proteína que regula la formación de la cáscara.

La *ovocleidina-116* es el componente principal de la matriz orgánica de la cáscara de huevo de gallina donde aparece a lo largo de la capa palizada y muy abundantemente en el fluido uterino durante la fase de calcificación más intensa. Esta proteína es secretada en el útero por las células granulares de la superficie del epitelio.

Asimismo, estudios recientes muestran la presencia de cientos de proteínas en la cáscara de huevo (Mann K., 2006), sin embargo, no se conocen con exactitud como intervienen en los mecanismos responsables del inicio, etapa de crecimiento y terminación de la mineralización de la cáscara de huevo.

1.5 JUSTIFICACION Y OBJETIVOS DE LA TESIS.

La capacidad extraordinaria que tienen algunos organismos de controlar la precipitación de minerales y el crecimiento de los cristales es apasionante. El conocimiento de los mecanismos que utilizan los organismos para controlar estos procesos sería de gran importancia a la hora de desarrollar materiales biomiméticos que se podrían diseñar con características específicas a su aplicación final. En particular es muy importante conocer los mecanismos mediante los cuales los organismos controlan la precipitación y formación de biominerales de carbonato cálcico para formar materiales tan sofisticados como las conchas de moluscos, cocolitos, otolitos, cascarones de huevo etc. En estos procesos de biomineralización existen proteínas específicas y otros componentes orgánicos e inorgánicos que regulan la formación de los tejidos mineralizados. En particular, las proteínas juegan un papel muy importante en los procesos de regulación de la formación de la fase mineral, regulando las diferentes etapas de formación del biomineral desde su nucleación, selección de la fase polimórfica, morfología y orientación de los cristales. A fin de explicar la interacción entre proteínas y minerales se han propuesto algunos mecanismos, entre ellos, una combinación de interacciones electrostáticas y estereoquímicas, que implican un reconocimiento molecular entre las proteínas y la superficie mineral. Sin embargo, no se conocen los mecanismos precisos de interacción entre las proteínas y los minerales durante el proceso de precipitación debido a la complejidad y dinamismo de este tipo de procesos. Es especialmente interesante el estudio de los mecanismos mediante los cuales los organismos controlan y seleccionan una determinada fase polimórfica incluso fuera de su campo de estabilidad termodinámico. Por ejemplo, dependiendo de las condiciones

fisicoquímicas del sistema, el carbonato cálcico puede precipitar en forma de diferentes fases minerales: calcita, aragonito, vaterita, $\text{CaCO}_3\text{-H}_2\text{O}$, $\text{CaCO}_3\text{-6H}_2\text{O}$ y $\text{CaCO}_3\text{-amorfo}$. De todas estas fases la calcita y el aragonito son los polimorfos termodinámicamente más estables y los más ampliamente distribuidos en estructuras biominerales. De ahí que existe una rabiosa necesidad por entender los mecanismos que controlan la precipitación polimórfica del CaCO_3 en los diferentes escenarios donde se presenta y muy en particular durante los procesos de biomineralización, objetivo principal en este trabajo de tesis.

En particular, en este trabajo se estudiarán los mecanismos que controlan la formación de la cáscara de huevo, un sistema modelo de biomineralización de carbonato cálcico y que se ha elegido por ser relativamente simple. Durante el proceso de formación de la cáscara de huevo, los cristales de carbonato cálcico que la conforman precipitan a partir del fluido uterino. Este fluido es una disolución de composición muy compleja, que varía durante las diferentes etapas del proceso de deposición de la cáscara, expresándose en cada etapa determinados componentes específicos. Algunos de estos componentes se ha demostrado que son especialmente activos y específicos del proceso de formación de la cáscara y se piensa que regulan la precipitación del carbonato cálcico. Asimismo, en las diferentes etapas de formación de la cáscara la velocidad de mineralización varía. En una fase inicial se debe de promover la nucleación de calcita, posteriormente en la etapa de crecimiento rápido se debe de promover el crecimiento de los cristales y en la etapa terminal, se debe de inhibir la precipitación del carbonato cálcico. Sin embargo, no se conocen con exactitud de los mecanismos responsables de la iniciación o el cese del crecimiento de la cáscara de huevo. Para una caracterización completa del papel que juegan las proteínas en la regulación del crecimiento de la cáscara, se necesitaría estudiar en detalle su efecto sobre la nucleación, selección de fases polimórficas, alteración de los mecanismos de crecimiento y modificación de la morfología y tamaño de los cristales de carbonato cálcico y este será uno de los objetivos principales a desarrollar en este trabajo de tesis. Para ello, con esta tesis se pretende desarrollar un método de precipitación de carbonato cálcico basado en una técnica de difusión de vapor en gota sedente. Este método se utilizará para llevar a cabo estudios de precipitación con carbonato cálcico que permitan comprender mejor los procesos de biomineralización y en particular los mecanismos de interacción de proteínas y minerales durante la formación de la cáscara de

huevo de gallina. Un requisito fundamental de este tipo de métodos de cristalización es que debe de minimizar el gasto de proteína, ya que este material biológico “es *un bien preciado*” muy difícil de obtener en suficiente cantidad para llevar a cabo este tipo de estudios.

Objetivos generales

Entender el papel de las proteínas en los procesos que controlan la formación de la cáscara de huevo. Para ello se van a desarrollar los siguientes objetivos concretos.

Objetivos concretos

Objetivo 1. Desarrollo de micrométodos de cristalización adecuados para estudios de biomineralización *in vitro*. Estos métodos deben permitir medir los principales parámetros del proceso de cristalización como son: el número de cristales, fases polimórficas, tamaño y morfología de los cristales. Además estos métodos deben usar una cantidad mínima de proteína (del orden de microgramos), en un volumen muy pequeño de solución (del orden de microlitros).

Objetivo 2. Selección de un método de cristalización y su puesta a punto y búsqueda de las condiciones óptimas de cristalización del carbonato calcio que permitan llevar a cabo estudios de biomineralización *in vitro* y caracterizar los principales parámetros del proceso de cristalización.

Objetivo 3. Aplicar el micrométodo caracterizado para estudiar la interacción entre proteínas modelo y minerales de carbonato cálcico durante el proceso de precipitación. Para ello, determinaremos la influencia de las proteínas en los principales parámetros de cristalización (p. ej., flujo de nucleación, selección polimórfica, tamaño y morfología de los cristales).

Objetivo 4. Uso de la cáscara de huevo de gallina como modelo simple de biomineralización de carbonato cálcico y de la interacción entre minerales y proteínas. Para ello se estudiará la influencia de proteínas involucradas en el proceso de formación de la cáscara de huevo en la precipitación de carbonato calcio en experimentos *in vitro*

para determinar que proteínas son activas y determinar el papel que juegan en la regulación de este proceso.

Objetivo 5. Como primera aproximación, se estudiará el efecto de las proteínas en la regulación de la mineralización de la cáscara del huevo para lo cual se seleccionaran proteínas comerciales extraídas de la clara de huevo y que se encuentran presentes en este biomaterial. Para esta caracterización, se analizará la influencia de estas proteínas sobre el proceso de precipitación de carbonato cálcico en experimentos *in vitro* y en particular sobre los parámetros de cristalización más importantes.

Objetivo 6. Se estudiará el efecto de extractos purificados de la matriz orgánica de la cáscara de huevo sobre el proceso de precipitación del carbonato cálcico y en particular sobre el proceso de nucleación, selección polimórfica y morfología de los cristales. Esta información será de gran utilidad para identificar que componentes orgánicos participan de forma activa en la mineralización de la cáscara. Así mismo esta información nos puede ayudar a determinar la función que desempeñan estos componentes en la regulación de este proceso.

Objetivo 7. Como una aproximación más realista al sistema biológico, se analizará la influencia del fluido uterino en el proceso de precipitación del carbonato calcio. Además, para entender qué componentes determinan las diferentes etapas de formación de la cáscara de huevo se estudiará la influencia de muestras de fluidos uterinos recolectados en las diferentes etapas de formación de la cáscara en los diferentes parámetros de cristalización de carbonato cálcico.

Objetivo 8. Se comparará el efecto de disoluciones que contengan macromoléculas relacionadas con el proceso de formación de la cáscara de huevo con diferentes grados de complejidad: a) proteínas comerciales de la clara de huevo; b) extractos de proteínas purificadas a partir de la matriz orgánica de la cáscara de huevo; c) fluido uterino recolectado en las tres principales fases de formación de la cáscara de huevo.

BIBLIOGRAFIA

- Addadi L. and Weiner S. (1992) Control and design principles in biological mineralization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 153–169.
- Addadi L. and Weiner S. (1989) in: Mann S., Webb J. Williams R.J.P. *Biom mineralization. Chemical and Biochemical Perspectives.* VCH Verlagsgesellschaft. P. 135.
- Addadi L. and Weiner S. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 82, 4110-4114.
- Amorós J.L. (1990). *El cristal. Morfología, estructura y propiedades físicas.* 4ª Ed. Ampliada. Ediciones Atlas. P 491-494.
- Arias J.L., Fink D.J., Xiao S.Q., Heuer A.H., Caplan A.I. “Biom mineralization and eggshells: cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix,” *Int. Rev. Cytol.* 145, 217–250 (1993).
- Arias, J.L., Carrino, D.A., Fernández, M.S., Rodríguez, J.P., Dennis, J.E., Caplan, A.I. (1992). Partial biochemical and immunochemical characterization of avian eggshell extracellular matrices. *Archiv. Biochem. Biophys.* 298: 293-302.
- Arias, J.L., Cataldo, M., Fernández, M.S., Kessi, E. (1997b). Effect of beta-aminopropionitrile on the eggshell mineralisation. *Br. Poultry Sci.* 38: 351-356.
- Arias, J.L., Fernández, M.S. (1993). Molecular control of avian eggshell biom mineralization. *Proc. 5th Europ. Symp. Egg Quality & Egg Products, France*, pp.116-126.
- Arias, J.L., Nakamura, O., Fernández, M.S., Wu, J.J., Knigge, P., Eyre, D.R., Caplan, A. I. (1997a). Role of type X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes. *Connect. Tiss. Res.* 36:21-33.
- Arias, J.L., Nakaruma, O., Fernandez, M.S., Wu, J.J., Knigge, P., Eyre, D.R. Role of type-X collagen on experimental mineralization of eggshell membranes, *Connect. Tissue Res.* 36 (1997) 21–31. 559 *Y. Nys et al. / C. R. Palevol* 3 (2004) 549–562.

- Belcher, A.M., Wu X.H., Christensen R.J., Hansma P.K., Stucky G.D., Morse D.E. (1996) Control of crystal phase switching and orientation by soluble mollusc-shell proteins. *Nature* 381:56–58.
- Bevan, D.J.M., Rossmann E., Mylrea D.K., Ness S.E. Taylor M.R. and Cuff C. (2002). On the structure of aragonite-Lawrence Bragg revisited. *Acta Cryst. B*58, 448-456.
- Buckley, H.E. (1951). *Crystal Growth*. John Wiley and Sons, New York.
- Burley, R.W., Vadehra, D.V. (1989). *The avian egg chemistry and biology*. John Wiley & Sons, Inc.
- Chernov, A.A. “*Crystal Growth. Modern Crystallography*”, Springer Verlag, New York, (1984).
- Cooke, A. S., Balch, D.A. (1970). The distribution and carbohydrate composition of the organic matrix in hen eggshell. *Br. Poultry Sci.* 11: 345-352.
- Crossley C. J. (1982). *Fisiología del oviducto aviar. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol.4 (2)*.
- Cusack M., Fraser A.C., Stachelc T. (2003). Magnesium and phosphorus distribution in the avian eggshell *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 134 63–69
- Elwell S.D., Scheel H.J.: *Crystal Growth from High-Temperature Solutions* (Acad. Press, London 1975).
- Falini y col. 1995; G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi (1996). Control of Aragonite or Calcite Polymorphism by Mollusk Shell Macromolecules. *Science*. Vol 271, 67-69.
- Fernandez M.S., Escobar C., Lavelin I., Pines M., Arias J.L. Localization of osteopontin in oviduct tissue and eggshell during different stages of the avian egg laying cycle, *J. Struct. Biol.* 143 (2003) 171–180.

- Fernandez M.S., Moya A., Lopez L., Arias J.L., “Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation,” *Matrix Biol.*, 19, 793- 803 (2001).
- Fernández, M. S., Arias, J.L. (2000) La cáscara del huevo: Un modelo de biomineralización. Monografías de Medicina Veterinaria, Vol. 20(2).
- Fernández, M.S., Araya, M., Arias, J.L. (1997). Eggshell are shaped by a precise spatio-temporal of sequentially deposited macromolecules. *Matrix Biol.* 16: 13-20.
- García-Ruiz J. M., Amorós J. L. (1980). Sobre la precipitación polimórfica del carbonato cálcico. *Estudios geol.* 36. 193-200.
- García-Ruiz J.M., Rodríguez-Navarro A., (1994). Competitive Crystal Growth: The avian eggshell model, in: D.Allemand, J.-P. Cuif (Eds.), *Biom mineralization 93*, Musée Oceanographique de Monaco, pp. 85–94.
- García-Ruiz, J. M., (2003). Counterdiffusion methods for macromolecular crystallization. *Methods Enzymol.* 368, 130-154.
- Gautron J., Hincke M.T., Mann K., Panhéleux M., Bain M., McKee M.D., Solomon S.E., Nys Y. (2001). Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein: Isolation, amino acid sequencing, cloning and immunocytochemical localization, *J. Biol. Chem.* 276, 39243–39252.
- Gautron J., Hincke M.T., Nys Y. (1997) Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens, *Connect. Tissue Res.* 36, 195–210.
- Gautron J., Hincke M.T., Nys Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens, *Connect. Tissue Res.* 36, 195–210.

- Gautron J., Hincke M.T., Panhéleux M., Garcia-Ruiz J.M., Boldicke T., Nys Y. (2001). Ovotransferrin is a matrix protein of the hen eggshell membranes and basal calcified layer, *Connect. Tissue Res.* 42, 255–267.
- Gay and Mueller W. J. (1973). Cellular localization of carbonic anhydrase in avian tissues by labeled inhibitor autoradiography. *J. Histochem. Cytochem.* 21: 693-702.
- Hernández-Hernández A., Vidal M.L., Gomez-Morales J., Rodriguez-Navarro A.B., Labas V., Gautron J., Nys Y., Garcia-Ruiz J.M. (2008). “Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃),” *J. Cryst. Growth* 310, 1754–1759.
- Hincke M.T. (1995). Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix, *Connect. Tissue Res.* 31, 227–233.
- Hincke M.T., Gautron J., Panhéleux M., Garcia-Ruiz J.M., McKee M.D., Nys Y. (2000). Identification and localization of lysozyme as a component of the eggshell membranes and shell matrix, *Mater. Biol.* 19, 443–453.
- Hincke M.T., Tsang C.P.W., Courtney M., Hill V., Narbaitz R. (1995). Purification and Immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin-17), *Calcif. Tissue Int.* 56, 578–583.
- Hincke, M. St Maurice, Phosphorylation-dependent modulation of calcium carbonate precipitation by eggshell matrix proteins, *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*, in: Proc. 6th Int. Conf. Vittel, France, Am. Ac. Orthop. Surg. Ed, 1998, pp. 13–17.
- Hurwitz S., Bar A. and Clarkson T. W. (1970). Intestinal Absorption of Sodium and Potassium in the Laying Fowl *Journal of Nutrition* Vol. 100 No. 10 pp. 1181-1187.
- Lippman, F. (1973) *Sedimentary Carbonate Minerals*. En: *Mineral, Rocks and Inorganic materials*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg New York. 228 pp.

Lowenstam H. and Weiner S. (1981). Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126-1131.

Lowenstam H. and Weiner S. (1989). *On Biomineralization*. Oxford University Press.

Mann K., Gautron J., Nys Y., McKee M.D., Bajari T., Schneider W.J., Hincke M.T. (2003). Disulfide-linked heterodimeric clusterin is a component of the chicken eggshell matrix and egg white, *Matrix Biol.* 22, 397–407.

Mann S. (2001). *Biomineralization Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry*. Oxford Chemistry Masters.

Mann S., Webb J. Williams R.J.P. (1989). *Biomineralization. Chemical and Biochemical Perspectives*. VCH Verlagsgesellschaft.

Mann, K.; Macek, B.; Olsen, J. V. 2006. Proteomic analysis of the acid-soluble organic matrix of the chicken calcified eggshell layer. *Proteomics* 6, 3801–3810.

Mathews Christopher K.; Van Holde K. E.; Ahern Kevin G. (2002). *Bioquímica*, 3rd. Edition. Pp. 144.

Mathews Christopher K.; Van Holde K. E.; Ahern Kevin G. (2002). *Bioquímica*, 3rd. Edition. Pp. 217.

Mullin J. W., Söhnel O. (1977). Expressions of supersaturation in crystallization studies: systems containing hydrates, *Chem. Eng. Sci.*, 1535.

Mullin J. W. (1993). *Crystallization*. Butterworth-Heinemann, London.

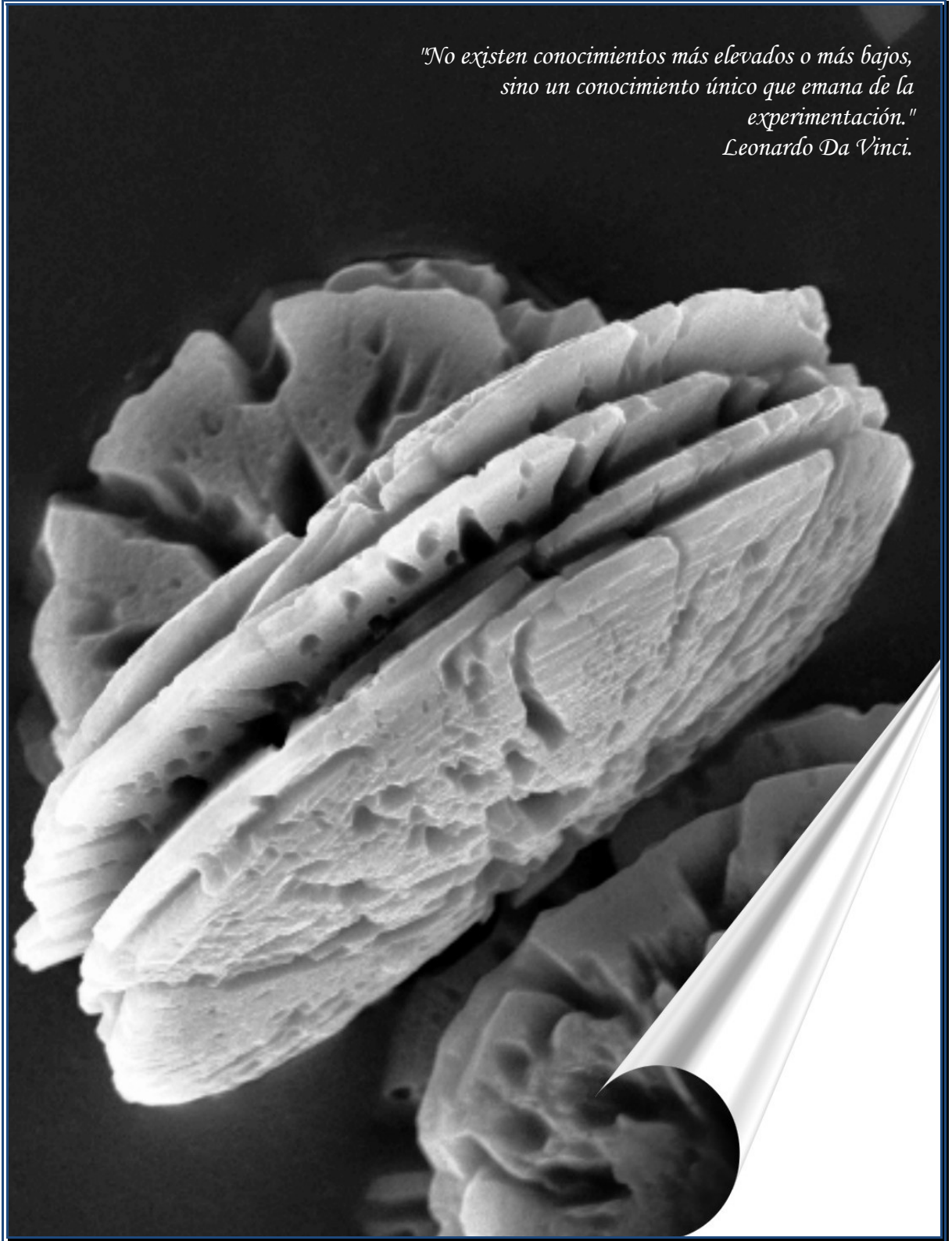
Nielsen A.E. (1984). *Journal of Crystal Growth*, 67, 289.

Nielsen A.E. y Christoffersen, J. (1982). The mechanisms of crystal growth and dissolution. En: *Biological Mineralization and Demineralization* (ed. G.H. Nancollas), *Life Science Research Report* 23, Springer-Verlag, 37-77.

- Nudelman, F., Gotliv, B.M., Addadi, L., Weiner, S. (2005). Mollusk shell formation: Mapping the distribution of organic matrix components underlying a single aragonitic tablet in nacre. *J. Struct. Biol.* 162, 290-300.
- Nys Y., Gautron J., Garcia-Ruiz J.M., Hincke M.T., (2004). “Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins,” *Comptes Rendus Palevol*, 3, 549-562.
- Nys Y., Hincke M.T., Arias J.L., Garcia-Ruiz J.M., Solomon S.E., “Avian eggshell mineralization,” *Avian Poultry Biol. Rev.* 10, 143–166 (1999).
- Nys Y., La coquille d’oeuf : un biomatériau composite, *Pour la Science* 289 (2001) 48–54.
- Nys, Y., Hincke, M.T., Arias, J.L., GraciaRuíz, J.M., Solomon, S.E. (1999). Avian eggshell mineralization. *Poultry Avian Biol. Rev.* 10: 143-166.
- Ogino T., Suzuki T., and Sawada K. (1987) “The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water,” *Geochim. Cosmochim. Acta* 51, 2757–2767.
- Pág. <http://www.agroconnection.com.ar/secciones/avicultura/S001A00161>.
- Pág. A) <http://www.mindat.org/show.php?name=calcite>;
B) <http://www.mindat.org/show.php?name=aragonite>;
C) <http://www.mindat.org/show.php?name=Vaterite>.
- Pág. http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_simple/0,1420,SCID%253D18367%2526ISID%253D452%2526PRT%253D18364,00.html
- Pines M., Knopov V., Bar A. Involvement of osteopontin in eggshell formation in the laying chicken, *Matrix Biol.* 14 (1995) 765–771.
- Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham (1999). *Biochemistry*, 2nd Edition. Pp. 83.

- Reginald H. Garrett, Charles M. Grisham (1999). *Biochemistry*, 2nd Edition. Pp. 89.
- Rodriguez-Navarro A., Garcia-Ruiz J.M. (1999). "Model of textural development of layered crystal aggregates," *Eur. J. Mineral.*, 12, 609-614.
- Rodriguez-Navarro, A., Jimenez-Lopez, C., Garcia-Ruiz, J.M., Messier, R. (2000) Importance of electrostatic interactions between calcite surfaces and proteins. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 599, 353- 359.
- Simkiss, K., Taylor, T.G. (1971). Shell formation. In: *physiology and biochemistry of the domestic fowl*. (D.J. Bell, B.M. Freeman, eds.), Acad. Press, London, Vol. 3: 1331-1343.
- Sunagawa I. (1982). *Estudios Geológicos* 38, 127.
- Sunagawa I. (1987) *Morphology of crystals*. Tokyo, Terra Scientific Publishing Company.
- Wang X., Ford B.C., Prau C.A., Leach R.M. Collagen X Expression in oviduct tissue during the different stages of the egg laying cycle, *Poult. Sci.* 81 (2002) 805–808.
- Weiner, S. y Dove, P. M. (2003). An overview of biomineralization processes and the problem of vital effect. En Dove, P. M., De Yoreo, J. J. & Weiner, S. (eds), *Biomineralization*. The Mineralogical Society of America, Washington, pp. 1-29.
- Wong M.M., Hendrix J.C., Von der Mark, K. Little, C. Stern, R. (1984). Collagen in the eggshell membranes of the hen, *Dev. Biol.* 104, 28–36.
- Y. Nys, J. Gautron, M. D. McKee, J. M. Garcia-Ruiz and M. T. Hincke (2001). Biochemical and functional characterisation of eggshell matrix proteins in hens. *World's Poultry Science Journal*, 57, pp 401-413.

*"No existen conocimientos más elevados o más bajos,
sino un conocimiento único que emana de la
experimentación."
Leonardo Da Vinci.*



2. MATERIAL Y METODOS

En este capítulo, se describen los materiales y métodos utilizados para estudiar los procesos de precipitación de carbonato cálcico en presencia de diferentes componentes orgánicos de interés. Para los estudios de precipitación de carbonato cálcico se utilizó un dispositivo de cristalización basado en la técnica de difusión de vapor en gota sedente. Tanto los fundamentos de este tipo de métodos como las características del dispositivo utilizado se describen en este capítulo. Asimismo, se describe en detalle los componentes orgánicos y cómo se obtuvieron, así como las técnicas empleadas para la caracterización de los cristales obtenidos.

2.1. REACTIVOS QUIMICOS

Para los experimentos de precipitación de carbonato cálcico se prepararon disoluciones a partir de reactivos grado analítico de: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, número de lote 110K0226, con un grado de pureza del 99 % y NH_4HCO_3 lote N° 71K0120, con un grado de pureza del 99 %, de la casa comercial Sigma-Aldrich. Para la preparación de las disoluciones se utilizó agua Milli-Q obtenida a partir de un equipo Millipore Modelo Elix 3. A partir de disoluciones madre de CaCl_2 0.2 M y de NH_4HCO_3 0.05 mM se prepararon las diluciones correspondientes para cada experimento con concentraciones de 10, 20, 50, 100, 200 o 500 mM (de CaCl_2) y 2.5, 5, 10, 15 o 25 mM (de NH_4HCO_3). Una vez preparadas las disoluciones y antes de ser utilizadas, se filtraron usando Jeringas de 10 ml y Filtros Millex-HV de Millipore, con tamaño de corte de 0.45 μm y 25 mm de diámetro. Para cada nuevo experimento se prepararon reactivos frescos.

2.2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Una vez estandarizado y caracterizado exhaustivamente el sistema de cristalización con disoluciones puras, se realizaron los experimentos de precipitación de carbonato cálcico en presencia de proteínas y extractos orgánicos que permitiesen evaluar la validez del método escogido para estudiar procesos de biomineralización de carbonato cálcico. Para ello se utilizaron en primer lugar proteínas comerciales con algunas características comunes que permitiesen hacer estudios comparativos. En particular, se seleccionaron cuatro proteínas, que en otros estudios se refieren como proteínas modelo, y que están ampliamente caracterizadas como veremos posteriormente. Las proteínas utilizadas en su forma liofilizada son: *Lisozima* purificada de clara de huevo de gallina (HEWL^{*}) obtenida de la casa comercial Seikagaku con número de Lote E98301; *Ribonucleasa-A* extraída y purificada de páncreas de bovino, con número de Lote 9001 99 4; *Mioglobina* extraída y purificada de musculo esquelético de caballo, número de Lote 100684 32 0 y α -*Lactoalbúmina* purificada de leche de bovino con número de Lote 9051 29 0. Las tres últimas proteínas se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich. Para estudios adicionales se utilizaron también otras proteínas presentes en la cáscara de huevo de gallina tales como la *Ovoalbumina* con número de Lote 93H7105; y la *Ovotransferrina tipo I* con número de Lote 107F8020, extraídas y purificadas de la clara de huevo de gallina, de la casa comercial Sigma-Aldrich. Las propiedades fundamentales y funciones biológicas de las proteínas utilizadas se describen a continuación:

2.2.1. Proteínas comerciales

Lisozima (E.C.[†]. 3.2.1.17)

Las lisozimas son un grupo de proteínas también conocidas como antibióticos naturales. Están ampliamente distribuidas en plantas, animales y bacteriófagos. También es posible encontrarla en secreciones corporales de mamíferos tales como saliva,

* HEWL del ingles Hen Egg White Lysozyme

† E.C. nomenclatura para la clasificación de enzimas según la IUBMB según la reacción que catalizan.

lágrimas, leche, moco cervical y algunos tejidos como en los leucocitos, riñones, etc. La lisozima de clara de huevo de gallina es la más estudiada. La lisozima también conocida como muramidasa o N-acetilmurámico hidrolasa, es una enzima con actividad de muramidasa, ya que hidroliza preferentemente las uniones glucosídicas [beta]-1,4 entre N-ácido acetyl murámico y N-ácido acetyl glucosamina, la cual esta en el mucopéptido de la estructura de la pared celular de ciertos microorganismos. Por otra parte, existen evidencias de que participa en la calcificación del cartílago en humanos. Desde hace más de 40 años se ha estudiado ampliamente por su interés como antibiótico natural y como ayudante para el diagnóstico de enfermedades. Es una proteína globular de 14 313 Daltons (Da[‡]) de masa molecular, un pI[§] de 9.32 (valor teórico), consta de 129 residuos de aminoácidos, su pH óptimo de actividad es de 9.2 (Mathews et al 2002; <http://www.worthington-biochem.com/LY/default.html>).

Ribonucleasa A (EC: 3.1.27.5)

La Ribonucleasa-A de páncreas de bovino, es una enzima que cataliza la hidrólisis del ácido ribonucleico. Esta reacción la lleva a cabo en dos pasos: en el primero se forma nucleótido 2',3' cíclico y en el segundo paso este intermedio es hidrolizado lentamente para dar un nucleótido 3'. La Ribonucleasa A es una proteína globular de 13 690 Da de masa molecular y consta de 124 aminoácidos, un pI (teórico) de 8.64 y posee cuatro puentes disulfuros en sus posiciones: 26-84, 40-95, 58-110 y 65-72. Su pH óptimo de actividad esta entre pH 7.0 y 7.5. (Leonidas et al., 1997; Kalnitsky et al., 1959).

Mioglobina

La mioglobina es una hemoproteína monomérica que se encuentra principalmente en el tejido muscular de los animales vertebrados, el cual sirve como sitio de

[‡] Da es la unidad de peso molecular y 1Da equivale a 1 gr/mol

[§] Punto isoeléctrico de una proteínas el pH al que la carga promedio para todas las formas de la molécula es cero.

almacenamiento intracelular de oxígeno. Esta proteína es importante a nivel fisiológico por la habilidad que tiene de unir y transportar moléculas de oxígeno. La mioglobina pertenece a la familia de las hemoproteínas por contener un grupo prostético hemo, el cual consiste de un anillo tetrapirrólico con un átomo de hierro en el centro. Normalmente este átomo de hierro se encuentra en estado de oxidación ferroso (Fe^{+2}), su oxidación a estado férrico (Fe^{+3}) la hace incapaz de unir moléculas de oxígeno. La Mioglobina es una proteína globular de 16 951 Da de masa molecular, consta de 153 aminoácidos y tiene un pI (teórico) de 7.36 (Maurus, R. et al., 1997).

α -Lactoalbumina (EC: 2.4.1.22)

La α -Lactoalbumina es una proteína globular que se sintetiza en la glándula mamaria. Su función es la de promover la conversión de galactosil transferasa a lactosa sintasa y es esencial para la producción de la leche. La α -Lactoalbumina es una metaloproteína por contener calcio en su estructura, tiene la habilidad de unir Ca^{+2} y otros metales divalentes. Esta proteína tiene una masa molecular de 14 186 Da, consta de 142 residuos de aminoácidos y tiene un pI (teórico) de 4.8. En términos de secuencia primaria y estructura, la α -Lactoalbumina y la Lisozima C son muy similares y probablemente evolucionaron de una proteína ancestral común. (Ren, J., et al., 1993).

Ovoalbúmina

La ovoalbumina, es una de las primeras proteínas que se purificaron y constituye más de la mitad en peso de las proteínas de la clara de huevo (Hofmeister 1889 en Craig D. Reg R. 2002), contribuye en las propiedades funcionales de la clara del huevo (Mine et al., 1991 en Craig D. y Reg R. 2002). La ovoalbúmina, se ha convertido en una proteína de referencia en el área bioquímica y ha sido objeto de estudios físico-químicos y es ampliamente usada como proteína modelo. A pesar de que en los últimos años se han realizado numerosos trabajos sobre esta proteína, aún se desconoce gran parte de su papel biológico en el huevo. No obstante se cree que en su forma desfosforilada sirve como

fuelle de aminoácidos para el desarrollo del embrión (Craig D. y Reg R. 2002). La ovoalbúmina se encuentra en la matriz orgánica de la cascara de huevo. En particular, estudios inmunohistoquímicos revelaron su presencia en los núcleos mamilares de la cáscara descalcificada, lo que indica que esta presente durante la fase inicial de su formación. Sin embargo no queda claro si la ovoalbúmina juega un papel específico en la mineralización de la cáscara, aunque se cree que almacena y transporta iones metálicos y su alta afinidad por el Ca^{+2} sostiene este concepto. Sin embargo estudios *in vitro* han demostrado que puede afectar en la precipitación del carbonato cálcico acelerando la nucleación (Hincke M. T. 1995). La ovoalbúmina es una fosfoglicoproteína monomérica, consta de 385 residuos de aminoácidos (cerca del 50 % de estos son hidrofóbicos), tiene un peso molecular de 44500 Da y un punto isoelectrico de 4.5 (Craig D. y Reg R. 2002).

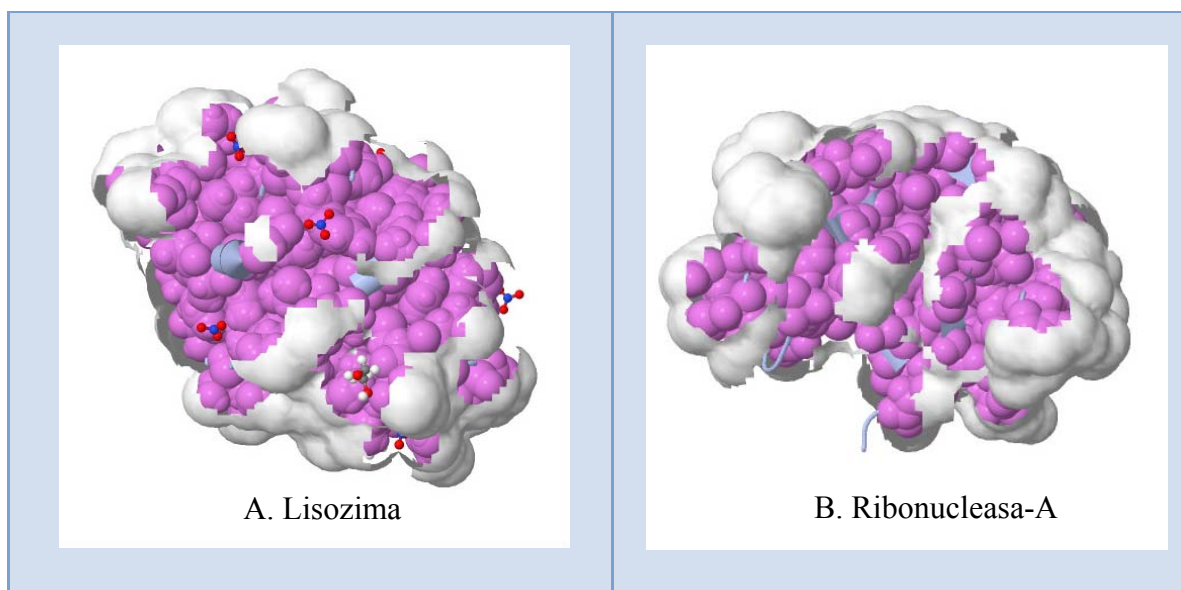
Ovotransferrina

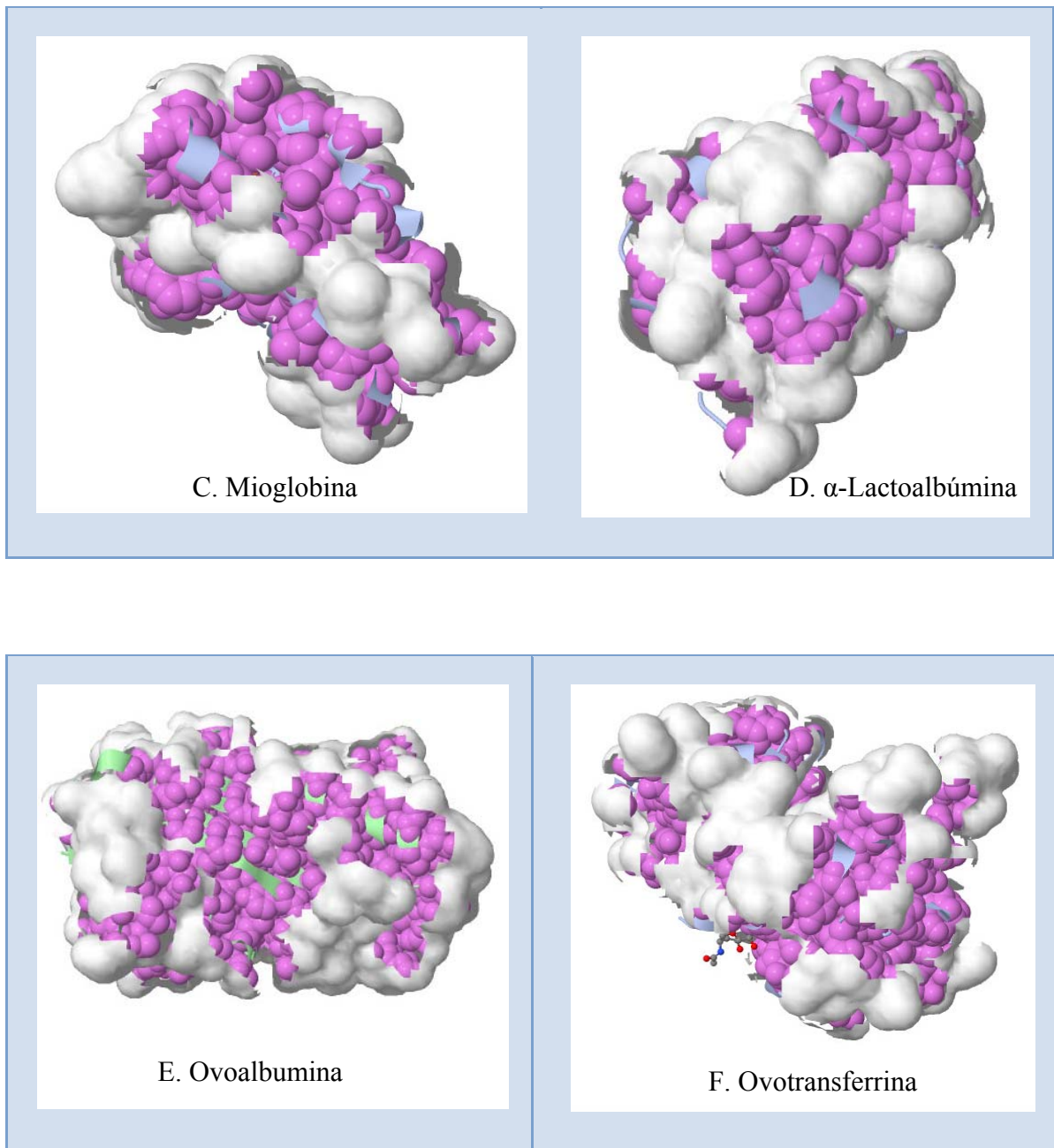
La ovotransferrina también conocida como conalbumina, constituye el 12 % de la proteína de la clara de huevo. Esta proteína está implicada en la transferencia de iones férricos desde el oviducto de la gallina hasta el embrión en desarrollo. Es capaz de unir con alta afinidad dos iones Fe^{+3} por molécula, liberándolo a la célula huésped mediante receptores específicos de membrana (Mason et al 1996). También existen evidencias de su efecto antimicrobiano y antiviral (Valenti et al., 1987 en Huopalahti R., et al., 2007; O. Wellman-Labadie et al., 2007; Giansanti F. et al., 2002). Además tiene propiedades terapéuticas contra la enteritis infantil aguda (Corda et al., 1983 en Huopalahti R., et al., 2007). La ovotransferrina es una glicoproteína neutra que se sintetiza en el oviducto de la gallina y se deposita en la fracción de la albumina del huevo, tiene una masa molecular de 77 700 Da, consta de 686 residuos de aminoácidos, tiene 15 puentes disulfuro y tiene un pI alrededor de 6.1 (Craig D. y Reg R. 2002).

Algunas de las propiedades fundamentales de las proteínas anteriores se resumen en la siguiente tabla.

Tabla 2.2.1. Propiedades físico-químicas de las proteínas comerciales.

Proteínas	pI ^a teórico	Peso molecular (Da) ^b	Número total de residuos de aminoácidos	Número total de residuos cargados negativamente	Número total de residuos cargados positivamente
Lisozima de clara de huevo de gallina	9.32	14 313	129	Asp + Glu: 9	Arg + Lys: 17
Ribonucleasa-A de páncreas de bovino	8.64	13 690	124	Asp + Glu: 10	Arg + Lys: 14
Mioglobina de musculo esquelético de caballo	7.36	16 951	153	Asp + Glu: 21	Arg + Lys: 21
α -Lactalbumin de leche de bovino	4.83	16 224	142	Asp + Glu: 20	Arg + Lys: 14
Ovoalbumina de clara de huevo de gallina	4.5	45000	385		
ovotransferrina de clara de huevo de gallina	6.1	77 700	686		

^a Punto isoeléctrico.^b DaltonLa mayoría de los datos de esta tabla fueron extraídos de la página: <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>



Figuras 2.2.1. Representación de la estructura tridimensional de las diferentes proteínas comerciales: A) Lisozima (Wang, J., et al. 2007), B) Ribonucleasa A (Chatani, E. et al 2002), C) Mioglobina (Maurus, R., et al., 1998), D) α -Lactoalbúmina (Chandra, N. et al., 1998), E) Ovoalbumina (Yamasaki, M. et al., 2002) y F) Ovotransferrina (Mizutani, K. et al., 2001), obtenidas con el programa JMol. (<http://www.rcsb.org/pdb/>)

2.2.1.1. Preparación de las disoluciones de proteínas

Después de su adquisición, las proteínas se almacenaron a -4°C (en un congelador). Antes de usarse, se sacaron del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente durante unos 30 min. aproximadamente. A continuación, se pesa con una balanza analítica de alta precisión la cantidad necesaria de proteína liofilizada para preparar una disolución madre de 10 mg/mL en un tubo Eppendorf de 2 ml. Se hidrata la proteína con agua Milli-Q, se tapa el tubo y se homogeniza la disolución, sujetando el tubo entre el dedo índice y pulgar, con giros suaves de 180° . Una vez disuelta la proteína en polvo, se recupera la disolución proteica con ayuda de una jeringa de 2 ml y se pasa a través de un Filtro Millex-HV de tamaño de corte de $0.45\ \mu\text{m}$ (con baja afinidad proteica) a otro tubo Eppendorf. Finalmente, se mide la concentración final de la disolución determinando la absorbancia a 280 nm si se conoce el coeficiente de extensión molar de la proteína, o en caso contrario, se determina la concentración de proteína usando la técnica de Bradford (1976).

El método más simple para estimar el contenido de proteína de una disolución consiste en medir la absorbancia a 280 nm. A esta longitud de onda, la luz ultravioleta se absorbe por residuos aromáticos (tirosina, triptófano y cistina). Por otra parte, el método de Bradford se basa en la unión de las proteínas al colorante azul de Coomassie G-250. La forma aniónica de éste colorante forma un complejo con la proteína que hace que la disolución cambie de un color café rojizo a azul, debido a un cambio en la absorbancia de 465-595 nm. Debido a que la respuesta de color no es lineal en un rango amplio de concentraciones de proteína, se debe correr una curva estándar en cada ensayo. El colorante de Coomassie se une a la proteína con los grupos ácidos sulfónicos del colorante mediante interacción electrostática, aunque también participan en el mecanismo de unión fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas. El reactivo de Coomassie interacciona fuertemente con residuos de arginina, y débilmente con histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina. El número de ligandos del reactivo de Coomassie unidos a cada molécula de proteína es aproximadamente proporcional al

número de cargas positivas de la proteína, de manera que se unen aproximadamente de 1.5 a 3 moléculas de colorante por carga. Una vez determinada la concentración final de la disolución madre de proteína, se preparan a partir de esta las siguientes diluciones: 32, 256, 1024, 4000, y/o 10000 µg/ml. Para estudiar el efecto de la presencia de cada una de estas proteínas en la precipitación con carbonato cálcico, se mezcla (en cada micro-puente) un volumen de 20 µl de cada una de estas diluciones en con 20 µl de una disolución de cloruro cálcico 40 mM, tal como se describe más adelante en el apartado dedicado al sistema experimental de cristalización utilizado (“seta de cristalización”).

2.2.2. Proteínas de origen animal

A) Extractos de la matriz orgánica de la cáscara de huevo

Los extractos de la matriz orgánica se obtuvieron en el laboratorio del INRA^{**} por la Dra. Mary-Laure Vidal, en el marco del proyecto europeo “EggDefence”. Para la obtención de estos extractos, se utilizó el protocolo que se muestra en el diagrama de la figura 2.2.2. Los extractos orgánicos de la cáscara se obtienen a partir de 50 huevos de gallina. Una vez vaciado el contenido del huevo, los cascarones se lavan con agua desionizada, se muelen y se desmineralizan con una disolución de ácido acético al 20% durante toda una noche, a una temperatura de 4°C. La disolución resultante se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min. Posteriormente, el sobrenadante se dializó con agua desionizada y se liofilizó. El material en polvo seco resultante se guardó en un congelador.

Antes de su uso, el polvo seco y congelado se redisuelve durante toda la noche a 4 °C en un líquido de extracción (pH 4.8) con la siguiente composición: hidrocloreto de guanidina 4 M, hidrocloreto de benzamidina 0.005 M, ácido ε-amino-capróico 0.1 M, EDTA 0.01 M, acetato de sodio 0.5 M y 100 µM PMSF^{††}. Después la disolución

^{**} INRA siglas en francés l’Institut National de la Recherche Agronomique.

^{††} PMSF del inglés phenylmethanesulphonyl fluoride or phenylmethylsulphonyl fluoride

resultante se dializa contra 0.9 % NaCl y se centrifuga dos veces durante 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante resultante se concentra y se eliminan las sales por ultrafiltración (membrana de corte de 5000 Da). El extracto crudo final de la cáscara de huevo (pH 5) se almacena a -20°C . A partir de este extracto se obtienen 3 fracciones pre-purificadas: A, B y C, siguiendo los pasos que se indican en la figura 2.2.2. Las características principales de las fracciones A, B y C extraídas son las siguientes: *Fracción A* formada por proteínas solubles a pH 5, a baja fuerza iónica y proteínas solubles a pH 9.5, a baja fuerza iónica; *Fracción B* formada por proteínas solubles a pH 5 a baja fuerza iónica pero soluble a pH 9.5 a alta y baja fuerza iónica; *Fracción C* formada por proteínas insolubles a pH 5 a baja fuerza iónica pero solubles a pH 9.5 solamente a alta fuerza iónica.

Las fracciones A y B se purifican posteriormente usando técnicas de cromatografía de intercambio aniónico en una columna Vydac 300VHP575P de 7.5×50 mm, $5 \mu\text{m}$ (Vydac, Hesperia, USA). Se usan como fases móviles Dietanolamina 10 mM (DEA)/HCl, pH 9.5 (buffer A) y DEA/HCl 10 mM, 1M NaCl, pH 9.5 (buffer B), a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La elución de la proteína se realiza con un gradiente escalonado de sal desde 0 a 1 M durante 40 min (fracción A) o 27 min (fracción B). Algunas de las fracciones recolectadas se separaron mediante cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna de 0.7×2.5 cm de fenil sefariosa de alto rendimiento HiTrap Amersham column (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Para ello, se usan como fases móviles NaP 50 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.5 M, pH7 (buffer A) y NaP50 mM, pH7 (buffer B) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La elución de la proteína se realiza con un gradiente de 1.5 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante 10 min. Por último, algunas de las fracciones obtenidas mediante cromatografía de interacción hidrofóbica se enviaron a un equipo de cromatografía de filtración en gel, usando una columna de 7.5×60 cm TSK-gel G2000SW (Tosoh Bioscience, Hampton, UK). Como fase móvil se utilizó NaP 50 mM y NaCl 0.3 M, pH7, a una velocidad de flujo de 0.6 ml/min.

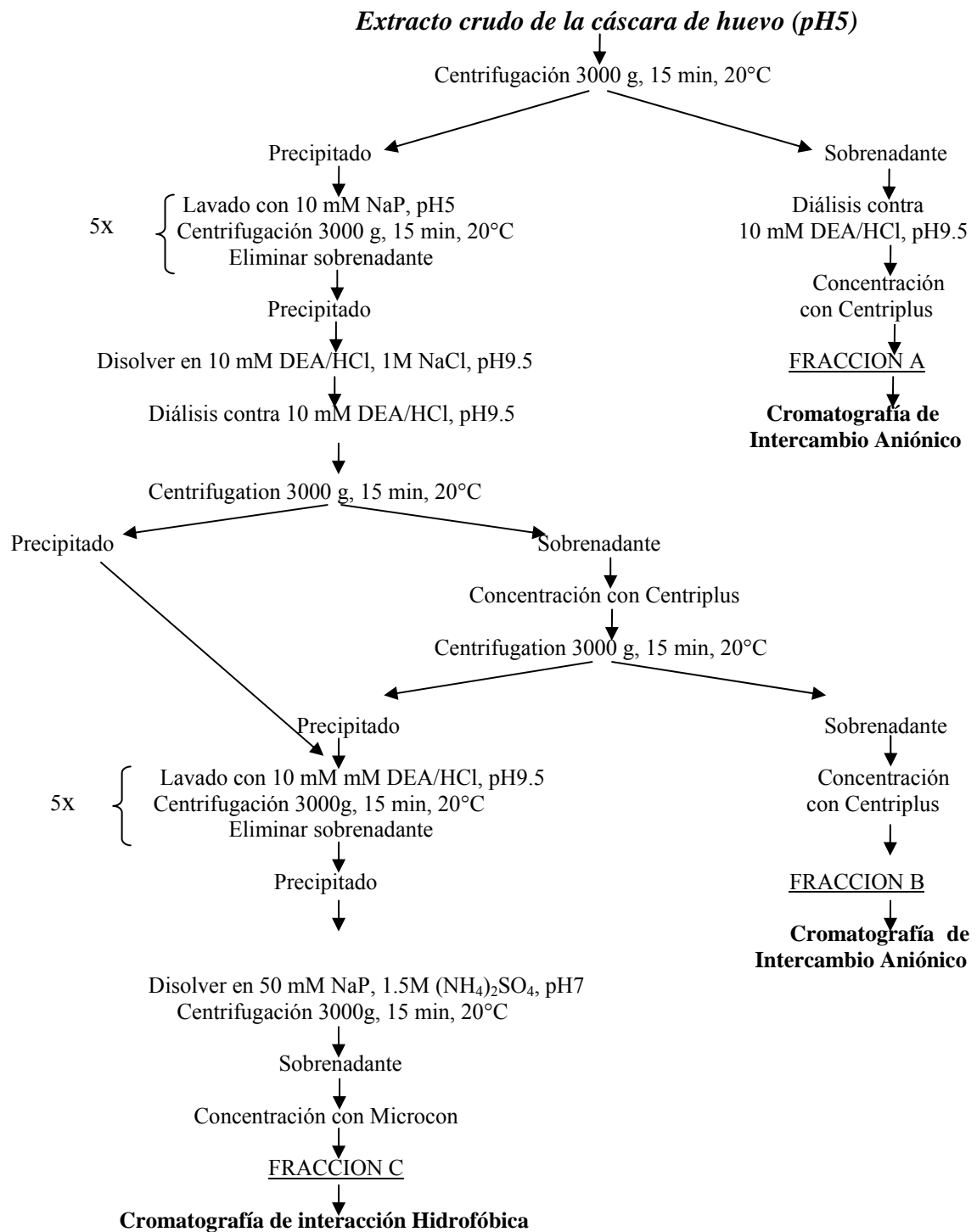


Figura 2.2.2. Preparación de las fracciones A, B y C pre-purificadas del extracto crudo de la cáscara de huevo. (Yves N. Egg Defense Final Report, 2004)

La concentración total de proteína de cada una de las fracciones obtenidas se midió mediante un ensayo en microplaca (kit Uptima UPF8640 Coo Protein Assay, Interchim, Montluçon, Francia) que se basa en el método de Bradford (1976). Se utilizó una curva de calibración con ovoalbúmina como proteína estándar. Para identificar los componentes individuales de cada una de las fracciones y calcular su peso molecular aparente, se utilizó electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE^{††} siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

De las fracciones obtenidas se seleccionaron las siguientes: g, h, n, r obtenidas a partir de FRACCION A, y c', g', i', k' obtenidas a partir de la FRACCION B. Estas nuevas fracciones se obtuvieron tras sucesivos pasos de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y cromatografía de filtración en gel. Estas fracciones purificadas se analizaron mediante electroforesis en gel con el colorante Sypro Ruby Protein (Molecular Probes, Eugene, USA), y se extrajeron para su secuenciación mediante nanocromatografía acoplada a un espectrómetro de masas (ESI/Q-TOF, Waters, Milford, USA). Los perfiles de electroforesis de las fracciones h, g, n, r y de las fracciones c', g', i', k' así como la presumible identificación de las bandas teñidas indicaron que dichas fracciones estaban formadas por varias bandas. Las bandas teñidas mas intensamente correspondieron a: h (proteínas específicas de la quiescencia y cadena A de la ovocleidina-17), g (ovotransferrina, ovomucoide, proteínas específicas de la quiescencia y ovocleidina-116), n (ovotransferrina, preproalbumina, hemopoxina, precursor de ovoinhibidor, cistatina), r (proteínas específicas de la quiescencia, cadena A de ovocleidina-17 y secuencias no-identificadas), c' (clon AGENAE no identificado, cadena A de ovocleidina-17 y precursor de lisozima C), i' (clusterina, ovocalixina-116, proteínas con repeticiones tipo EGF y proteínas que contienen dominios tipo I discoindina 3 [Homo sapiens]), k' (una mezcla de cistatina, ovocleidina-116, glipican 4, ovoalbúmina, ovocalixina-32, clusterina, ovocalixina-36, ovotransferrina y lisozima).

^{††} SDS-PAGE del inglés Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Antes de usar estas fracciones en los estudios *in vitro* sobre su efecto en la precipitación de carbonato cálcico, se ajustó su concentración a una concentración final de 50 µg/ml de proteína.

B) Fluido uterino

El siguiente paso en nuestro estudio consistió en conocer la influencia de los fluidos uterinos sobre la formación de la cáscara de huevo. Para ello se extrajeron muestras del fluido uterino a partir de gallinas ponedoras (ISA-BROWN) de las tres fases principales de formación de la cáscara de huevo. Estas son: fase inicial (I), fase de crecimiento rápido (II) y fase terminal (III). El fluido uterino se extrajo siguiendo el protocolo descrito por Gautron y col. (1997). Brevemente, las gallinas utilizadas estaban en jaulas individuales, en corrales con aire acondicionado y sin ventanas, con ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de obscuridad, y alimentadas *ad libitum* con dieta especial de gallinas ponedoras. Las jaulas disponen de un sistema computarizado para grabar con precisión el momento de la ovoposición. Transcurridas 0.5 horas de la ovoposición se considera que ocurre la ovulación. La recogida de muestras de fluido uterino se realiza induciendo la expulsión del huevo mediante la inyección de 50 µg de prostaglandina (prostaglandina F2α): entre las 6 y 9 horas (para la etapa inicial, I), entre las 14 y 18 horas (para la fase de crecimiento rápido, II) y entre las 22 y 23 horas (para la fase terminal de calcificación de la cáscara, III) tiempos medidos después de 0.5 horas de la ovoposición. A continuación, se recolecta el fluido uterino, justo después de la expulsión del huevo, en tubos Falcon que se colocan en la entrada de la vagina. Una alícuota de cada uno de estos fluidos se usó para determinar la concentración de iones calcio por espectroscopia de absorción atómica y para determinar la concentración de proteína total, por el método de Bradford, usando ovoalbúmina como estándar. Asimismo, se obtuvo el patrón electroforético SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) de las muestras de fluidos uterinos, recolectadas durante las principales etapas de formación de la cáscara (fases I, II y III). Para estos análisis se utilizaron geles con 40 µL y 20 µL de cada uno de los fluidos uterinos. Los patrones de electroforesis del fluido uterino se determinaron antes y después de los experimentos de cristalización con carbonato cálcico. Los geles se tiñeron con Sypro Ruby Protein Gel Stain. La

identificación de las bandas de cada perfil de electroforesis se obtuvo por comparación con perfiles electroforéticos obtenidos y caracterizados previamente. Para determinar la concentración relativa de las proteínas de cada banda, los geles se analizaron usando un sistema de imagen con infrarrojo (Odyssey, Licor). Por otra parte, se tomaron muestras de cáscara de huevo de las tres etapas principales de formación para estudiarlas en detalle mediante microscopia electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM) y difracción de rayos X (DXR).

2.3. METODOS DE CRISTALIZACION

Con objeto de estudiar y controlar el proceso de precipitación de carbonato cálcico se han utilizado métodos de cristalización muy diferentes. Los diferentes métodos de cristalización se diferencian en la manera en la que se consigue llevar a la disolución a un estado de sobresaturación con respecto a la fase que se quiere cristalizar. Algunos de estos métodos se basan en la mezcla directa de disoluciones precursoras (Gómez-Morales J. et al., 1996; Tracy S. L. et al. 1998; Spanos N., et al. 1998; Katsifaras A., et al. 1999; Kawano J. et al. 2002; Kanakis J. et al. 2001; Liang P. et al. 2004), técnicas de difusión y contradifusión (García-Ruiz J. M. et al. 1978, Addadi L. et al. 1985, Dietzel M. et al. 2004), carbonatación o burbujeo con CO₂ (Mann S. et al. 1990; Kato T., et al. 1998; Fiona C. et al. 2001, Gopinath C. S. et al. 2002, García C. et al, 2003) hasta técnicas que utilizan dispositivos muy sofisticados que permiten controlar y mantener constantes a lo largo del experimento parámetros como la temperatura, pH, presión de CO₂, sobresaturación, etc. (Gabrielli C., et al. 1999; Euvrard M. et al. 2000; Westin K. J., et al. 2003). Sin embargo, a pesar de todo, muchos de estos estudios ofrecen resultados contradictorios que dificultan el conocimiento exacto de los factores que controlan el proceso de precipitación de carbonato cálcico y en particular de la selección de una determinada fase polimórfica de este compuesto. El conocimiento de los mecanismos que controlan la precipitación de carbonato cálcico es especialmente relevante para entender los procesos de biomineralización, ya que muchos organismos utilizan una fase polimórfica específica de carbonato cálcico para construir estructuras funcionales muy

complejas (conchas de moluscos, cáscaras de huevo, cocolitos, etc.). Estos materiales se forman a partir de componentes orgánicos y minerales que se fabrican y autoensamblan *in situ* y en condiciones ambientales, a partir de una disolución de composición muy compleja. La presencia de los diferentes componentes afecta y regula el proceso de crecimiento de los cristales de carbonato cálcico en sistemas biológicos. Para entender como regulan estos componentes, varios investigadores han estudiado el efecto sobre la precipitación de carbonato cálcico de diferentes aditivos de composición sencilla como iones, aminoácidos (Henry H. T. et al. 1998), Tensioactivos (Mancipe, 1996), macromoléculas o polímeros como proteínas (Addadi L. et al. 1985; Takashi K. et al. 1998; Shen F.H. et al. 2002), polisacaridos (Yang Lin, et al. 2003),

Para la obtención de cristales, si se considera que no existe un compromiso entre la técnica utilizada y el coste de los reactivos es válido cualquier método de cristalización siempre y cuando se tenga, en la medida de lo posible, un perfecto control sobre la técnica utilizada. Sin embargo, para la cristalización en presencia de macromoléculas biológicas y muy concretamente de proteínas (como para el caso de la biomineralización), esta apreciación cambia debido al elevado coste para la obtención de una muestra pura de este “bien preciado” (las proteínas) en el campo de la cristalización. A diferencia de los métodos utilizados para la precipitación de compuestos inorgánicos (generalmente a escala industrial) la cristalización de macromoléculas biológicas se basa en el uso de micrométodos. Los métodos más comúnmente utilizados para la cristalización de macromoléculas biológicas son: difusión de vapor (gota colgante, gota sedente), contradifusión, mezcla directa (Batch), diálisis, difusión de libre interfase, inducción por temperatura, por siembra (Seeding) y cristalización en volumen (Bulk). (A. McPherson, 1998). En este trabajo de tesis centraremos nuestra atención en la técnica de cristalización por difusión de vapor. Con objeto de entender el proceso de precipitación de carbonato cálcico y el papel regulador de los diferentes componentes orgánicos presentes en las disoluciones biológicas precursoras se ha puesto a punto un micrométodo de cristalización basado en las técnicas de difusión de vapor en gota sedente que se describen a continuación.

2.3.1. Técnica de cristalización por difusión de vapor.

La técnica de difusión de vapor o evaporación controlada tiene tres variantes: gota sedente, gota colgante y sándwiches. Estas variantes son usadas para llevar a cabo estudios de barrido de un gran número de condiciones de cristalización experimentales en la obtención de cristales de proteínas. De estas variantes las más comúnmente utilizadas para estudios de cristalización son dos. En un caso se utiliza una gota soportada por una superficie (gota sedente) y en el otro caso la gota se encuentra suspendida en una superficie (gota colgante) ver figura 2.3.1. A y B respectivamente (McPherson, 1998).

Prácticamente todos los ensayos por difusión de vapor son llevados a cabo a microescala pudiéndose utilizar volúmenes de proteínas desde 2 a 20 μl .

En general la técnica consta de dos reservorios, uno de ellos es una gota con proteína mas disolución del agente precipitante y el segundo es un pocillo que contiene al agente precipitante al doble de concentración que la gota.

A) Método de gota sedente

En este caso, la disolución con la substancia a cristalizar se coloca, con la ayuda de una micropipeta, sobre una superficie o una pequeña depresión, por ejemplo en micropuentes de poliestireno, de forma que esta disolución queda parcialmente separada de la disolución o agente precipitante contenida en el reservorio (fig. 2.3.1. A.). Posteriormente, el borde del pocillo es engrasado (con la ayuda de una jeringa rellena con grasa de vacío) y finalmente es colocado sobre este borde un cubreobjetos de vidrio a fin de que el sistema quede completamente aislado del ambiente externo y de este modo evitar fugas del disolvente permitiendo que el transporte de agua y cualquier otro material volátil se de solo entre la gota y la disolución en el reservorio.

B) Método de gota colgante

Las gotas de disolución con proteína se colocan en un cubre objetos de vidrio siliconizado con la ayuda de una micropipeta. Posteriormente el cubreobjetos con la gota se invierte y se coloca sobre el pocillo cuyo borde previamente se ha engrasado (con

grasa de vacío) para que al colocar el cubreobjetos el sistema quede completamente aislado del ambiente externo.

Del mismo modo que en el caso anterior, el volumen de la disolución con el agente precipitante es varios órdenes de magnitud mayor que el volumen de la gota con la disolución de la sustancia a cristalizar. La gota está formada por una disolución subsaturada de proteína que es forzada a evaporar hasta que la disolución en la gota sea isotónica con el agente precipitante contenido en el reservorio de acuerdo con la ley de Raoult. El agua se evapora de la gota hacia el pocillo incrementando la concentración en la gota pudiendo alcanzar de esta forma la sobresaturación crítica para la nucleación (fig. 2.3.1. C). La disolución del agente precipitante establece el punto final deseado para alcanzar el equilibrio del proceso al final del experimento.

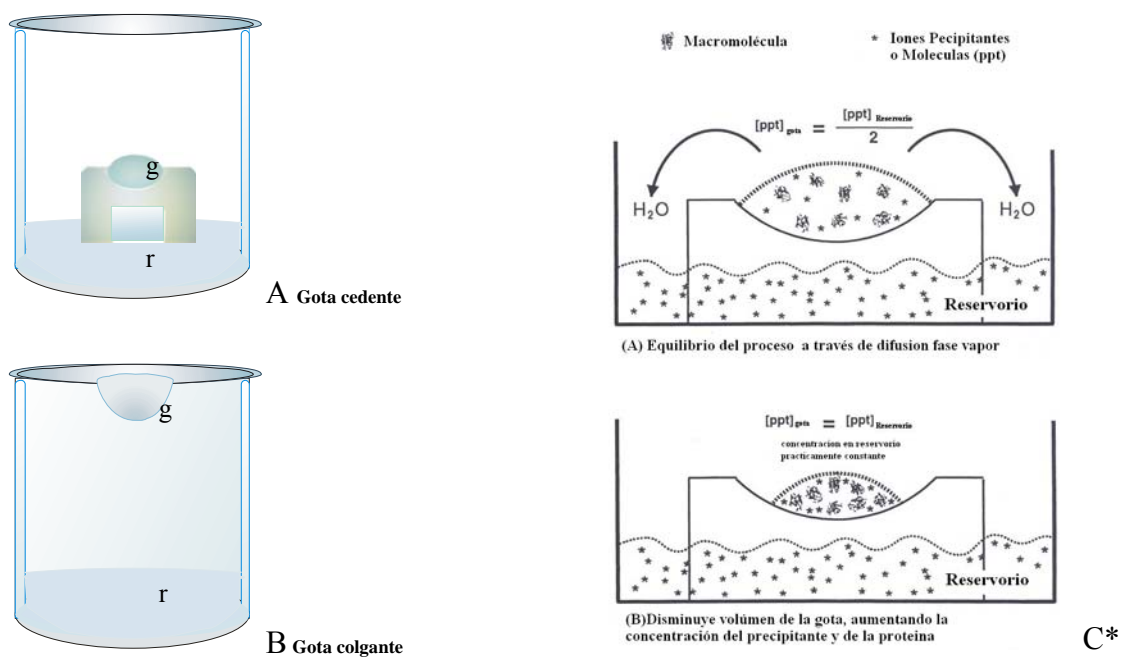


Figura 2.3.1. Técnicas de cristalización: A Gota cedente y B Gota colgante, en las cuales el sistema funciona mediante una evaporación controlada, la gota (g) formada por una disolución insaturada de proteína evapora hasta que su concentración es isotónica con la disolución contenida en el reservorio (r). La concentración de sal en la disolución del reservorio normalmente es del doble que la concentración en la gota C (A), el proceso es equilibrado a través de un mecanismo difusivo, mediante el cual disminuye el volumen de la gota incrementando la concentración tanto del precipitante como de la proteína C (B) *McPherson, 1998.

La precipitación, en este caso de la proteína tiene lugar debido a un cambio en su solubilidad como consecuencia de, por ejemplo, una variación en la fuerza iónica (por

cambio en la concentración de la sal). Por lo tanto, si se conoce el diagrama de solubilidad de la proteína en función de la concentración del agente precipitante, entonces la sobresaturación (que tan lejos está del equilibrio la disolución en la gota), se puede calcular. Sin embargo, el punto decisivo no es solamente cuan lejos esté la disolución del equilibrio si no la velocidad con la que se aleja de él. Una representación adecuada del desarrollo de experimento se puede representar con el diagrama clásico de solubilidad de Ostwald–Myers, y la trayectoria que sigue el sistema de la gota hasta alcanzar las condiciones deseadas de cristalización.

La concentración de sal en la disolución del reservorio es comúnmente el doble que la concentración en la gota. Por consiguiente, suponiendo que el volumen de la gota es mucho más pequeño que el volumen de la disolución en el reservorio, la concentración de proteína en la gota sufre un incremento del doble de su concentración inicial y el sistema se moverá siguiendo la trayectoria 0-E (Fig. 2.3.2.).

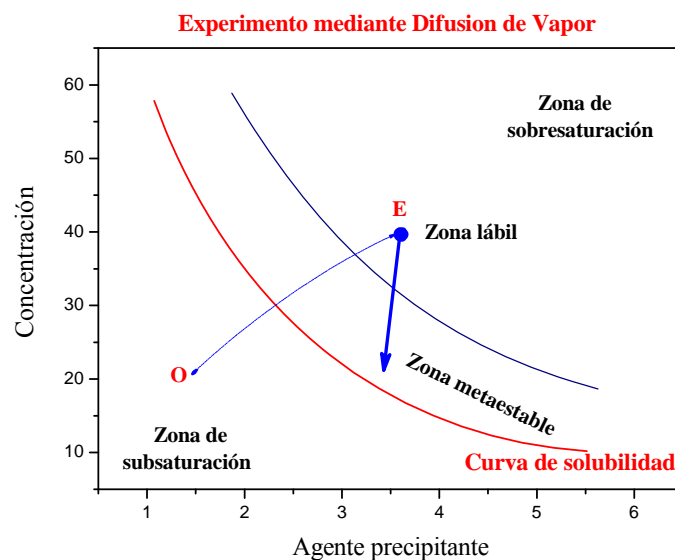


Figura 2.3.2. Diagrama de solubilidad que ilustra como funciona la técnica de difusión de vapor. La velocidad a la cual se alcanza la sobresaturación va a depender de dos parámetros principalmente: de la geometría del reactor y de la diferencia de la presión parcial de vapor como de la superficie libre relativa de la gota y de la disolución en el pocillo (García-Ruiz J.M. 2003).

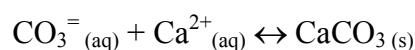
Si con el tiempo ocurre la separación de fases, significa que la curva de solubilidad pasa a través de la trayectoria 0-E. Si el tiempo de espera para que los cristales aparezcan en la gota es largo, entonces la curva de solubilidad pasaría cerca del punto final E, mientras que si el tiempo de espera es corto, pasaría cerca del punto de partida 0. En este caso el tiempo para que la concentración en la gota haga la trayectoria 0-E es diferente de cero. Se ha demostrado que la velocidad con que cambia la sobresaturación depende de la geometría del sistema, en particular del reservorio y del aspecto y proporción de la gota, además de la separación entre ellos. En realidad, el punto decisivo no solamente es cuan lejos del equilibrio se encuentre la disolución a cristalizar sino también a que velocidad se alcanza el equilibrio.

2.3.1.1. Descripción del sistema “*Seta de cristalización*”

Con objeto de entender el proceso de precipitación de carbonato cálcico y el papel regulador de los diferentes componentes orgánicos presentes en las disoluciones biológicas precursoras, se ha puesto a punto un micrométodo de cristalización basado en las técnicas de difusión de vapor en gota sedente. Este dispositivo desarrollado en nuestro laboratorio (Domínguez-Vera J. M. et al, 2000) y denominado “*seta de cristalización*” consiste en las siguientes partes: a) una placa Petri con varios micropuentes donde se pone la disolución de CaCl_2 (40 μm) y un recipiente (vaso de precipitado) con la disolución de NH_4HCO_3 (3 mL) que se usará como reactivo volátil precipitante. Ambos recipientes están unidos por un orificio de aproximadamente 6 mm de diámetro por el que puede difundir lentamente el vapor de NH_3 y CO_2 de la disolución de abajo hasta la gota (arriba). Al difundir el NH_3 se produce un incremento del pH necesario para que se produzca la precipitación de CaCO_3 al aumentar la sobresaturación de la gota. Esto es debido a que al aumentar el pH se favorece la formación de especies carbonato según la siguiente reacción de equilibrio entre especies carbonatadas:



En presencia de iones calcio en la disolución de la gota se produce la reacción de precipitación de carbonato cálcico:



El diseño de esta herramienta de cristalización permite controlar la velocidad de sobresaturación de la gota, variando las concentraciones de los reactivos (CaCl_2 y NH_4HCO_3) y es ideal para estudios de biomineralización ya que permite el uso de volúmenes muy pequeños de proteínas pero suficientes para estudios encaminados a observar el efecto de éstas sobre la precipitación del CaCO_3 (Hernández-Hernández et al. en preparación).

Este método de cristalización tiene una serie de ventajas que lo hacen idóneo para los estudios biomineralización de carbonato calcio tales como: 1) es un sistema multi-gotas que permite barrer varias condiciones en un solo experimento, 2) es reproducible y permite controlar los parámetros de precipitación tales como número y tamaño de los cristales, así como distinguir las diferentes morfologías de las fases polimórficas del carbonato cálcico, 3) es un micrométodo que permite minimizar el gasto de proteína a órdenes de microlitros (μl), 4) permite el seguimiento *in situ* de la precipitación con un microscopio óptico y así conocer el tiempo de inducción de la nucleación y 5) permite observar directamente la influencia de diferentes aditivos (por ejemplo, proteínas, substratos, u otras macromoléculas orgánicas) en la precipitación del carbonato cálcico. Previo al desarrollo de los estudios de biomineralización de carbonato cálcico se planteó la necesidad de su puesta a punto para ajustarlo a las necesidades específicas de los estudios propuestos. El material utilizado para el montaje de este dispositivo de precipitación fue cuidadosamente seleccionado a fin de incrementar la reproducibilidad de los experimentos. Para ello se fabricaron cajas Petri de vidrio Pyrex de 93 mm de diámetro y 20 mm de altura con un orificio en el centro de la base de la caja de 6 mm de diámetro. En la tabla 2.3.1. se describe en detalle el material usado en el montaje de las setas de cristalización y el protocolo de preparación del sistema para los experimentos de precipitación. Como producto de diseños previos, su puesta a punto y en vista de su buen funcionamiento la “*seta de cristalización*” es hoy en día un producto comercial.

Tabla 2.3.1. Descripción del material para el montaje de la “seta de cristalización” y protocolo de preparación de los experimentos de precipitación.

Material:
<ol style="list-style-type: none"> 1) Cristalizadores de vidrio Pyrex 50 mm de diámetro y 30 mm de altura. 2) Cajas Petri de vidrio Pyrex de 93 mm de diámetro y 20 mm de altura, con un orificio el centro de la base de 6 mm de diámetro (Fig. 2.3.3). 3) Micropuentes de poliestireno, de la casa comercial Hampton Research Co. de 14 mm de largo por 12 mm de altura y una concavidad de 6 mm de diámetro con una capacidad de hasta 40 μl de volumen. 4) Jeringas de 10 ml acondicionadas con una punta amarilla para dispensar grasa de vacío Dow Corning que se utilizara para el sellado del sistema. 5) Aire comprimido Jelt de 99.9 % de pureza para eliminar partículas de polvo de las superficies de los micro-puentes y del interior de la caja.
Protocolo del montaje del sistema:
<ol style="list-style-type: none"> 1) Se lava perfectamente el material de vidrio y se seca en la estufa. 2) Con la ayuda de la jeringa dispensadora se coloca un hilo de grasa de vacío en la base de cada micropuente. 3) Usando una plantilla^{§§} se colocan los 10 micropuentes dentro de la caja Petri de manera concéntrica, cada 36° (Fig. 2.3.4). 4) Una vez colocados los micropuentes, se eliminan las partículas de polvo que pudieran estar presentes dentro del sistema. 5) Se añaden 40 μl de la disolución a precipitar (CaCl_2 + proteína) en la concavidad de cada uno de los micropuentes. 6) Se coloca un fino y continuo hilo de grasa de vacío, en el borde de la caja Petri y se tapa. 7) Por otro lado se agregan 3 ml de disolución de NH_4HCO_3 en el cristalizador (de la parte inferior del sistema) y previamente se ha colocado un hilo fino y continuo de grasa de vacío en su borde. 8) Colocar sobre el cristalizador con la disolución de NH_4HCO_3, la caja Petri previamente preparada quedando sellado completamente el sistema. 9) Finalmente se rotula el sistema, en un borde que no impida la lectura de los micropuentes, con la siguiente información: N° de experimento, fecha y condiciones de estudio. 10) Se coloca en un sitio estable y a temperatura controlada (20 ± 2 °C) y presión constante (1 atm. ± 0.1).

^{§§} Para facilitar el montaje del sistema se construyó una plantilla de papel acetato para posicionar los micropuentes cada 36°.

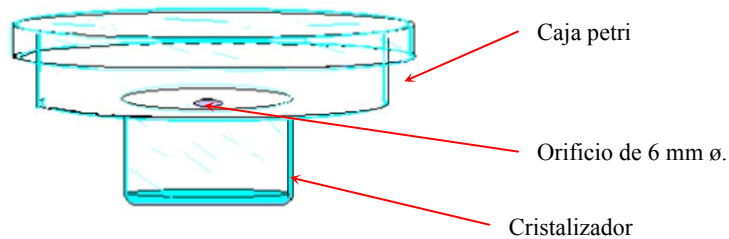


Fig. 2.3.3

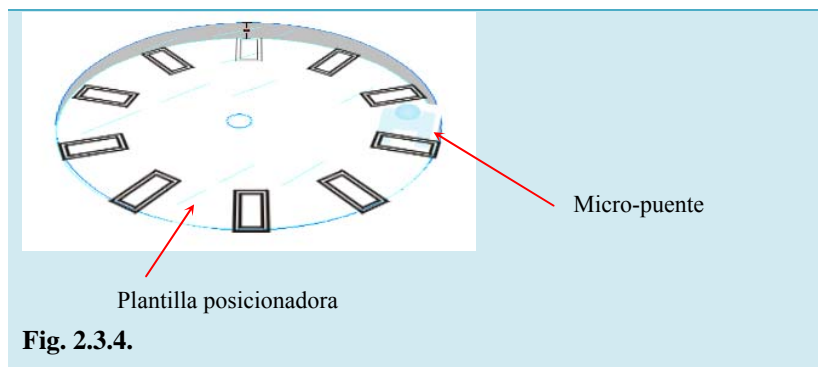


Fig. 2.3.4.

Figura 2.3.3. Esquema de las partes que componen la "seta de cristalización". La **figura 2.3.4.**, muestra el esquema de la plantilla para colocar en la base de la caja de forma equidistante los diez micropuentes de poliestireno.

Criterios aplicados y material de apoyo utilizado para la lectura de los diferentes parámetros de precipitación en los experimentos.

El recuento de los cristales se lleva a cabo por separado en tres zonas concéntricas que se diferenciaron en la gota, vista desde arriba, (Fig. 2.3.5.A). La zona A (ZA) en la parte más alta de la gota e incluye el borde y superficie de la gota en contacto con el aire, en la figura correspondería a la franja azul mas intenso. La zona B (ZB) representada por el cinturón medio de la gota, en la figura corresponde a la zona azul claro. La zona C (ZC), círculo central o base de la gota, aparece representada en la figura por la zona de color rojo.

Al mismo tiempo la gota se dividió en cuatro cuadrantes: **I**, **II**, **III** y **IV** figura 2.3.5.B, que se analizaron por separado. Esta separación es especialmente conveniente cuando el número de cristales es elevado (mayor de 100) y facilita su recuento.

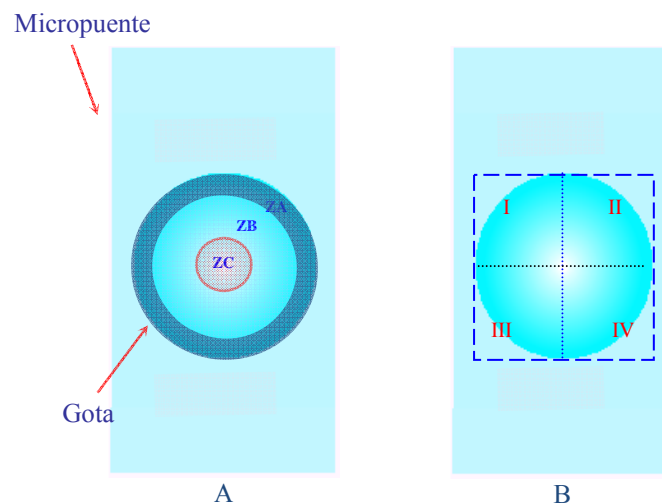


Fig. 2.3.5. **A:** Micropuente visto desde arriba indicando las tres diferentes zonas en la gota, **B:** vista de los cuatro cuadrantes.

2.4. TÉCNICAS USADAS PARA EL ESTUDIO DE LA EVOLUCION DE LOS EXPERIMENTOS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PRECIPITADOS.

2.4.1. Evolución del pH del sistema

La evolución del pH en la gota durante el transcurso de los experimentos se midió introduciendo, a través de un orificio en la pared lateral de la cámara, una sonda de pH conectada a un pH-metro (modelo Titan de Sentron). Esta sonda contiene una hendidura en la que se coloca una gota de 40 μL de la disolución de CaCl_2 .

2.4.2. Microscopía óptica

La evolución de los experimentos se siguió mediante la observación periódica del sistema con una lupa Olympus SZH y/o Leica MZ12 a una magnificación de X8 a X160; la observación se realizó en intervalos de 15, 30, y 60 min. Para evitar el calentamiento

del sistema y su influencia sobre la cinética del proceso se utilizó un filtro de infrarrojos. Al final del experimento, se llevó a cabo el recuento de los cristales, la identificación de la fase polimórfica^{***}, el tamaño de los cristales usando un porta-objetos con microescala y localización en la gota. Para ello se diseñó una ficha o protocolo de lecturas en base a estudios preliminares. Asimismo, se tomaron imágenes de las gotas con una cámara Sony High Resolution MTV-3 o con una cámara digital Olympus camedia modelo C3040ZOOM adaptada a la lupa Leica MZ12, a tres diferentes aumentos. Primero, de la gota completa (X8), luego a cada una de las zonas de la gota anteriormente descritas (X40-80) y finalmente a algunos cristales individuales (X160). El aislamiento de los cristales, se realizó bajo la lupa con la ayuda de un juego de Micro-herramientas (Hampton Research) y pinceles.

2.4.2. Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (FESEM)

Al término de cada experimento, se recuperó la disolución de cada una de las gotas de los micropuentes. A continuación se lavaron los cristales al menos tres veces con H₂O desionizada, se recolectaron con la ayuda de pinceles y/o microherramientas y se depositaron sobre soportes de aluminio (Specimen Mounts ø 12.7 mm, Pin ø 3.2 mm de la casa Sigma. Lote 3640787), usando adhesivos de carbón (Carbon adhesive tabs, ø 12 mm. Cat. # 77825-12. Electron Microscopy Sciences). En el caso de cristales crecidos en presencia de proteínas, éstos fueron tratados previamente con el buffer proteinasa K. Posteriormente los soportes de aluminio se recubrieron con oro o carbón para su observación mediante microscopía electrónico de barrido (SEM; ZEISS DSM 950 SEM) o SEM de emisión de campo (FESEM; LEO, mod. GEMINI-1530).

^{***} En principio la identificación de los diferentes polimorfos se hizo de manera visual, según imágenes descritas en la bibliografía. Posteriormente la correcta identificación fue comprobada mediante estudios de difracción de rayos-X de polvo.

2.4.2.1. Tratamiento de las muestras

Los cristales obtenidos de los experimentos de precipitación de carbonato cálcico en presencia de proteínas y las muestras de cáscaras de huevo, previo a su análisis por microscopia electrónica de barrido, se trataron con proteinasa K (PKb) para quitar parcialmente la materia orgánica. La proteinasa K, es una proteína con actividad catalítica no específica. Esta enzima rompe proteínas en uniones A-X, donde A es un aminoácido alifático, aromático o hidrofóbico y X es cualquier aminoácido. Este método enzimático permite eliminar selectivamente la parte orgánica, específicamente las proteínas, y así resaltar la parte inorgánica del biomineral. Para este tratamiento se siguió el protocolo previamente descrito por Shiao (Shiao J. C. et al, 1999).

2.4.3. Difracción de rayos X de polvo

Una vez lavados los cristales, se clasificaron según su fase polimórfica y se agruparon cada polimorfo en un micropunte. Por una parte, los cristales de calcita (normalmente de hábito romboédrico), por otra los de aragonito (normalmente como agregados de fibras) y los cristales de vaterita (normalmente con forma de hojas) (ver Apéndice-I). Para confirmar la correcta identificación de la fase polimórfica de los cristales separados, se analizaron mediante difracción de rayos X (DRX; Siemens D5000). Una de las principales limitaciones que tuvimos fue el bajo número y tamaño de los cristales de aragonito y vaterita, de los que aparecen muy pocos y de muy pequeño tamaño). Esto impide utilizar como herramienta rutinaria de identificación la técnica de DRX. Para solventar este problema se intento estudiar mediante DRX con unos pocos cristales en un capilar, sin embargo, no tuvimos éxito en la obtención de datos. Con el mismo equipo y como segunda opción se realizó DRX con ángulo rasante. Para esta prueba los cristales de un micropunte se trasladaron a un portamuestras del difractómetro. Para ello se agregando un poco de agua al micropunte y la gota con los cristales se dejo caer sobre el portamuestra. Una vez evaporada el agua, los cristales quedaron adheridos a la superficie del portamuestra y se pudo hacer los análisis de DRX. Se colocaron para su análisis en el goniómetro del equipo con un tiempo de barrido muy

largo (24 hrs.), ya que la cantidad de muestra era muy pequeña (unos pocos cristales). En este último caso, si se determinaron diagramas con los picos característicos de las diferentes fases del carbonato cálcico. En estos análisis se varió el ángulo de incidencia del haz del rayos X, a 0.5- 2.0°. Los mejores resultados para la caracterización de vaterita (fase para la que se obtuvo el menor número de cristales) fue un ángulo de incidencia de 1.0° y un tiempo de barrido de 24 horas. Para el caso de los cristales de aragonito, debido al escaso número de cristales y su pequeño tamaño, no se consiguió obtener diagramas de difracción de rayos X con picos característicos. Su determinación solo fue posible mediante espectrometría de infrarrojos por transformada de Fourier (Spectrometer 510 FT-IR, Spectral Workstation 680 DSP Nicolet). Previo al análisis por infrarrojos, la muestra se homogeneizó con bromuro de potasio y se preparó una pastilla para su análisis.

Cristales aislados de vaterita fueron caracterizados además con el mismo espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier, haciendo incidir el haz sobre la superficie de un cristal único.

Bibliografía

- Addadi L., Weiner S. (1985). Interactions between acidic proteins and crystals: Stereochemical requirements in biomineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 82, pp. 4110-4114.
- Bella S. D., García-Ruiz J.M. (1987). Banding structures in induced morphology crystal aggregates of CaCO₃. *J. Mater. Sci.* 22 3095-3102.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Chandra, N., Brew, K., Acharya, K.R. (1998) Structural evidence for the presence of a secondary calcium binding site in human alpha-lactalbumin. *Biochemistry* 37: 4767-4772.
- Chatani, E., Hayashi, R., Moriyama, H., Ueki, T. (2002). Conformational strictness required for maximum activity and stability of bovine pancreatic ribonuclease A as revealed by crystallographic study of three Phe120 mutants at 1.4 Å resolution. *Protein Sci.* 11: 72-81
- Craig D., Reg R. (2002). High value opportunities from the chicken egg. A report for the RIRDC.
- Diamond, R. (1974). Real-space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *J Mol Biol* 82 pp. 371
- Dietzel M., Gussone N., Eisenhauer A. (2004). Co-precipitation of Sr²⁺ and Ba²⁺ with aragonite by membrane diffusion of CO₂ between 10 and 50 °C. *Chemical Geology* 203, 139-151.

-
- Domínguez-Vera J.M., Gautron J., García-Ruiz J.M., Nys Y. (2000). The effect of avian uterine fluid on the growth behaviour of calcite crystals, *Poult. Sci.* 79, 901–907.
- Euvrard M., Filiatre C., Crausaz E. (2000). A cell to study in situ electrocrystallization of calcite carbonate. *Journal of Crystal Growth* 216, 466-474.
- Fiona C. Meldrum, Stephen T. Hyde (2001). Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. *Journal of Crystal Growth* 231 544–558.
- Gabrielli C., Maurin G., Poindessous G., Rosset R.. (1999). Nucleation and growth of calcium carbonate by an electrochemical scaling process. *Journal of Crystal Growth* 200: 236-250.
- García-Ruiz J. M., Amorós J. L. (1978). Crecimiento de cristales en geles. I Técnica. *Estudios Geol.* 34. 161-166.
- García-Ruiz J. M., Amorós J. L. (1979). Crecimiento de cristales en geles. II Nueva variante. *Boletín de la Real Sociedad de Historia Natural (Geología).* 77. 101-109.
- García-Ruiz J.M. (2003). Counterdiffusion Methods for Macromolecular. *Methods in enzymology*, Vol. 368, 130-154.
- Gautron, J. Hincke, M. T. Nys, Y. (1997). Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens. *Connective tissue research.* 36, (3), 195-210.
- Giansanti F., Rossi P., Massucci M. T., Botti D., Antonini G., Valenti P., Seganti L. (2002). Antiviral activity of ovotransferrin discloses an evolutionary strategy for the defensive activities of lactoferrin *Biochem. Cell Biol.* Vol. 80, 125-130.
- Gómez-Morales J.; Torrent-Burgués J.; Rodríguez-Clemente R. (1996). Nucleation of calcium carbonate at different initial pH conditions. *Journal of Crystal Growth* 169, pp. 331-338.

-
- Gopinath C. S. Herde S. G., Ramaswamy A. V., Mahapatra S. (2002). Photoemission studies of polymorphic CaCO₃ materials. *Materials Research Bulletin* 37, 1323-1332.
- Henisch Heinz K. (1970). *Crystal Growth in Gels*. Dover Publications, Inc. New York.
- Henry H. T., Dove P. M., Orme C. A., De Yoreo J. (1998). Thermodynamics of Calcite Growth: Baseline for Understanding Biomineral Formation. *Science* 724-727.
- Hincke M.T. (1995). Ovalbumin is a component of the chicken eggshell matrix, *Connect. Tissue Res.* 31, 227–233.
- Holler, E., Rupley, J., and Hess, G. (1975a). Productive and Unproductive Lysozyme-Chitosaccharide Complexes. Equilibrium Measurements, *Biochem.*, 14, 1088.
- Holler, E., Rupley, J., and Hess, G. (1975b). Productive and Unproductive Lysozyme-Chitosaccharide Complexes. Kinetic Investigations, *Biochem.*, 14, 2377
- Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R. (2007) Bioactive Egg Compounds. Chapter 7. Superti F. Et al. Ovotransferrin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Huopalahti R., López-Fandiño R., Anton M., Schade R.. (2007) Bioactive Egg Compounds. Chapter 7. Superti F. Et al. Ovotransferrin. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Kalnitsky, G., Hummel, J.P., and Dierks, C. (1959). Some Factors Which Affect the Enzymatic Digestion of Ribonucleic Acid. *J. Biol. Chem.*, 234, 1512.
- Kanakis J., Malkaj P., Petroheilos J., Dalas E. (2001). The crystallization of calcium carbonate on porcine and human cardiac valves and the antiminerlization effect of sodium alginate. *Journal of Crystal Growth* 223: 557-564.

-
- Katsifaras A., Spanos N. (1999). Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterite and on the transformation of vaterite to calcite. *Journal of Crystal Growth* 204, 183-190.
- Kawano J., Shimobayashi N., Kitamura M., Shinoda K., Aikawa N. (2002). Formation process of calcium carbonate from highly supersaturated solution. *Journal of Crystal Growth* 237, 419-423.
- Kuettner, K., Sorgente, N., Croxen, R., Howell, D., and Pita, J. (1974). Lysozyme in Proseous Cartilage. VII. Evidence for Physiological Role of Lysozyme in Normal Endochondral Calcification, *Biochim. Biophys. Acta*, 372, 335.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-685.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. *Methods Enzymol.*, 3, 447-455.
- Leonidas, D. D., Shapiro, R., Irons, L. I., Russo, N., Acharya, K. R. (1997). Crystal structures of ribonuclease A complexes with 5'-diphosphoadenosine 3'-phosphate and 5'-diphosphoadenosine 2'-phosphate at 1.7 Å resolution. *Biochemistry* 36 pp. 5578.
- Liang P., Zhao Y., Shen Q., Wang D., Xu D. (2004). The effect of carboxymethyl chitosan on the precipitation of calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth* 261, 571-576.
- McPherson A. (1998). "Crystallisation of Biological Macromolecules." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mann S., Webb J. Williams R.J.P. (1989). Biom mineralization. Chemical and Biochemical Perspectives. VCH Verlagsgesellschaft.

- Mann S., Didymus J. M., Sanderson N. P., Heywood B. R., Samper E.J. (1990). Morphological Influence of Functionalized and Non-functionalized α,ω -Dicarboxylates on Calcite Crystallization. *J Chem. Soc. Faraday Trans.*, 86(10), 1873-1880.
- Mathews Christopher K.; Van Holde K. E.; Ahern Kevin G. (2002). *Bioquímica*, 3rd Edition. Pp. .
- Maurus, R., Bogumil, R., Nguyen, N.T., Mauk, A.G., Brayer, G. (1998) Structural and spectroscopic studies of azide complexes of horse heart myoglobin and the His-64-->Thr variant. *Biochem.J.* **332**: 67-74 .
- Maurus, R., Overall, C. M., Bogumil, R., Luo, Y., Mauk, A. G., Smith, M., Brayer, G. D. (1997). A myoglobin variant with a polar substitution in a conserved hydrophobic cluster in the heme binding pocket. *Biochim Biophys Acta* 1341 pp. 1.
- Meldrum F.C., Stephen T. Hyde (2001). Morphological influence of magnesium and organic additives on the precipitation of calcite. *Journal of Crystal Growth* 231, 544-558.
- Mizutani, K., Mikami, B., Hirose, M. (2001). Domain closure mechanism in transferrins: new viewpoints about the hinge structure and motion as deduced from high resolution crystal structures of ovotransferrin N-lobe. *J.Mol.Biol.* 309: 937-947.
- Nisbet A. D., Saundry R. H., Moir A. J. G., Fothergill L. A., and Fothergill J. E. (1981). The Complete Amino-Acid Sequence of Hen Ovalbumin. *Eur. J. Biochem.* 115, 335-345.
- Pág. [http:// www.worthington-biochem.com/LY/default.html](http://www.worthington-biochem.com/LY/default.html).
- Prieto M. García-Ruiz J.M. and Amorós J.L (1981). Growth of calcite crystals with non-singular faces. *Journal of Crystal Growth* 52, 864-867.

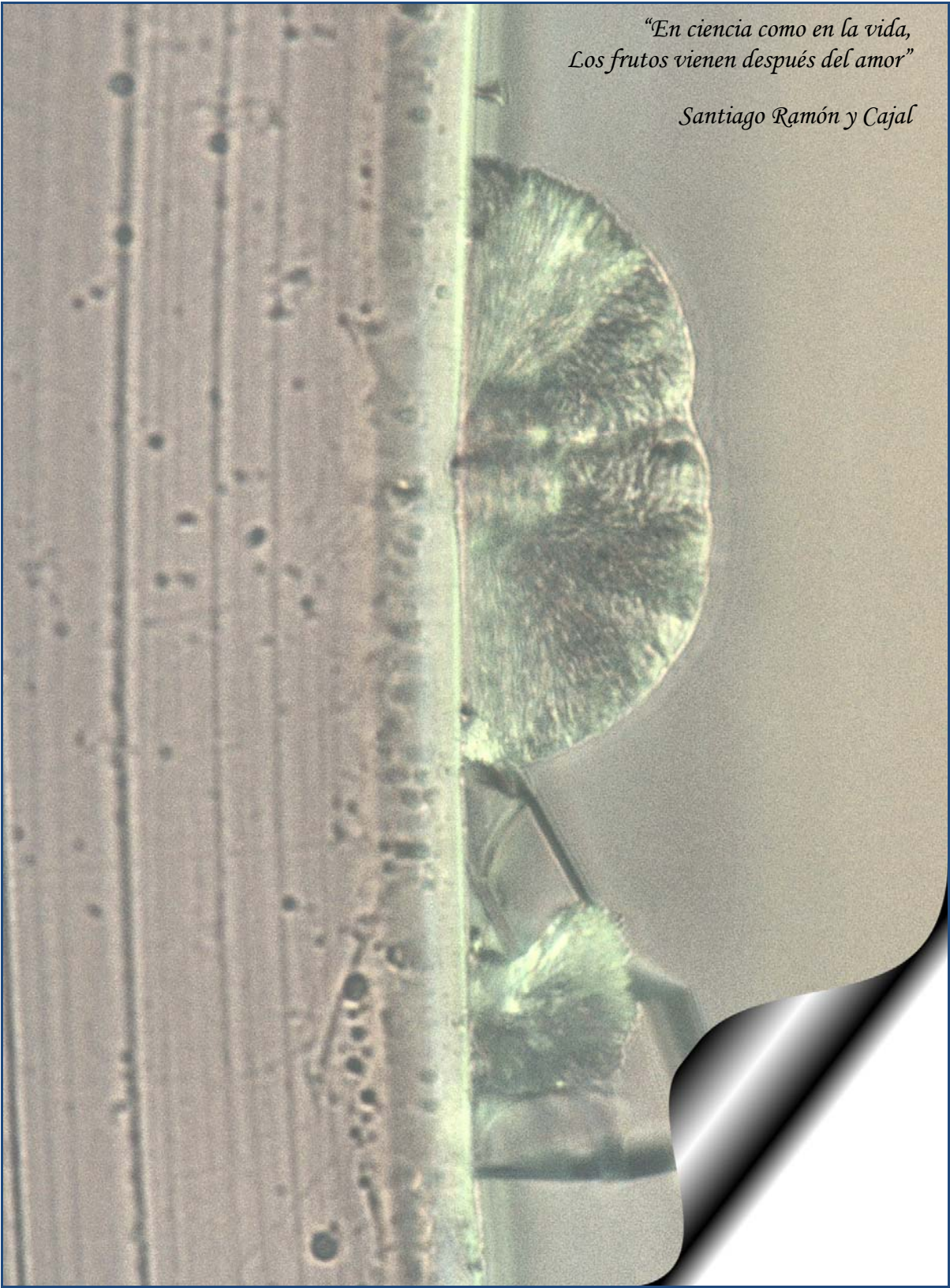
-
- Ren, J., Stuart, D. I., Acharya, K. R. (1993). Alpha-lactalbumin possesses a distinct zinc binding site. *J Biol Chem* 268 pp. 19292.
- Shen F. H., Feng Q. L. Wang C.M. (2003). The modulation of collagen on crystal morphology of calcium carbonate. *Journal of Crystal Growth*. 242, 239-244.
- Shiao, J. C.; Tzeng, C. S.; Leu, C. L.; Chen, F. C. (1999).xxx *J. Fish Biol.* 54, 302–309.
- Spanos N., Koutsoukos P. G. (1998). The transformation of vaterite to calcite: effect of the conditions of the solutions in contact with the mineral phase. *Journal of Crystal Growth* 191, 783-790.
- Takashi K., Tskuo S., Takahiro A., Taku I., Makoto K. (1998). Effects of macromolecules on the crystallization of CaCO₃ the formation of organic/Inorganic Composites. *Supramolecular Science* 5 pp. 411-415.
- Tracy S. L., François C.J.P., Jennings H.M. (1998). The growth of calcite spherulites from solution I. Experimental design techniques. *Journal of Crystal Growth* 193.pp. 347-381.
- Wang, J., Dauter, M., Alkire, R., Joachimiak, A., Dauter, Z. (2007) Triclinic Lysozyme at 0.65 Å Resolution. *Acta Crystallogr.,Sect.D* **63**: 1254
- Wellman-Labadie O. , Picman J., Hincke M.T. (2007). Avian antimicrobial proteins: structure, distribution and activity. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 63.
- Westin Karl-Johan,. Rasmuson Ake C. (2003). Precipitation of calcium carbonate in the presence of citrate and EDTA. *Desalination* 159, 107-118.
- Yamasaki, M., Arii, Y., Mikami, B., Hirose, M. (2002). Loop-inserted and thermostabilized structure of P1-P1' cleaved ovalbumin mutant R339T. *J.Mol.Biol.* 315: 113-120.

Yves Nys. (2004). “EggDefence project”. Improving quality and safety of hen eggs in new production system by reinforcing the antimicrobial natural defence and by developing tools for grading eggs. Final Report. Period from 01 10 2001 to 30 09 2004.

Capítulo 3

*“En ciencia como en la vida,
Los frutos vienen después del amor”*

Santiago Ramón y Cajal



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

LISTA DE LOS MANUSCRITOS

- 1. Studies on nucleation and polymorphism of calcium carbonate by sitting drop crystallization: the use of a crystallization mushroom.....** Pág. 103

Ángeles Hernández-Hernández, Jaime Gómez-Morales, Gen Sasaki, Juan Manuel García-Ruiz.

Artículo en revisión.

- 2. Influence of Model Globular Proteins with Different Isoelectric Points on the Precipitation of Calcium Carbonate.....** Pág. 127

A. Hernández-Hernández, A. B. Rodríguez-Navarro, J. Gómez-Morales, C. Jimenez-Lopez, Y. Nys, J. M. García-Ruiz.*

Crystal Growth & Design (2008), Vol.8 N°. 5, 1495-1502.

- 3. Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate**

(CaCO₃).....Pág. 141

A. Hernández-Hernández, M.L. Vidal, J. Gómez-Morales, A.B. Rodríguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, Y. Nys, J.M. García-Ruiz

Journal of Crystal Growth (2008), 310, 1754-1759.

- 4. Identification of some active proteins on the process of hen eggshell formation.....** Pág. 151

A. Hernández-Hernández, J. Gómez-Morales, A.B. Rodríguez-Navarro, J. Gautron, Y. Nys, J.M. García-Ruiz

Crystal Growth & Design (2008), Vol.8 N°. 12, 4330-4339.

Manuscrito 1. Studies on nucleation and polymorphism of calcium carbonate by sitting drop crystallization: the use of a crystallization mushroom

Estudios sobre la nucleación y polimorfismo de carbonato cálcico mediante cristalización en gota sedente: el uso de la “Seta de cristalización”.

La precipitación de carbonato cálcico (CaCO_3) juega un papel muy importante en numerosos procesos geológicos. Además tiene una gran importancia económica como proceso de cristalización industrial. Es por todo ello que se han dedicado numerosos estudios a analizar los mecanismos de precipitación del CaCO_3 . Para estudiar los mecanismos de precipitación, se han utilizado diferentes métodos de cristalización que utilizan volúmenes que van desde cientos de mililitros a litros. Sin embargo, estos macrométodos tienen la desventaja de que: i) solo permiten estudiar una única condición de cristalización en cada experimento, ii) requieren una gran cantidad de reactivos, y iii) la caracterización de los cristales o partículas precipitadas está limitada por la sensibilidad del dispositivo usado para detectarlos. Algunos de estos problemas se pueden evitar usando un micrométodo como el que se propone en este trabajo. El micrométodo propuesto, se basa en la técnica de difusión de vapor en gota sedente y permite trabajar con volúmenes muy pequeños, en el rango de microlitros (μL). Este tipo de métodos se utilizan normalmente para la cristalización de macromoléculas biológicas. Sin embargo, en este trabajo se presenta un dispositivo denominado “*la seta de cristalización*” especialmente adaptado para el estudio del proceso de precipitación del carbonato cálcico y que tiene las siguientes características: 1) Al ser un sistema multi-gotas permite barrer varias condiciones en un mismo experimento, 2) Permite el seguimiento directo *in situ e in tempore* del experimento y la observación de los cristales con un microscopio óptico, 3) no tiene problemas de condensación que interrumpan la observación de las gotas. 4) además permite determinar los parámetros de cristalización más importantes, como el tiempo

necesario para inducir la precipitación, número de cristales y la identificación de la fase polimórfica de los cristales.

El dispositivo de cristalización consiste de las siguientes partes: a) una placa Petri, en cuya base se colocan alrededor del centro, 10 micropuentes de poliestireno (uno cada 36°) con $40 \mu\text{L}$ de la solución de CaCl_2 y de un cristizador reservorio de una solución de NH_4HCO_3 . Ambos recipientes están unidos por un orificio de 0.6 mm de diámetro por el que difunde lentamente los gases NH_3 y CO_2 , desde la solución de NH_4HCO_3 del cristizador de abajo, hacia las gotas. Para caracterizar la evolución del sistema durante los experimentos de precipitación, se sigue la evolución del pH de las gotas, con una sonda de pH-metro (Sentron modelo Titan X) que se introduce por un orificio en la pared de la caja Petri, de 1 cm de diámetro. La sonda utilizada aloja sobre la superficie del sensor una gota de $40 \mu\text{L}$ de volumen. Para mantener el sistema aislado del exterior se sella con grasa de vacio.

Con el sistema anteriormente descrito, se procedió a hacer un barrido de condiciones a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2^\circ \text{ C}$, en las que se variaron las concentraciones de las soluciones del reservorio y de la gota en los siguientes intervalos: de 2.5 mM a 25 mM de NH_4HCO_3 y de 10 mM a 200 mM de CaCl_2 . En cada experimento, una vez sellado el sistema, la solución de NH_4HCO_3 libera $\text{NH}_3(\text{g})$ y $\text{CO}_2(\text{g})$. El $\text{NH}_3(\text{g})$ difunde y se disuelve en las gotas de la solución de CaCl_2 incrementando su pH mientras que el $\text{CO}_2(\text{g})$ se disuelve y forma las especies $\text{CO}_2(\text{aq})$, HCO_3^- y CO_3^{2-} . A medida que aumenta el pH, aumenta la proporción de especies CO_3^{2-} en solución, hasta que el sistema alcanza la sobresaturación crítica para la nucleación de CaCO_3 . El tiempo de inducción, t_i (tiempo transcurrido desde el momento que se cierra el sistema hasta el momento en que es detectada la nucleación), el número total de cristales, TNC, y su morfología fue analizada *in situ* mediante la observación con un microscopio óptico Leica conectado a una cámara digital Olympus modelo C3040ZOOM.

Durante el transcurso del experimento, el pH de la gota disminuye primeramente en relación a la solución madre (pH_0), debido a la difusión de CO_2 atmosférico que acidifica la solución. Posteriormente el valor de pH aumenta como consecuencia de la difusión del $\text{NH}_3(\text{g})$. Dependiendo de la concentración de la

solución de NH_4HCO_3 en el reservorio, el pH de las gotas se incrementa lo suficientemente, o no para lograr la sobresaturación crítica para que precipite el carbonato cálcico. Por ejemplo, en el experimento con 2.5 mM NH_4HCO_3 y 10 mM CaCl_2 , el pH se incrementa muy lentamente de 4.7 a 6.3 (después de 2280 minutos), sin llegarse a producir la nucleación, por lo que la solución permanece en todo momento insaturada y el tiempo de espera para la nucleación es infinito. Cuando la concentración de NH_4HCO_3 se incrementa hasta 5 mM, el pH alcanza un valor de plató de 7.4, el tiempo de espera para la nucleación es muy largo pero finalmente se alcanza el estado de sobresaturación que permite la precipitación de tres cristales. Incrementos mayores de la concentración de la solución reservorio hasta 15 mM y 25 mM de NH_4HCO_3 favorecen un incremento rápido del pH de 5.6 a 7.8 y de 4.6 a 8.1, respectivamente. Asimismo, el tiempo de espera disminuye exponencialmente hasta solo unos 270 y 260 min., mientras que el TNC se incrementa hasta 70 y 80 cristales, respectivamente. Un comportamiento similar se observa con las series en las que tenemos una solución en la gota de 200 mM de CaCl_2 . In este último caso, los t_i fueron más bajos (190-90 min.) y el TNC más altos (20-440) que los obtenidos en la serie que su utiliza una solución en la gota de 10 mM de CaCl_2 .

Respecto a la morfología y fase polimórfica de los cristales de carbonato cálcico precipitados, se observan tres tipos de morfologías: 1) calcita en forma de romboedros, aragonito en forma de aglomerados fibrosos formando “haces de trigo” y vaterita aglomerados en forma de hojas. Los cristales con diferentes morfologías se separaron y se analizaron mediante difracción de rayos X de polvo (DRX) o mediante espectrometría de infrarrojos (FTIR). El diagrama de DRX de los cristales en forma de romboedro, presenta picos de difracción característicos de la calcita a ángulos $2\theta = 29.45$ ($d = 3.035 \text{ \AA}$), 39.45 ($d = 2.285 \text{ \AA}$), 36.00 ($d = 2.495 \text{ \AA}$) y 39.45 ($d = 2.285 \text{ \AA}$). Los cristales en forma de aglomerados de hojas presentan picos de difracción característicos de la vaterita a ángulos $2\theta = 20.85$ ($d = 4.26 \text{ \AA}$), $2\theta = 24.85$ ($d = 3.58 \text{ \AA}$), $2\theta = 27.00$ ($d = 3.30 \text{ \AA}$) y $2\theta = 32.80$ ($d = 2.73 \text{ \AA}$). Por ultimo, los aglomerados fibrosos en forma de “haces de trigo” presentan un espectro de FTIR con bandas de adsorción a 1470 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} , 856 cm^{-1} y 712 cm^{-1} . Estas bandas correspondieron

a los modos de vibración del aragonito: 1466 cm^{-1} (ν_3), 1087 cm^{-1} (ν_1), 866 cm^{-1} (ν_2) and 712 cm^{-1} (ν_4).

En conclusión, en este trabajo se describe y caracteriza un nuevo dispositivo experimental especialmente adaptado para estudiar el proceso de precipitación de carbonato cálcico. Para analizar la funcionalidad del sistema experimental, se han realizado una serie de experimentos en las que se modifican diferentes parámetros experimentales (concentración de las soluciones) y se estudia como afectan a los mecanismos de nucleación y selección polimórfica durante la precipitación de carbonato cálcico. Asimismo, se ha estudiado en detalle la evolución de la química del sistema. Los principales resultados son: a) El sistema experimental permite seguir la evolución del pH durante el proceso de cristalización, b) En las condiciones de cristalización exploradas, la calcita presenta la forma típica de romboedros, aragonito aparece formando aglomerados de fibras “haces de trigo” y vaterita aparece como aglomerados de hojas, c) El sistema experimental permite el seguimiento directo y en tiempo real del proceso de cristalización mediante microscopía óptica. Asimismo, mediante el uso del microscopio *in situ*, se puede determinar fácilmente el tiempo de inducción de la nucleación y el número total de cristales en cada experimento, d) Así mismo, el sistema de cristalización presenta una alta reproducibilidad en cuanto a los principales parámetros estudiados (tiempo de inducción, número y tamaño de los cristales). Por ejemplo, la desviación máxima del número total de cristales obtenidos en sucesivos experimentos utilizando las mismas condiciones es de $\pm 5\%$, e) Asimismo, este trabajo demuestra que es posible determinar la fase polimórfica de los primeros cristales que aparecen, a partir de su morfología mediante microscopía óptica. Además, se ha determinado que el polimorfo predominante que aparece inicialmente es la calcita. Este resultado contradice los resultados obtenidos previamente por otros investigadores y la regla de precipitación secuencial de Ostwald. Sin embargo, esta contradicción puede explicarse por las características intrínsecas de “la seta de cristalización”. Este sistema se diferencia de otros por el lento incremento en la sobresaturación debido a la difusión lenta de NH_4 y CO_2 . Esto hace que tengan menos importancia factores cinéticos y que de tiempo para que

cristalice el polimorfo más estable y menos soluble (la calcita). Finalmente, se ha determinado considerando el tiempo aparente para la inducción de la nucleación, que el mecanismo mononuclear es el mecanismo más probable de crecimiento. Por otra parte, el límite mayor de energía libre de superficie de la calcita se estimó en 35 mJ/m².

Studies on nucleation and polymorphism of calcium carbonate by sitting drop crystallization: the use of a crystallization mushroom

Ángeles Hernández-Hernández, Jaime Gómez-Morales, Gen Sasaki[§], Juan Manuel García-Ruiz*

Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-UGRA). Ed. Inst. López Neyra. Avda. Conocimiento s/n. P.T. Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada. Spain.

§ Present address: The Institute of Low Temperature Science, Hokkaido University, N19-W8, Kita-ku, Sapporo 060-0819, Japan

ABSTRACT: We studied nucleation and polymorphism of calcium carbonate using a device named crystallization *mushroom*, by which precipitation experiments are reproducibly carried out by a vapor diffusion method of a sitting drop type. The crystallization *mushroom* allowed us to monitor the precipitation successfully by measuring pH of a CaCO₃ solution. The crystallization *mushroom* also enabled us to observe crystallization droplets by optical microscopy and then to determine induction time of nucleation and total number of crystals deposited. By optical microscopy observation we found that the dominant polymorph that appeared firstly in our experiments was calcite, although this result contradicts results of previous reports and the Ostwald step rule. We could successively explain this contradiction by an intrinsic feature of a crystallization mushroom: slow increase in supersaturation caused by slow diffusion of NH₃ and CO₂ gasses allowed the least soluble polymorph

* To whom correspondence should be addressed. J.G.M (e-mail: jaime@lec.csic.es; Tel.: +34 958 181643; Fax: +34 958 181632

calcite to be crystallized before other more soluble polymorphs appeared. The relation between supersaturation and induction time of nucleation could be explained by the mononucleation mechanism. The largest limit of surface free energy of calcite was estimated to be 35 mJ/m².

Key words: vapor diffusion, sitting drop, crystallization mushroom, calcium carbonate, calcite, nucleation, polymorphism

BRIEFS: A crystallization device "crystallization *mushroom*" enabled us to monitor precipitation process of calcium carbonate and to control polymorphs, as well as to estimate surface free energy of calcite.

1. Introduction

The precipitation of calcium carbonate (CaCO₃) plays an important role in a number of fields, such as geology¹, environmentalogy², biomineralogy^{3,4}, etc., in addition to broad application in industry^{5,6}. Hence, the precipitation processes of CaCO₃ have been so far investigated by various methods in various size scales.

In the large size scale, the precipitation processes are usually studied using crystallizers within the volume range from hundred milliliters to liters and then scaled up^{7,8}. This macromethod, however, has following disadvantages: (i) only one experimental condition is tested in each run, (ii) a relatively great amount of reagents are needed, and (iii) the characterization of precipitates is restricted to the detection limit of the instrument employed. On the other hand, in biomimetic mineralization, most of studies employ a vapor diffusion technique using volumes of solutions in the range of milliliters⁹ since extracellular organic molecules, which regulate polymorphs and morphologies of precipitates, are available in only minute quantities. This micromethod also has disadvantages, such as low reproducibility of the precipitation processes, difficulty for monitoring the processes, and the dependency of the precipitation process upon the volumes of the solution and of the dessicator where the experiment is carried out¹⁰.

To overcome these disadvantages, our laboratory developed a device called "crystallization *mushroom*"^{11,12}, by which precipitation experiments are carried out by vapor diffusion using the sitting drop method. This device enables us (i) to crystallize 10 samples in the volume range of microliters under different conditions at the same time, (ii) to perform the precipitation with high reproducibility, (iii) to monitor the precipitation processes *in situ* using a pH probe, and also (iv) to observe precipitates *in situ* during the processes using any kinds of optical microscopy. This device has been used for carrying out a series of studies on the effects of following proteins on the precipitation of CaCO₃: lysozyme¹¹, carbonic anhydrase¹³, ribonuclease-A, mioglobin, α -lactalbumin¹⁴ and eggshell matrix proteins fractions¹⁵.

In this study, we tried to clarify the intrinsic features in vapor-diffusion crystallization of CaCO₃, in absence of any additive, using a crystallization *mushroom*. In particular, we focused on the relation between supersaturation and the polymorphism of CaCO₃ firstly appeared in droplets. Using a crystallization *mushroom*, we succeeded in obtaining the most stable phase calcite reproducibly. We also explored the efficiency of a crystallization *mushroom* for quantitative studies on nucleation kinetics of CaCO₃. Significantly good reproducibility of the precipitation and easiness of the *in situ* observation by optical microscopy allowed us to evaluate surface free energy of calcite.

2. Experimental Section

2.1. Apparatus. All precipitation experiments of CaCO₃ were carried out by the vapor diffusion method using a crystallization *mushroom*. Figure 1 shows a schematic illustration of the setup. A *mushroom* is composed of nine polystyrene microbridges (Hampton Research Co.) (a small plastic block with a shallow well) for sitting drop crystallization, a glass cover and two cylindrical glass chambers. The microbridges, each of which has a loading capacity of 40 μ L of a CaCl₂ solution, are placed concentrically every 36° inside the upper chamber. A NH₄HCO₃ solution is placed in the lower chamber. The upper and lower chambers are connected each other through a hole of 6 mm diameter for vapor diffusion of CO₂ and NH₃.

A hole situated on a side wall of the upper chamber allows the introduction of a pH electrode (Titan model, Sentron), by which pH in a 40 μL drop placed on the electrode is monitored. The glass cover, upper and lower chambers are sealed with silicon grease.

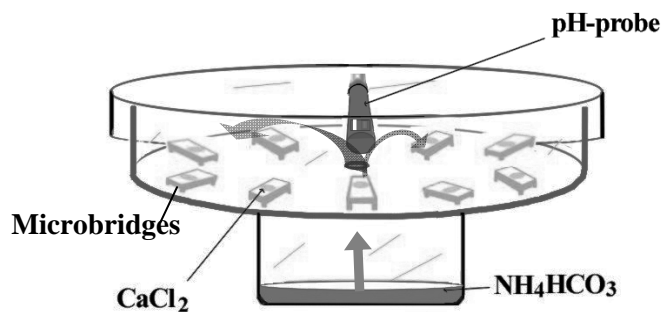


Figure 1. A schematic illustration of a "crystallization *mushroom*" used for the precipitation of CaCO_3 by vapor diffusion using the sitting drop method.

2.2. CaCO_3 precipitation by CO_2 and NH_3 diffusion. Precipitation experiments were carried out at 20 ± 2 °C and 1 atm, by varying the concentrations of both CaCl_2 and NH_4HCO_3 solutions from 10 to 500 mmol/L and from 1 to 25 mmol/L, respectively. Solutions were prepared using analytical grade reagents from Sigma and deionized water (Elix 3, Millipore). Once the crystallizer was closed and sealed, the underlying NH_4HCO_3 solution released NH_3 and CO_2 gasses into the free space of the crystallizer (0.158 L). Both the NH_3 and CO_2 gasses slowly diffused and redissolved into the droplets of CaCl_2 solutions, increasing their pH and forming neutral and charged aqueous species, such as H_2CO_3^* (aq), HCO_3^- and CO_3^{2-} , CaCO_3^0 , CaHCO_3^+ , $\text{Ca}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, $\text{Ca}(\text{NH}_3)^{2+}$, CaCl^+ , CaOH^+ , Ca^{2+} , Cl^- , H^+ , OH^- , $\text{NH}_3(\text{aq})$ and NH_4^+ . The pH evolution during the precipitation was measured and recorded using the pH-electrode. The experiments were finished after reaching the equilibrium conditions, i.e. the pH reached a plateau and the number of crystals as well as the polymorph composition, visualized by optical microscopy, remained unaltered.

2.3. Monitoring of precipitation and characterization of crystals obtained.

The precipitation processes were observed *in situ* using an optical microscope (Leica MZ12 or Olympus SZH10) connected to a digital camera (Olympus, C3040ZOOM), or to video camera (Sony, High Resolution MTV-3). Observations were carried out at every 15 or 60 minutes intervals. The time interval was adjusted according to the induction time for nucleation at each experimental condition. From these observations, morphology and total number N^{total} of crystals appeared in an each drop and induction time t_i , at which onset of precipitation was firstly confirmed, were determined *in situ*.

Once the experiments were finished, the *mushroom* was opened and the precipitates were recovered from the microbridges, rinsed twice with deionized water and dried at room temperature. The pH of the mother liquor was decreased to 7.0 to prevent further precipitation of carbonate, and residual Ca concentration was measured by atomic absorption spectrophotometry (AAS, Perkin-Elmer 510 model). The crystals obtained were observed by scanning electron microscopy of a field emission type (FESEM, Gemini-1530). Polymorph of crystals with a rhombohedral shape was determined by X-ray diffraction (XRD, Siemens D5000 Kristalloflex diffractometer). Polymorph of crystals with a rounded shape (a relatively low fraction) was determined by both XRD in a grazing incidence mode (1°, 24 hours) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR, Nicolet 510). Finally, the rest of crystals (a very small fraction) with a sheaf of wheat shape were dispersed in KBr, and polymorph was determined by FT-IR.

2.4. Calculation of supersaturation. Supersaturation β expressed as the ratio of ionic activity product (*IAP*) to solubility product K_{sp} was calculated by speciation software Visual MINTEQ¹⁶ using the following relations.

$$\beta = IAP/K_{\text{sp}} \quad (1)$$

$$IAP = a(\text{Ca}^{2+}) a(\text{CO}_3^{2-}) \quad (2)$$

$$K_{\text{sp}} = a(\text{Ca}^{2+})_{\text{eq}} \cdot a(\text{CO}_3^{2-})_{\text{eq}} \quad (3)$$

Here, $a(\text{Ca}^{2+})$ and $a(\text{CO}_3^{2-})$ show activities of these ions, and $a(\text{Ca}^{2+})_{\text{eq}}$ and $a(\text{CO}_3^{2-})_{\text{eq}}$ for activities at equilibrium. This software uses as inputs the temperature,

the initial CaCl_2 concentration, the initial pH, the partial pressures of NH_3 and CO_2 ($p\text{NH}_3$, $p\text{CO}_2$) and either the Debye-Hückel or Davies equations to determine the activity coefficients, depending on the ionic strength I ($I < 0.1$ M or $I < 0.5$ M, respectively). As outputs, this software provides the activities of the aqueous species Ca^{2+} , $\text{Ca}(\text{NH}_3)_2^{2+}$, $\text{Ca}(\text{NH}_3)^{2+}$, CaCl^+ , CaCO_3^0 , CaHCO_3^+ , CaOH^+ , Cl^- , H^+ , OH^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- , $\text{H}_2\text{CO}_3^*(\text{aq})$, $\text{NH}_3(\text{aq})$ and NH_4^+ , as well as the values of β respect to polymorphs calcite, aragonite, vaterite and $\text{CaCO}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$.

The calculations of pressures $p\text{CO}_2$ and $p\text{NH}_3$, generated by gases released from the NH_4HCO_3 solution to the free-space of the *crystallization mushroom* according to eqs. (4)-(7), were performed by software PHREEQC Interactive 2.8¹⁷.



Therefore the values of β estimated with these procedures are those that could be reached in any experiment by completely disregarding the precipitation. During the courses of most of the experiments, the droplets evolved from undersaturated to supersaturated, with precipitation starting once the system exceeded a certain critical supersaturation value.

3. Results and Discussion

3.1. Monitoring of precipitation and determination of induction time. In all experiments, the pH of the drops firstly became smaller than pH of the mother solutions (pH_0) because of the dissolution of atmospheric CO_2 . Once the *mushroom* was closed, the pH started to increase as a consequence of the diffusion and dissolution of NH_3 . As examples, the Figures 2a and 2b show, respectively, the time evolution of pH in experiments with CaCl_2 concentrations of 10 mM and 200 mM under various NH_4HCO_3 concentrations (2.5 to 25 mM). As shown in Figure 2a, the rate of increase in pH strongly depends on the concentration of NH_4HCO_3 contained in the reservoir. In the case of 2.5 mM NH_4HCO_3 , the increase in pH was slow

enough that the solution remained undersaturated throughout the run and no crystal was obtained. In contrast, in the case of 5 mM NH_4HCO_3 , the pH increased up to a plateau of 7.4, and three crystals were obtained (Table 1). Further increase in NH_4HCO_3 concentration to 15 and 25 mM resulted in rapid increases in pH and formation of 70 and 80 crystals, respectively. Figure 2b demonstrates that the increase in the concentration of CaCl_2 also quickens the precipitation process significantly. In the previous studies of batch crystallization of CaCO_3 ^{18,19}, conductivity of a solution was mainly monitored to follow the evolution of the precipitation. However, good correlation between changes in pH and concentrations of CaCl_2 and NH_4HCO_3 clearly indicates that pH also can be a good probe to monitor the precipitation process of CaCO_3 .

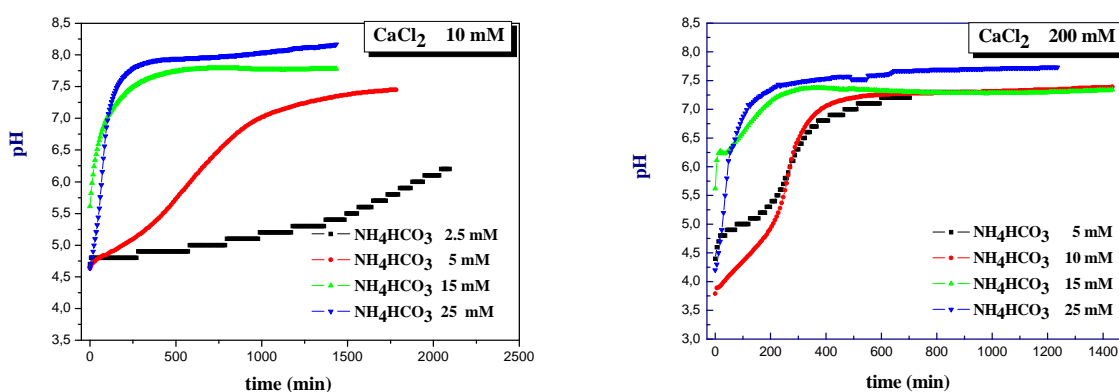


Figure 2. Time evolution of pH in the drops containing CaCl_2 of 10 mM (a) and 200 mM (b), under various concentrations of NH_4HCO_3 .

We also monitored the precipitation process of CaCO_3 by optical microscopy. Figure 3 shows a typical time course of the *in situ* observation of a sitting drop. In the early stage of the precipitation, the drop was clear (a). With increasing time, precipitates appeared and their size became larger. As indicated by a white circle in Figure 3b, we succeeded in identifying the precipitate that appeared firstly in the drop. The earliest time at which the firstly appeared precipitate could be visualized was defined as an induction time t_i of nucleation. As shown in Figure 3e, after the precipitates were grown to certain sizes, we could discriminate the morphologies of

the precipitates. We could also count the total number N^{total} of the precipitates, after the precipitation finished (Figure 3f).

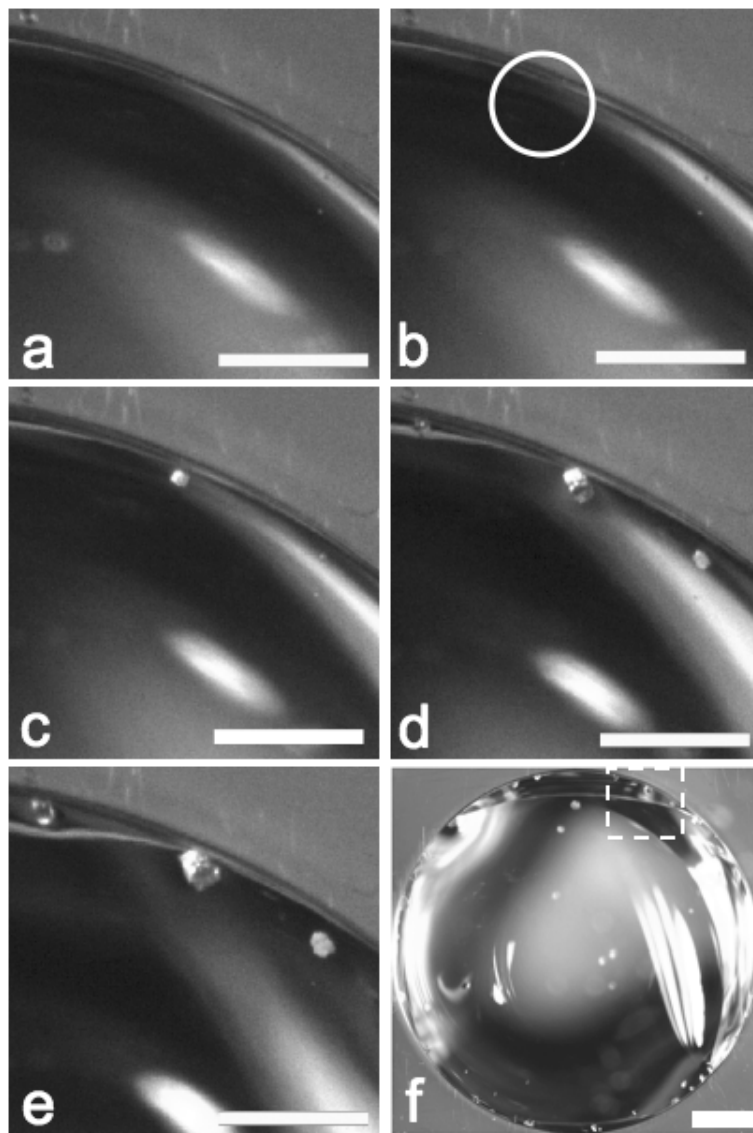


Figure 3. A sequence of photomicrographs of the time course of precipitation: (a) 70 min, (b) 225 min, (c) 500 min, (d) 1000 min, (e) 2000 min, and (f) 2990 min. A white circle in (b) shows the position where a firstly appeared precipitate could be observed with a very faint contrast level. A dotted square in (f) corresponds to the area shown in (a)-(e). Scale bars in (a)-(e) and (f) show 0.5 and 1 mm, respectively. Initial concentrations of CaCl_2 and NH_4HCO_3 are 20 and 10 mM, respectively.

To make the movie enough clear for the demonstration in this paper (Figure 3), we specially illuminated this drop continuously with a halogen lamp throughout the

precipitation. Hence the temperature of the drop (23°C) became higher than the other at the room temperature of 20°C (observed by discontinuous illumination), resulting in shorter induction time of nucleation (225 min) than that listed in Table 1 (400 min) under the same condition. The discontinuous illumination gave pictures of worse quality, but did not give any difficulty in identifying induction time and phases of precipitates. Hence the data summarized in Table 1 does not contain any effect of the temperature rise shown in Figure 3.

In the previous studies^{18,19}, changes in pH or conductivity of the supersaturated solutions was mainly used to determine t_i in experiments initiated by rapid mixing of Ca^{2+} and $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ solutions in larger volumes. As summarized in Table 1, t_i determined in this study corresponds to the shoulder of the pH evolution curve. Therefore, t_i determined in this study include both induction time for nucleation and the period that is necessary to reach a critical supersaturation for nucleation. With increasing supersaturation, the former dominates t_i . This issue is discussed in detail later.

3.2. Growth morphology and polymorph. First, we clarified the relation between morphology of precipitates obtained and CaCO_3 polymorph. As shown in Figure 4, we observed three types of morphologies: precipitates with rhombohedral (a), sheaf of wheat shapes (b), and rounded (c). We characterized these precipitates with different morphology using either powder XRD or FTIR. The XRD diffractogram of the rhombohedral precipitates clearly exhibited diffraction peaks belong to calcite (JCPDS 5-586): the reflections at $2\theta = 29.45$ ($d = 3.035 \text{ \AA}$), 39.45 ($d = 2.285 \text{ \AA}$), 36.00 ($d = 2.495 \text{ \AA}$) and 39.45 ($d = 2.285 \text{ \AA}$). The XRD patterns of rounded precipitates were more noisy than calcite because of smaller amounts of precipitates available, however the diffraction peaks at $2\theta = 20.85$ ($d = 4.26 \text{ \AA}$), $2\theta = 24.85$ ($d = 3.58 \text{ \AA}$), $2\theta = 27.00$ ($d = 3.30 \text{ \AA}$) and $2\theta = 32.80$ ($d = 2.73 \text{ \AA}$) coincided with those of vaterite (JCPDS 13-192). Finally, precipitates with a sheaf of wheat morphology, presented adsorption bands at 1470 cm^{-1} , 1087 cm^{-1} , 856 cm^{-1} and 712 cm^{-1} in the FTIR spectrum. These bands likely corresponded to vibrational modes of the aragonite mineral^{10,20}, i.e. 1466 cm^{-1} (ν_3), 1087 cm^{-1} (ν_1), 866 cm^{-1} (ν_2) and 712 cm^{-1} (ν_4).

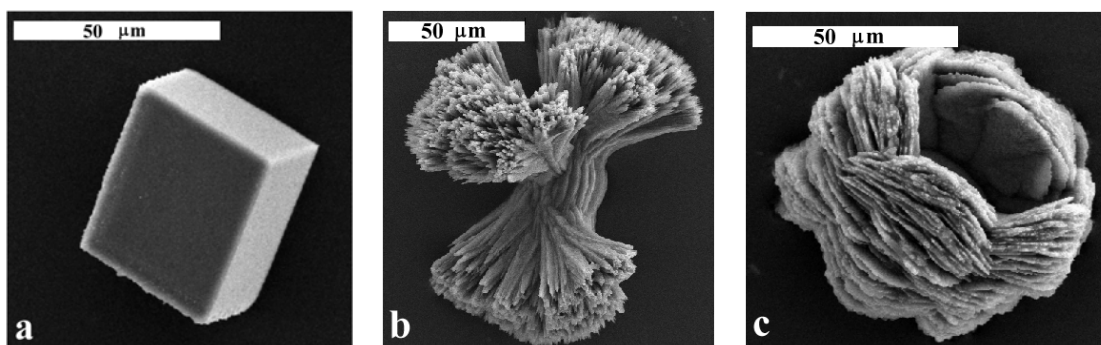


Figure 4. Field emission scanning electron micrographs of precipitates obtained by the sitting drop method using crystallization *mushroom*: (a) calcite, (b) aragonite, (c) vaterite.

As shown in Figure 4, calcite crystals appear as perfect rhombohedra bounded by the $\{104\}$ faces, whereas aragonite and vaterite appear as agglomerates of tiny crystals. Vaterite agglomerates displayed hexagonal (hexalobulated) rosette-shape morphology. Such agglomerates of vaterite were probably formed by the aggregation of nanocrystals via an oriented attachment mechanism¹⁰. Aragonite agglomerates exhibits a sheaf of wheat morphology. The formation mechanism of this type of morphology will be discussed elsewhere.

3.3. Number of crystals and polymorph distribution as a function of supersaturation. In this work, by selecting an appropriate range of crystallization conditions, we obtained relatively low numbers of crystals with well defined morphologies in a very reproducible way, either among the different drops in the same *mushroom* or among duplicated runs of the same conditions (two duplicated runs were performed in some cases). The total number N^{total} of crystals obtained in the same conditions exhibited maximum deviation of $\pm 5\%$. With increasing supersaturation β_{calcite} from 10 to 292, N^{total} increased from 0 to 440 (0 to 11 crystals/ μL). The results of the experiments performed under variety of CaCl_2 and NH_4HCO_3 concentrations were summarized in Table. 1.

Table 1. Summary of crystallization conditions, induction time t_i and number of CaCO_3 crystals in three polymorphs: calcite (C), vaterite (V) and aragonite (A); the values in parentheses show the number of firstly appeared crystals whose appearance and polymorph could be confirmed by optical microscopy; in the conditions that do not have values in parenthesis appearance and/or polymorphs could not confirmed with enough accuracy.

CaCl ₂ (mM)	NH ₄ HCO ₃ (mM)	pH ₀ (CaCl ₂)	β			t_i (min)	Number of crystals			
			C	V	A		Total	C	V	A
500	1	5.1	-	-	-	∞	0	0	0	0
10	2.5	5.9	10	3	7	∞	0	0	0	0
20	2.5	5.8	16	4	11	∞	0	0	0	0
50	2.5	5.7	26	7	19	2100	1	1	0	0
100	2.5	5.2	38	10	27	1400	10	10	0	0
200	2.5	5.1	55	15*	39*	190	20	20	0	0
								(1)	(0)	(0)
10	5.0	5.5	18	5	13	2500	3	2	1	0
20	5.0	5.3	28	7	20	1200	9	6	2	1
50	5.0	5.2	47	13	34	650	37	21	12	4
200	5.0	4.4	98*	26*	71*	520	92	85	5	2
10	10	5.4	29	8	21	500	20	7	4	6
20	10	5.3	45	12	33	400	40	22	9	9
								(1)	(2)	(3)
50	10	5.2	76	20	55	300	46	30	7	9
200	10	3.8	163*	44*	118*		144	110	30	4
10	15	5.9	36	10	26	270	70	49	8	13
20	15	5.8	58	15	42	230	100	68	15	17
50	15	5.7	99	26	71	160	135	115	8	12
100	15	5.8	144	39	105	130	380			
200	15	5.5	212	57*	154*	80	300	246	36	18
10	25	5.9	47	13	34	260	80	55	15	10
								(1)	(2)	(3)
20	25	5.8	77	21	55	200	160	141	11	8
50	25	5.7	134	36	97	135	220			
100	25	5.8	198	53	143	110	340	204	92	44
200	25	5.9	292*	78*	211*	90	440	396	22	22
								(1)	(2)	(3)

*Values using activity coefficients at the limit of Davies equation; the ionic strength was $I \approx 0.5$ - 0.52 M.

Within the conditions used in this study, calcite was the most abundant polymorph. Vaterite and aragonite were obtained with decreasing number. The number of calcite crystals obtained followed similar tendency to N^{total} , as shown in Table 1. It varied from 0 to 396 with increasing CaCl_2 and NH_4HCO_3 concentrations. However, the percentage of calcite crystals to N^{total} became smaller under the middle concentration range of NH_4HCO_3 (5-15 mM). The percentages of both aragonite and vaterite did not show a certain tendency.

Another interesting feature found in the series of experiments was the "first nucleating polymorph", which was determined by *in situ* optical observation during the experiments, as demonstrated in Figure 3. In the experiments at 2.5 mM NH_4HCO_3 , it was calcite. In the experiments at 5 mM NH_4HCO_3 and 200 mM CaCl_2 and at 10 mM NH_4HCO_3 and 20 mM CaCl_2 , both calcite and vaterite appeared almost simultaneously in the drops under observations. In the previous experiments of batch crystallization^{18,19}, sampling during crystallization was necessary to determine the first nucleating polymorphs. However, the crystallization *mushroom* allowed us to determine polymorphs without any sampling. This is one of the big advantages of the use of the crystallization *mushroom*. In the conditions that do not have a value of a crystal number in parenthesis (Table 1), unfortunately we could not determine the first nucleating phase with enough accuracy, since too large number of crystals appeared in the drops at the same time to identify individual phases by optical microscopy.

In contrast to this study, in previous experiments initiated by rapid mixing of Ca^{2+} and $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ solutions, vaterite was usually appeared as first nucleating phase, and then calcite was formed by a solvent mediated transformation following the Ostwald step rule. Therefore, the first simultaneous appearance of calcite or calcite plus vaterite obtained by the use of the crystallization *mushroom* contradicts the previous results and the Ostwald step rule. However, a reasonable explanation can be given, by considering the intrinsic feature of a vapor diffusion method. In the experiments with a low NH_4HCO_3 concentration, the partial pressures of both NH_3 ($p\text{NH}_3$) and CO_2 ($p\text{CO}_2$) were very low, and then their slow diffusion into the aqueous droplets took place, as reflected by the smooth increase in pH, as shown in

Figure 2. Because of this slow increase in supersaturation, the droplets firstly reached the supersaturation respect to the least soluble polymorph calcite ($\log K_{sp}^{\text{calcite}} = -8.453$)²¹, then calcite had enough time to nucleate and grow before nucleation and growth of vaterite and aragonite took place. As the NH_3 and CO_2 gasses further diffused into the drops continuously, the supersaturation increased and surpassed the solubilities of aragonite and vaterite ($\log K_{sp}^{\text{aragonite}} = -8.306$, $\log K_{sp}^{\text{vaterite}} = -7.873$)²¹, then nucleation and subsequent growth of these polymorphs occurred.

A further transformation either from vaterite to aragonite or vaterite to calcite was not observed in our experiments at low NH_4HCO_3 concentration, possibly because the presence of the ammonium ion stabilized these metastable phases². Kawano *et al*²² used a micromethod by rapid mixing of CaCl_2 and Na_2CO_3 solutions to produce highly supersaturated solution. They reported that amorphous CaCO_3 appeared first, and then vaterite and calcite nucleated and grew by consuming amorphous CaCO_3 precipitated previously. They also reported that in some cases calcite appeared before vaterite. The result obtained in this study, which violates the Ostwald step rule, deserves our attention and emphasizes the importance of micromethods for investigation of these "irregular" precipitation processes. Moreover, the appearance of aragonite (a high temperature polymorph) at 20 °C, in the absence of any additive such as Mg^{2+} , SO_4^{2-} , or an external factor like a magnetic field, deserves a further study. In fact, to our knowledge, the presence of aragonite has not been reported in pure CaCO_3 systems where the supersaturation is obtained by direct mixing of calcium and carbonate/bicarbonate solutions at 20°C. The minimum reported temperature for aragonite formation was 24 °C (pH > 9)²³ or 26°C²⁴, with optimal temperature for maximum relative abundance above 60 °C. The authors suspect that very small fractions of aragonite crystals in mixtures of CaCO_3 polymorphs obtained in large solution volumes could not be detected because of the detection limit of powder XRD. So, in these cases the use of a micromethod can help us to better define the precipitation range of a polymorph when studying the effects of certain operating variables.

The results obtained in this study cannot be straightforwardly compared with the results on eggshell calcification proceeded *in vivo* in a uterine fluid, because of different temperature and the presence of many biological macromolecules whose

roles have not yet been clarified. However, such comparison can provide insights into the parameters susceptible of biological regulation. Hence, we calculated the supersaturation and the ratio of a Ca^{2+} concentration to a total carbonates concentration, using the data reported by Nys and coworkers²⁵. The results were summarized in Table 2. As it is shown, eggshell formation took place under a high supersaturation ($\beta \approx 100$) during the whole process in a uterine fluid, but the ionized Ca concentration is deficient with respect to the total carbonate concentration. In our *in vitro* study, calcite however dominates the first nucleating phase under higher Ca^{2+} concentration, as shown in Table 1. Therefore, in *in vivo* system, the ratio of Ca^{2+} /total carbonate concentrations is not a key factor to control CaCO_3 polymorphism, but temperature and the biological macromolecules released to a uterine fluid play a dominant role in the formation of calcite and a typical eggshell microstructure.

Table 2. Time course of a supersaturation and a ratio of concentrations Ca^{2+} /total carbonate during *in vivo* eggshell calcification; original data were taken from the ref. 27

Hours*	β	Ca^{2+} / total carbonate
12	109	0.057
15	128	0.072
18	100	0.078
20	101	0.126
21	104	0.099
22	110	0.095
24	90	0.107

*Hours after preceding oviposition

3.4. Nucleation kinetics. To our knowledge we have succeeded, for the first time, in observing nucleation of calcite as the first nucleating phase. Hence we analyzed the induction time t_i of nucleation as a function of supersaturation β of calcite, and tried to evaluate surface free energy of calcite. As discussed in the above section 3.3, the induction time t_i determined in this study includes both the time to increase supersaturation by vapor diffusion and the induction time of nucleation.

Therefore, t_i is longer than the real induction time of nucleation, in particular under low supersaturation. However, since we obtained t_i of calcite for the first time, we believe that evaluation of surface free energy is worthy to try.

Kashchiev et al. reported a general expression of the induction time that accounts for the mononuclear (MN) and polynuclear (PN) mechanisms²⁴. When nucleation is dominated by the MN or PN mechanism, the relation between t_i and β can be respectively expressed as follows:

$$\ln t_i \propto B / \ln^2 \beta \text{ (the case of MN),} \quad (8)$$

$$\ln \left(t_i \beta^{1/8} (\beta^{1/2} - 1)^{6/4} \right) \propto B / (4 \cdot \ln^2 \beta) \quad (9)$$

(the case of PN: spiral growth is assumed),

$$B = \frac{16\pi\sigma^3\Omega^2}{(kT)^3} \text{ (assuming a spherical shape of nuclei).} \quad (10)$$

Here, σ is the surface free energy of nuclei, Ω the molecular volume ($6.13 \times 10^{-29} \text{ m}^3$ for calcite²⁶), k the Boltzmann constant, and T the absolute temperature.

Figure 5a shows the plot of t_i vs. β obtained experimentally in this study. To evaluate the MN and PN mechanisms, the data were replotted according to Eqs. 8 and 9, as shown in Figures 5b and 5c, respectively. In the case of PN mechanism, we assumed spiral growth of calcite crystals according to several previous reports²⁷⁻³⁰. In some of the experiments, calcite was the first polymorph appeared, while in others carried out at higher reagent concentration, calcite and vaterite appeared almost simultaneously. Considering this circumstance, to perform these plots we have employed the supersaturation β of the polymorph calcite.

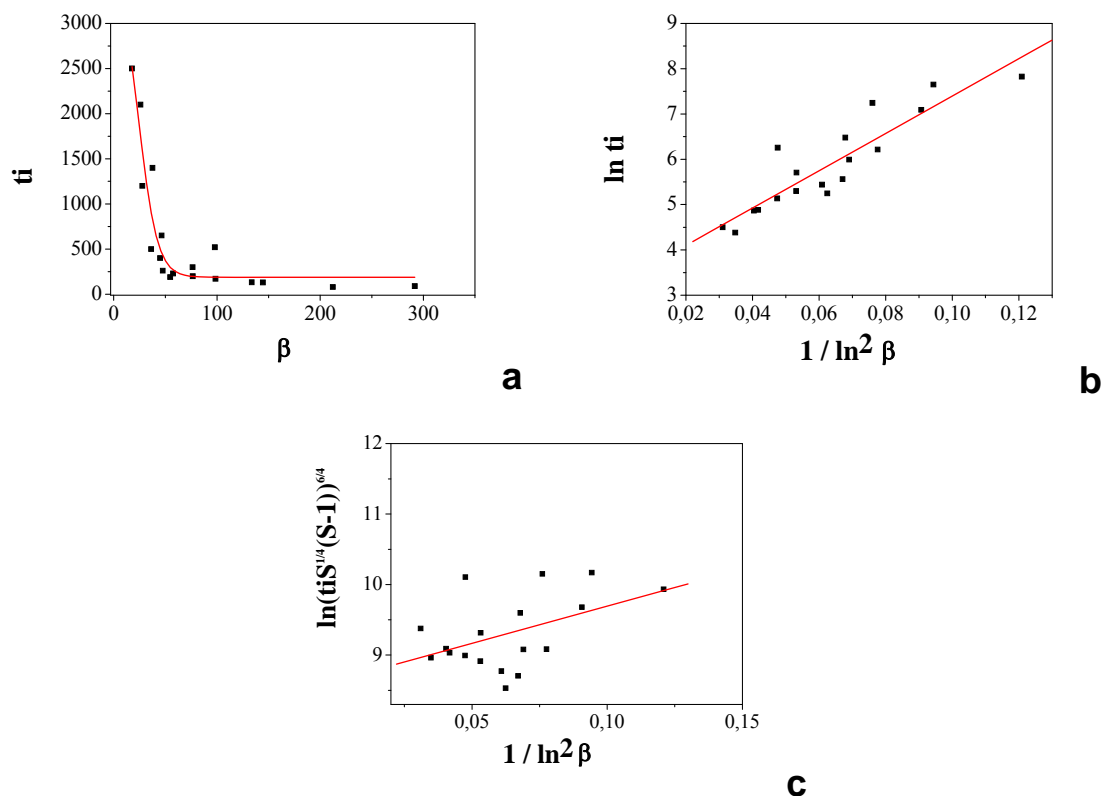


Figure 5. (a) plot t_i vs. β , (b) test of the MN mechanism according to Eq. 8, (c) test of the PN mechanism according to Eq. 9.

The correlation coefficients corresponding to Figures 5b and 5c are 0.92 and 0.47, respectively. The better fit of Figure 5b indicates that in our nucleation experiments using the micromethod (drops of 40 μL) the MN mechanism prevail, although the correlation coefficient obtained (0.92) was not very good. This result roughly agrees with the hypothesis of Verdoes et al.³¹, who assumed that the MN mechanism operates only when volume of a solution phase is smaller than 10 μL . From the slope of the straight line of Fig. 5b, we obtained the surface free energy of calcite $\sigma = 35 \text{ mJ/m}^2$. Although we directly obtained t_i of calcite for the first time, the induction time determined in this study is longer than the real induction time, in particular under low supersaturation. Therefore the value of $\sigma = 35 \text{ mJ/m}^2$ shows the largest limit of the surface free energy of calcite: i.e. real value would be smaller than this value.

Concerning the surface free energy of calcite, Söhnel and Mullin reported $\sigma = 83$ and 98 mJ/m^2 using batch reactors³². Other values reported on different

experimental conditions using batch reactors show a big scatter (7^{33} , 19.5^{34} , 205^{35} , 280^{36} mJ/m²). As discussed by Söhnel and Mullin³², very small values correspond to heterogeneous nucleation meanwhile very large values correspond to erroneous assumptions on the treatment of data. Söhnel and Mullin also reported a value of 120 mJ/m² predicted theoretically³⁷, although this large value would result from the inaccurate evaluation of the number of coordinated water molecules on a crystal surface. The surface free energy of calcite would be larger than that of vaterite because of the Ostwald step rule. Therefore, the reported values of vaterite, $\sigma = 41^{18}$ and 40.7 mJ/m²³¹, indicate that some degree of heterogeneous nucleation occurred in this study. At present, accurate evaluation of the surface free energy of calcite could be still difficult subject. However, we emphasize that a crystallization *mushroom* has several advantages also on kinetic studies: (i) very small volume that ensures mononucleation, (ii) easy *in situ* observation and identification of the first nucleating phase, in addition to (iii) high reproducibility of precipitation processes. Therefore, we believe that a crystallization *mushroom* would become a promising tool in studying crystallization of wide variety of minerals in the near future.

4. Conclusions

We have studied the nucleation and polymorphism of calcium carbonate using the crystallization *mushroom*. Key results found in this paper are as follows:

- 1) The crystallization process of CaCO₃ could be successfully monitored by measuring pH of a solution.
- 2) Under our crystallization conditions, calcite crystals exhibited a rhombohedral shape, although aragonite and vaterite appeared as agglomerates with sheaf of wheat shapes and rounded shapes, respectively.
- 3) Crystallization mushroom allowed us to monitor the crystallization process by optical microscopy. The *in situ* observation clearly demonstrated that we could determine the induction time of nucleation and total number of crystals.
- 4) The use of the crystallization *mushroom* significantly improved the reproducibility of precipitation. Maximum deviation of the total number of crystals obtained in the same conditions was $\pm 5\%$.

5) By optical microscopy, we identified the firstly nucleating polymorph from its morphology. We found that the dominating polymorph that appeared firstly was calcite, although this result contradicts the previous results by other researchers and the Ostwald step rule. This contradiction could be reasonably explained by the intrinsic feature of crystallization *mushroom*: the slow increase in supersaturation resulted from slow diffusion of NH₃ and CO₂ gave enough time for crystallization to the least soluble polymorph calcite.

6) From the apparent induction time of nucleation, we found that the mononuclear mechanism was the most probable growth mechanism. The largest limit of the surface free energy of calcite was estimated to be 35 mJ/m².

Acknowledgements. This work has been supported by MAT2006/11701 of the spanish Ministry of Education and Science and by PIE2006301133 of the spanish CSIC. AHH, JGM and JMGR belong to the research team “Factoría de Cristalización” (Consolider Ingenio 2010). We also thank Dr. Luis David Patiño Lopez for image treatment.

References

- (1) Lippmann, F., *Sedimentary Carbonate Minerals*. ed.; Springer-Verlag: Berlin, 1973; Vol. 6.
- (2) Kitamura, M. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *236*, 318-327.
- (3) Lowenstam, H. A.; Weiner, S., *On Biomineralization*. ed.; Oxford University Press: New York 1989.
- (4) Mann, S. *Nature* **1988**, *332*, 119-124.
- (5) Hostomský, J.; Jones, A. G. *Industrial Crystallization '93* **1993**, 2-055-2-059.
- (6) García-Carmona, J.; Gómez-Morales, J.; Rodríguez-Clemente, R. *J. Cryst. Growth* **2003**, *249*, 561-571.

-
- (7) Kabasci, S.; Althaus, W.; Weinspach, P. M. *Chem. Eng. Res. Des.* **1996**, *74*, 765–772.
- (8) Myerson, A. S., *Handbook of Industrial Crystallization*. 2nd Ed ed.; Butterworth Heinemann: Woburn, MA, 2002.
- (9) Rajamani Lakshminarayanan; R. Manjunatha Kini; Valiyaveetil, S. *PNAS* **2002** 5155-5159.
- (10) Gehrke, N.; Colfen, H.; Pinna, N.; Antonietti, M.; Nassif, N. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5*, 1317-1319.
- (11) Jimenez-López, C.; Rodríguez-Navarro, A.; Domínguez-Vera, J. M.; García-Ruiz, J. M. *Geochimica et cosmochimica acta [0016-7037]* **2003**, *67*, 1667-1676.
- (12) Garcia-Ruiz, J. M.; Hernández-Hernández, M. A.; Gómez-Morales, J. In VDI-Ber. Nr 2005; 2005; p 963.
- (13) Fernandez, M. S.; Passalacqua, K.; Arias, J. I.; Arias, J. L. *Journal of Structural Biology* **2004**, *148*, 1-10.
- (14) Hernández-Hernández, A.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Gómez-Morales, J.; Jiménez-López, C.; Nys, Y.; García-Ruiz, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1495-1502.
- (15) Hernández-Hernández, A.; Vidal, M. L.; Gómez-Morales, J.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Labas, V.; Gautron, J.; Nys, Y.; García Ruiz, J. M. *J. Cryst. Growth* **2008**, *310*, 1754-1759.
- (16) Gustafsson, J. P., . *Visual MINTEQ 2.01, computer program for calculating aqueous geochemical equilibria, (adapted version of MINTEQA2 (CEAM, EPA USA, 1999))*, USA, 2001.
- (17) Parkhurst, D. L.; Appelo, C. A. J. *User's guide to PHREEQC computer Program for Speciation, Batch-reaction, One-dimension transport and Inverse geochemical calculations*, version 2-A Geological Survey: U.S., 1999.

-
- (18) Gómez-Morales, J.; Torrent-Burgués, J.; Rodríguez-Clemente, R. *J. Cryst. Growth* **1996**, *169*, 331-338.
- (19) Tai, C. Y.; Chien, W. C. *Chem. Eng. Sci.* **2003**, *58*, 3233-3241.
- (20) Griffith, W. P., The infrared spectra of Minerals, Mineralogical Society. In Farmer, V. C., Ed. London, 1974.
- (21) Plummer, L. N.; Busenberg, E. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1982**, *46*, 1011-1040.
- (22) Kawano, J.; Shimobayashi, N.; Kitamura, M.; Shinoda, K.; Aikawa, N. *J. Cryst. Growth* **2002**, *237-239*, 419-423.
- (23) Tai C. Y.; Chen, F. B. *AIChE J.* **1998**, 1790-1798.
- (24) Kashchiev, D.; Verdoes, D.; van Rosmalen, G. M. *J. Cryst. Growth* **1991**, *110*, 373-380.
- (25) Nys, Y.; Zawadzki, J.; Gautron, J.; Mills, A. D. *Poult. Sci.* **1991**, *70*, 1236-1245.
- (26) Davis, K. J.; Dove, P. M.; De Yoreo, J. J. *Science* **2000**, *290*, 1134-1137.
- (27) Christoffersen, J.; Christoffersen, M. R. *J. Cryst. Growth* **1990**, *100*, 203-211.
- (28) Kazmlerczak, T. F.; Tomson, M. B.; Nancollas, G. H. *J. Phys. Chem.* **1982**, 103-107.
- (29) Gómez-Morales, J.; Torrent-Burgués, J.; Rodríguez-Clemente, R. *Anal. Quím.* **1998**, *94*, 195-.
- (30) Nielsen, A. E.; Toft, J. M. *J. Crystal Growth* **1990**, *100*, 203-.
- (31) Verdoes, D.; Kashchiev, D.; van Rosmalen, G. M. *J. Cryst. Growth* **1992**, *118*, 401-413.
- (32) Söhnel, O.; Mullin, J. W. *J. Cryst. Growth* **1982**, *60*, 239-250

- (33) Roques, H.; A.Girou *Water Res.* **1974**, *8*, 907-920.
- (34) Kharin, V. M. *Zh. Fiz. Khim.* **1974**, 1724.
- (35) Möller, P.; Rajagopalan, G. *Z. Physik. Chem. (NF)* **1976**, 187-198.
- (36) Goujon, G.; Mutaftschiev, B. *J. Chim. Physique* **1976**, 351-355.
- (37) Söhnel, O.; Mullin, J. W. *J. Cryst. Growth* **1978**, *44*, 377-382

Manuscrito 2. Influence of Model Globular Proteins with Different Isoelectric Points on the Precipitation of Calcium Carbonate.

Influencia de proteínas globulares modelo con diferentes puntos isoeléctricos en la precipitación de carbonato cálcico.

En los procesos de biomineralización controlada biológicamente, determinadas proteínas tienen un papel fundamental ya que regulan la nucleación, polimorfismo y crecimiento de los cristales. Para explicar la interacción entre proteínas y las superficies minerales, se han propuesto muy diferentes mecanismos entre ellos una combinación de interacciones electrostáticas y estereoquímicas. Sin embargo, la importancia de los diferentes mecanismos de interacción propuestos no se conoce en profundidad y sería conveniente estudiarlos por separado en sistemas en los que un tipo de interacción predomine. En este sentido, para entender los mecanismos de control de las proteínas sobre el crecimiento de carbonato cálcico, hemos utilizado una serie de proteínas modelo del mismo tamaño y conformación pero que difieren en sus propiedades superficiales (carga). En particular para este estudio se seleccionaron cuatro proteínas modelo: lisozima (Lyz) de clara de huevo de gallina, ribonucleasa-A (Rib-A) de páncreas de bovino, mioglobina (Mio) de musculo esquelético de caballo y α -lactoalbúmina (α -La) de leche de bovino. Estas proteínas son globulares, tienen un peso molecular semejante pero difieren en su punto isoeléctrico que varía en un rango muy amplio de pH (pI teóricos: Lyz 9.32, Rib-A 8.64, Mio 7.36 y α -La 4.83).

Un estudio detallado de los resultados de los experimentos de precipitación de carbonato cálcico en presencia de estas proteínas indica que dependiendo del punto isoeléctrico de las proteínas y de su concentración, las proteínas afectan de diferente manera el proceso de nucleación y crecimiento de cristales. En particular, la

presencia de estas proteínas afecta al proceso de precipitación a diferentes niveles: *a) control sobre la nucleación*, a bajas concentraciones (16, 128 y 512 $\mu\text{g/mL}$) α -La, favoreció la nucleación de CaCO_3 incrementando el número de cristales, mientras que Rib-A y Mio inhibieron la nucleación. A altas concentraciones las tres proteínas inhibieron la nucleación, sin embargo el efecto de Lyz sobre la nucleación de CaCO_3 fue pequeño en el rango de 16 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ fue necesario incrementar la concentración por encima de 5000 $\mu\text{g/mL}$ para inhibir totalmente la nucleación de carbonato cálcico, *b) control sobre el crecimiento*, A bajas concentraciones de las proteínas, la masa total del precipitado fue menor para las proteínas de mayor punto isoeléctrico, *c) control sobre la fase polimórfica*: las cuatro proteínas estudiadas favorecen la formación de calcita frente a las otras fases polimórficas de CaCO_3 (aragonito y vaterita). Las proteínas con punto isoeléctrico más bajo son más efectivas en favorecer la formación de calcita y producen una inhibición casi completa de las otras fases polimórficas del carbonato cálcico, *d) control sobre la morfología*, las proteínas Rib-A, Mio y α -La tienen un efecto muy notable sobre la morfología de los cristales de calcita. Sin embargo, en el caso de Lyz no se aprecia un efecto notable sobre la morfología de los cristales de CaCO_3 . La morfología de los cristales de calcita se modifica con la aparición de nuevas caras o la formación de aglomerados policristalinos redondeados (Rib-A y Mio). En el caso de Rib-A aparecen un gran número de cristales globulares de calcita, a 512 $\mu\text{g/mL}$, la proporción de los cristales de calcita esférica es dos veces mayor que la de calcita romboédrica. Los aglomerados más grandes aparecen normalmente en la interface gas-liquido o gas-liquido-micropunte de la gota. Los cristales de calcita modificados presentan un hábito romboédrico modificado por la expresión de nuevas caras estabilizadas por la presencia de estas proteínas. Las nuevas caras expresadas corresponden a las formas prismáticas $\{100\}$ y $\{110\}$ y a la forma de romboedro negativo $\{018\}$. La expresión de estas caras es especialmente notable en el caso de α -La a 128 $\mu\text{g/mL}$.

Las modificaciones en el comportamiento del crecimiento y disolución de los cristales proporcionan una información muy valiosa sobre los mecanismos de

interacción entre proteína-mineral. En ambos casos las modificaciones en el hábito de los cristales de calcita son el resultado de una adsorción preferencial de las proteínas sobre caras específicas del cristal, las cuales son expresadas como consecuencia de la disminución en su tasa de crecimiento o disolución. Este efecto morfológico de inhibición en caras específicas del cristal de calcita varía dependiendo de la naturaleza de la carga superficial de la proteína. La presencia de Rib-A y Mio ejercieron un efecto fuerte sobre la morfología de los cristales de calcita debido a dos tipos de interacción: 1) *Interacción específica* proteína superficie sobre los planos {100} y {110} y {018} cuyo efecto fue el resultado de la aparición de dichas caras. 2) *Interacción no específica* dando como resultado la precipitación de aglomerados redondeados en la misma gota. En el caso de interacción específica, se puede interpretar mediante un mecanismo de reconocimiento estereoquímico de la proteína sobre la superficie del cristal. En el caso de la interacción no específica, se puede explicar como una absorción inespecífica de las proteínas sobre la superficie del cristal debido a una interacción hidrofóbica que disminuye la superficie expuesta de la proteína a la solución.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que existen diferentes mecanismos de interacción entre proteínas y superficies minerales. En el caso de proteínas ácidas (α -La), las interacciones electrostáticas son las dominantes y hacen que tengan una fuerte influencia sobre los mecanismos de nucleación, polimorfismo y crecimiento de los cristales. En cambio, en el caso de proteínas con punto isoeléctrico próximo a la neutralidad, el tipo de interacción dominante es hidrofóbico con cierta componente electrostática que produce una fuerte modificación de la morfología de los cristales. En el caso de proteínas básicas (Lyz) no afectan de manera muy notable al proceso de precipitación indicando que interactúan débilmente con la superficie del mineral. Estos resultados permiten entender mejor el papel de las proteínas como agentes reguladores de los procesos de precipitación mineral en sistemas biológicos. En particular, el tipo y cantidad de aminoácidos ionizables es un factor muy importante que influye en la capacidad de influencia de una macromolécula sobre la precipitación de minerales.

Influence of Model Globular Proteins with Different Isoelectric Points on the Precipitation of Calcium Carbonate

A. Hernández-Hernández,[†] A. B. Rodríguez-Navarro,[‡] J. Gómez-Morales,^{*,†}
C. Jiménez-Lopez,[§] Y. Nys,^{||} and J. M. García-Ruiz[†]

Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-UGRA), Edificio Instituto López Neyra. Avda. del Conocimiento, s/n. P.T. Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada, Spain, Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, s/n 18002 Granada, Spain, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18002 Granada, Spain, and INRA, UR83, Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France

Received June 6, 2007; Revised Manuscript Received January 4, 2008

ABSTRACT: Several mechanisms have been proposed to explain the interactions between proteins and mineral surfaces formed during biomineralization. To investigate the effect of the surface charge of proteins on calcium carbonate precipitation, a group of globular proteins with similar sizes and molecular weights but with different isoelectric points (iep) has been selected to be added to a CaCl₂ solution in free-drift calcium carbonate precipitation experiments. These proteins are lysozyme (Lyz; theoretical iep 9.32), ribonuclease-A (Rib-A; theoretical iep 8.64), myoglobin (Myo; theoretical iep 7.36), and α -lactalbumin (α -La; theoretical iep 4.83). Depending on their isoelectric point and their concentration in the solution, these proteins affected the nucleation, growth, polymorphism and growth morphology of calcium carbonate in different manners, evidencing different types of protein–surface interactions. For the protein with an acidic isoelectric point (α -La), electrostatic interactions were predominant. For proteins with isoelectric points around neutrality or slightly higher (Myo and Rib-A), the foremost interactions were hydrophobic with a certain electrostatic contribution. For the protein with a basic isoelectric point (Lyz), there was not any notable effect on most of the analyzed precipitation properties, evidencing a weaker protein–surface interaction.

1. Introduction

Biomineralization processes involve specific proteins that are released at different times during mineralized tissue formation.¹ These proteins play an important role in the control of the nucleation, polymorphic phase selection, morphology and orientation of crystals.^{2a–d} Several mechanisms have been proposed to explain the interactions between proteins and mineral surfaces in formation, among them a combination of electrostatic and stereochemical interactions, as well as geometrical matching.^{3a,b} For a better understanding of those mechanisms, it is useful to use systems in which only one kind of interaction predominates.⁴ Whether one kind of interaction is predominant will depend on protein characteristics (i.e., size, conformation, surface charge, type of functional groups), on biomineral composition and surface structure, and also on the solution properties, that is, chemical composition and pH. The protein surface charge and the electrical charge developed at the solid–solution interface are both dependent on the isoelectric point (iep) of the proteins, on the point of zero charge of the adsorbent, and also on the solution properties. Therefore such solution properties must have an important role in protein–surface interaction during the formation of biominerals.

The aim of the present study is to determine the effects on calcium carbonate precipitation (i.e., nucleation, growth, polymorphism, and crystal morphology) of a group of globular proteins with similar sizes and molecular weights but with different iep, within a wide range of pH values. This information will be useful to elucidate the kind of protein–surface interactions predominant during the precipitation. The four selected

model globular proteins are lysozyme (Lyz; theoretical iep 9.32, MW 14.313 Da), ribonuclease-A (Rib-A; theoretical iep 8.64; MW 13.690 Da), myoglobin (Myo; theoretical iep 7.36; MW 16.951 Da), and α -lactalbumin (α -La; theoretical iep 4.83; MW 16.224 Da).^{5a,b} They were chosen because their three-dimensional structures and their adsorption behaviors on different substrates are well characterized. Since the CaCO₃ precipitation experiments will be performed using a free-drift system containing the protein-bearing calcium solutions, the change in the pH values of such solutions during the course of the experiment will lead to a change in the surface charge of the protein. It was demonstrated by other authors that the surface charge is one of the most relevant parameters responsible for the differences observed in the adsorption behavior of these proteins on different types of hydrophilic and hydrophobic substrates.^{5a,6} The novelty of the present work is that protein–mineral interactions are studied under dynamic conditions since the mineral substrates are growing crystals.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Procedures. Certified chemical reagents were used to prepare stock solutions of CaCl₂ (Sigma, lot 110K0226) and NH₄HCO₃ (Sigma, lot 78H0114) and of the following commercial proteins: hen egg white lysozyme (Seikagaku lot E98301), bovine pancreatic ribonuclease-A (Sigma lot 9001 99 4), horse skeletal muscle myoglobin (Sigma lot 100684 32 0), and bovine milk α -lactalbumin (Sigma lot 9051 29 0). Lyz is found in the uterine fluid of hens as well as in the eggshell. The possible role of this and other uterine fluid proteins on eggshell calcification is actually under investigation. The function of Rib-A is RNA cleavage in the ruminant pancreas. Myo is classified as transport protein that delivers oxygen and carbon monoxide through the tissues. α -La is synthesized in the mammary gland and is essential for milk production.

Precipitation experiments were carried out by vapor diffusion using the sitting drop crystallization method on a “crystallization mushroom”^{7a,b} at 20 °C and 1 atm total pressure. Calcium carbonate precipitated in

* To whom correspondence should be addressed. E-mail address: jaime@lec.csic.es.

[†] Edificio Instituto López Neyra. Avda. del Conocimiento.

[‡] Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada.

[§] Departamento de Microbiología, Universidad de Granada.

^{||} Recherches Avicoles.

Table 1. CaCO₃ Precipitation in the Presence of Four Model Proteins (Lyz, Rib-A, Myo, and α-La) Using As Control Conditions 20 mM CaCl₂, 10 mM NH₄HCO₃, and $T = 20 \pm 1$ °C

run	[protein], μg/mL	TNC ^a	<i>t</i> _i ^b (min)	% CaCO ₃ polymorphs				<i>L</i> (μm) ± SE ^g	pH _i ^h	pH _f ⁱ
				C _R ^c	C _S ^d	A ^e	V ^f			
control	0	40–60	~600	63		15	22	92 ± 6	5.3	7.1
Lyz-1	16	49	500	55		21	24	76 ± 6		
Lyz-2	128	52		84		11	5	65 ± 5 and 113 ± 14	5.8	7.2
Lyz-3	512	60	700	84		10	6	68 ± 5 and 113 ± 8		
Lyz-4	2000	41	1400	61		21	18	57 ± 10 and 116 ± 8	6.1	7.0
Rib-A-1	16	43	1080	46	0	16	38	140 ± 9 and 288 ± 32	4.9	7.2
Rib-A-2	128	9	1500	44	13	0	43	130 ± 8 and 160 ± 33	4.6	7.3
Rib-A-3	512	3	1800	26	58	0	16	80 ± 17 and 260 ± 33	4.3	7.5
Rib-A-4	2000	0		0	0	0	0		4.1	7.8
Myo-1	16	38	1020	64	8	12	16	95 ± 9 and 280 ± 20	5.3	7.1
Myo-2	128	36	1320	90	6	0	4	80 ± 6 and 200 ± 15	5.7	7.2
Myo-3	512	11	1300	100		0	0	60 ± 18 and 300 ± 25	6.0	7.5
Myo-4	2000	0		0		0	0		6.5	7.8
α-La-1	16	123	÷500–1000	68		0	32	50 ± 8 and 100 ± 11	5.5	7.3
α-La-2	128	169	~1000	95		0	5	77 ± 4 and 100 ± 4	5.6	7.2
α-La-3	512	162		99		0	1	75 ± 3 and 85 ± 5	5.8	7.3
α-La-4	2000	0		0		0	0		6.0	7.5

^a Total number of crystals. ^b Induction time for the nucleation. ^c Rhombohedral calcite. ^d Spherical calcite. ^e Aragonite. ^f Vaterite. ^g *L* = average size; SE = standard error. ^h Initial pH in the drops. ⁱ Final pH in the drops.

drops containing 40 μL of a CaCl₂ solution (20 mM), whose pH was raised by the diffusion of NH₃ gas released by an underlying NH₄HCO₃ solution (10 mM). These control conditions were selected so that the total number of crystals precipitated (TNC) was small enough to be easily counted yet great enough to have good statistics and so that the size of crystals was optimal. Also, under these conditions, the polymorphs calcite, vaterite, and aragonite precipitated in such proportions as to make noticeable any effect of the tested proteins on their relative abundances.^{7a} Normally, after several runs using these reagent concentrations, the TNC was around 40–60, with 60–63% calcite, 15–20% aragonite, and 20–22% vaterite. In the protein-bearing experiments, the concentration of the CaCl₂ solution was kept constant at 20 mM while the concentrations of protein (0, 16, 128, 512 and 2000 μg/ml) were varied. This CaCl₂ solution with varying protein concentration is referred to here as the mother solution. To carry out the experiment, a drop of 40 μL of the mother solution was poured on each one of the ten microbridges already placed inside the crystallization mushroom. A volume of 3 mL of the NH₄HCO₃ solution (10 mM) was poured into the bottom container of the mushroom. The system was then closed and sealed with silicon grease. Three runs were carried out at each concentration to test for reproducibility. Experiments were finished after 48 h, the chambers were opened, and both solution and solid were withdrawn from the microbridges for chemical and morphological analyses.

2.2. Analytical Procedures. The pH value of the mother solutions was determined before and after each experiment using a pH electrode (Titan model, Sentron). Based on repeated measurements, the analytical error was estimated to be ±0.05. The concentrations of Lyz, Rib-A, and α-La in the mother solution were measured by the Layne method⁸ using a Varian Cary UV–Vis spectrometer at a wavelength of 280 nm, while the concentration of Myo was determined by the Bradford method.⁹ The time elapsed from the moment of closing the reactor until the appearance of the first precipitate in the microbridges (referred to here as induction time, *t*_i), the TNC, and the identification of the polymorphic phases were all determined using an optical microscope (SZH10 Olympus, 14×), based on characteristic morphologies of crystals associated with each phase. The errors for *t*_i and TNC were estimated to be ±5% and ±1%, respectively. A univocal relationship between morphology and crystalline phase in the absence of proteins was established in a previous study.^{7a} In case of ambiguity, the mineralogical composition of crystals was confirmed by X-ray diffraction using Cu Kα radiation (XRD; D-5000 Siemens) at a grazing angle of 1°. At the end of each run, the precipitate was harvested from the microbridges having been previously rinsed ten times with deionized Milli-Q water, dried at room temperature, and finally coated with gold and inspected with a field emission scanning electron microscope (FESEM, Gemini-1530). Calcite crystal forms were indexed based on the symmetry of crystal faces and by comparing them with a calcite morphological model built with Shape v7.2.1 (Shape Software, King-sport, TN).

Because of the small number of crystals precipitated in each drop, it was not possible to measure the precipitated mass by weighing crystals with accuracy. Therefore this parameter was roughly estimated using the number and phase of crystals, their average length *L* from field emission scanning electron microscopy (FESEM) pictures, and the density of either calcite (2.71 g/cm³), vaterite (2.54 g/cm³), or aragonite (2.93 g/cm³) depending on the particular crystalline phase precipitated, to convert volume to precipitated mass. In previous references,^{10a,b} a similar method was applied. In the present work, cubes and spheres (calcite), spheres and platelets (vaterite), and spheres and cylinders (aragonite) were considered as the most suitable simple geometrical models, despite the great morphological variety of the crystals obtained. The shape factors of these geometries were taken from the literature.^{10c}

Finally, the exposed ionizable amino acids at the surface of the four proteins were identified using the program AREAIMOL from the CCP4 program suite¹¹ based on Protein Data Bank (PDB) coordinates of their corresponding crystalline structures (Lyz,^{12a} Rib-A,^{12b} Myo,^{12c} and α-La^{12d}).

3. Results

3.1. Solution pH. The pH of the solution increased from 5.3 to 7.1 during a representative control experiment (protein-free; Table 2). The increment occurred primarily within the first 1.5 h. Thereafter, increases in pH became slower and the pH stabilized at 7.1. The presence of protein varied the initial pH of the mother solution. Thus, Lyz, Myo, and α-La increased the initial pH. This increase was higher as the protein concentration increased. In contrast, the trend in the pH values of solutions containing Rib-A was the opposite. The initial pH was lower than in the control experiment and decreased as the concentration increased. At the end of the experiment, pH values in protein-bearing experiments were generally similar to or higher than those in the (protein-free) control experiment.

The proteins affected the precipitation of CaCO₃ at different levels, that is, nucleation (*t*_i, TNC), growth (crystal dimensions and mass of crystals), polymorphism, and crystal morphology. Next we describe these effects in detail.

3.2. Effects of Proteins on Nucleation. The influence of proteins on CaCO₃ nucleation is illustrated in Figure 1 and Table 1. Moreover, Table 1 summarizes all relevant parameters of CaCO₃ precipitation using both protein-free (control) and protein-bearing solutions, including TNC, *t*_i, and the percentage of polymorphs calcite, vaterite, and aragonite.

The α-La at low concentrations of 16, 128, and 512 μg/mL promoted a very intense nucleation, as deduced from the high

Table 2. Physicochemical Properties of the Model Proteins Hen Egg-White Lysozyme (Lyz), Bovine Pancreatic Ribonuclease-A (Rib-A), Horse Skeletal Muscle Myoglobin (Myo), and Bovine Milk α-Lactalbumin (α-La)

protein	theor iep	exptl iep	MW (Da)	charged amino acids ^a		% exposed charged amino acid	
				positive ^b	negative ^c	positive	negative
Lyz	9.32	11.35 ^{15a}	14313	Lys1, Arg5, Lys13, Arg14, His15 , Arg21, Lys33 , Arg45, Arg61, Arg68, Arg73, Lys96 , Lys97, Arg112, Arg114, Lys116, Arg125, Arg128	Glu7, Asp18, Glu35 , Asp48, Asp52 , Asp66 , Asp87, Asp101, Asp119	18 ^d	10
Rib-A	8.64	9.6 ^{15b}	13690	Lys1, Lys7, Arg10, His12 , Lys31, Arg33, Lys37, Arg39, Lys41 , His48 , Lys61, Lys66, Arg85, Lys91, Lys98, Lys104 , His105 , His119	Glu2, Glu9, Asp14 , Asp38, Glu49 , Asp53, Asp83 , Glu86, Glu111, Asp121	18 ^e	10
Myo	7.36	7.2 ^{15c}	16951	Lys16 , His24 , Arg31, His36, Lys42, Lys45, Lys47, His48, Lys50, Lys56, Lys62, Lys63, His64 , Lys77, Lys78, Lys79, His81, His82 , Lys87, His93 , Lys96, His97 , Lys98, Lys102, His113, His116, Lys118, His119 , Lys133, Arg139 , Lys145, Lys147	Asp4, Glu6, Glu18, Asp20, Glu27, Glu38, Glu41, Asp44, Glu52, Glu54, Glu59, Asp60 , Glu83, Glu85, Glu105, Asp109, Asp122, Asp126, Glu136, Asp141 , Glu148	32 ^f	21
α-La	4.83	4.5 ^{15d}	16224	Lys5, Arg10, Lys13, Lys16, His32, Lys58 , Lys62, His68, Lys79, Lys93, Lys94, Lys98 , His107 , Lys108, Lys114, Lys122	Glu1, Glu7, Glu11, Asp14, Glu25 , Asp37 , Asp46, Glu49, Asp63 , Asp64, Asp78, Asp82, Asp83, Asp84, Asp87 , Asp88 , Asp97, Glu113, Asp116, Glu121	16 ^g	20

^a Buried amino acids are shown in bold (surface areas <50 Å²). ^b Lysine, arginine, and histidine. ^c Glutamate and aspartate. ^d Including 11 arginine. ^e Including four arginine and four histidine. Histidine can have an important effect on pH around neutrality. ^f Including two arginine and 11 histidine. Some histidine are buried and linked to the hemo group. ^g Including one arginine and three histidine.

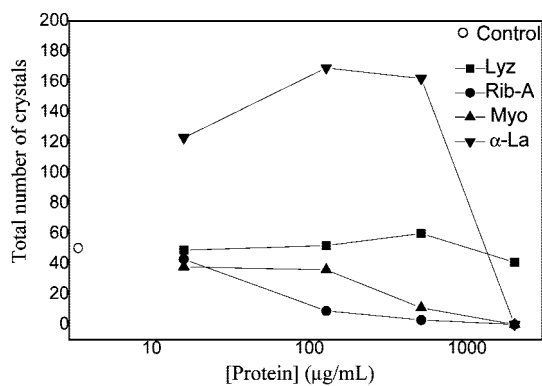


Figure 1. Total number of CaCO₃ crystals (TNC) precipitated as a function of the concentration of protein. α-La at 16, 128, and 512 µg/mL favors the nucleation of CaCO₃, increasing TNC. Rib-A and Myo slightly decrease TNC when their concentrations are increased from 16 to 512 µg/mL. α-La, Rib-A, and Myo (at 2000 µg/mL) inhibit CaCO₃ nucleation completely, decreasing TNC to 0. The effect of Lyz-bearing experiments on TNC is small compared with the control experiments. The open circle represents the control experiment in absence of protein.

value of TNC. Rib-A, and to a lesser extent Myo, slightly inhibited the nucleation with respect to the control experiment. When the concentration of these three proteins reached 2000 µg/mL a complete inhibition of CaCO₃ nucleation was observed. The effect of Lyz-bearing solutions on CaCO₃ nucleation was small in the concentration range from 16 to 2000 µg/mL. It was necessary to increase the Lyz concentration to 5000 µg/mL to reach a complete inhibition of the nucleation.

3.3. Effects of Proteins on Crystal Growth. The results of precipitated mass of CaCO₃ and average size of crystals (*L*) are shown in Figure 2 and Table 1.

As it is shown in Figure 2, the precipitation of CaCO₃ is favored in α-La-, Myo-, and Rib-A-bearing solutions at low protein concentrations. With these proteins, the estimated mass of precipitate at 16 and 128 µg/mL was higher than that in the control experiment. Further increases in protein concentration led to a decrease of the amount of precipitate, until it reached

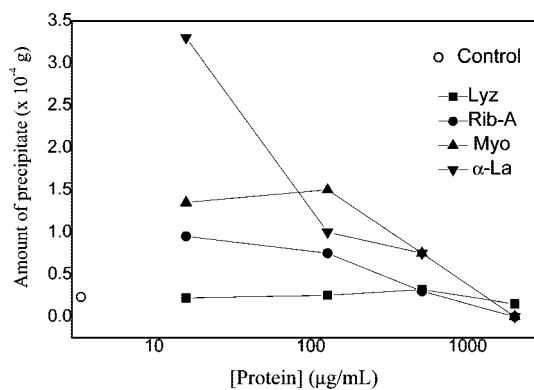


Figure 2. Estimation of the precipitated mass of CaCO₃ versus the concentration of protein. α-La, Myo, and Rib-A favor the precipitation of CaCO₃ at low concentrations of protein. As the concentration of the three proteins increases to 128 and 512 µg/mL the amount of precipitate gradually decreases, being 0 when the protein concentrations reached 2000 µg/mL. For Lyz-bearing experiments, no noticeable effect in the amount of precipitate with respect to the control experiment is observed in the interval from 16 to 2000 µg/mL.

0 at 2000 µg/mL protein concentrations. In the case of Lyz, no noticeable change in this parameter was observed with respect to the control experiment in the interval from 16 to 2000 µg/mL. In this case, CaCO₃ precipitation was not inhibited completely from mother solutions containing up to 5000 µg/mL.

Although it is a rough estimation, the observed decrease in the amount of precipitate from protein-bearing solutions containing a low protein concentration is worth noting (Figure 2). This decrease occurred following the trend (from acidic to basic proteins) α-La > Myo > RibA > Lyz, thus evidencing a negative correlation of this parameter with the isoelectric point of the model proteins at low protein concentrations.

On the other hand, it is shown in Table 1 that precipitates are polydisperse, with average crystal size *L* (edge length, diameter, or characteristic dimension) varying within a different size range depending on the protein tested. For crystals precipitated in the presence of α-La, *L* falls within the range

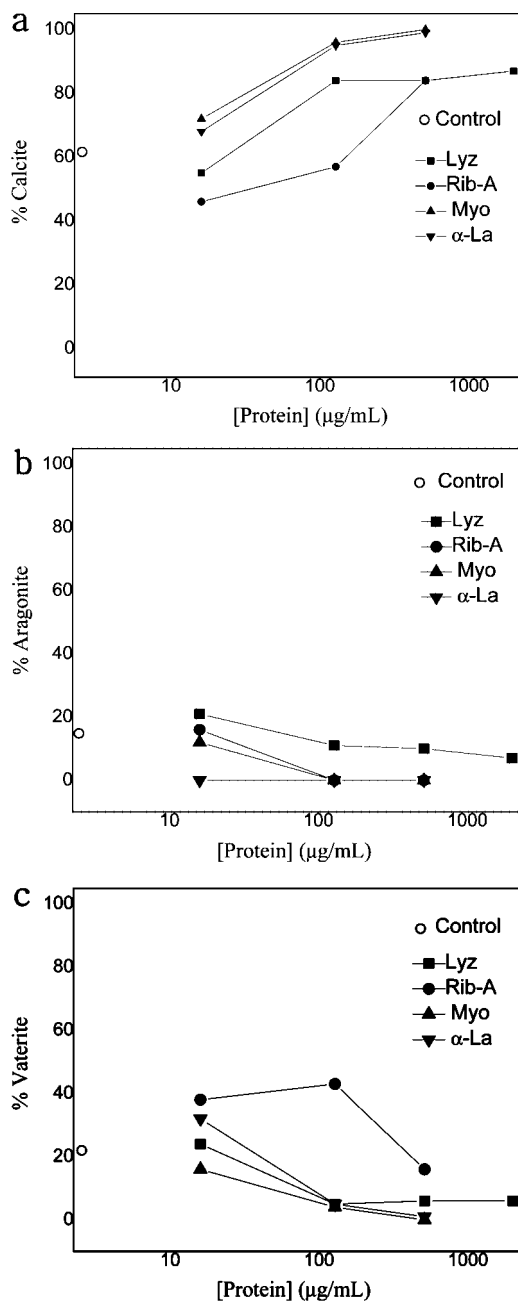


Figure 3. Influence of model globular proteins on the percentage of precipitated CaCO_3 polymorphs (a) calcite, (b) aragonite, and (c) vaterite.

50–100 μm , whereas for crystals precipitated in the presence of Myo, Rib-A, and Lyz, L falls within ranges of 60–300 μm , 80–288 μm , and 57–116 μm , respectively. In the control experiment, L was around 92 μm .

3.4. Effects of Proteins on Polymorphism. All model proteins favored the precipitation of calcite over aragonite and vaterite but to different degrees, as deduced from Figure 3a. The percentage of calcite in the precipitates increased from about 45% or 55% up to 85% or 87% in Rib-A- and Lyz-bearing solutions respectively. However, α -La and Myo were more effective in controlling calcite precipitation. Even using low concentrations of these two proteins (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$), the relative abundance of calcite reached almost 100%. Interestingly, α -La inhibited aragonite precipitation at very low concentration (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and also vaterite precipitation at higher concentrations (128 and 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Figure 3b,c).

3.5. Effects of Proteins on Crystal Morphology. Calcite crystals grown in protein-free solutions (control samples) were obtained in the form of isolated crystals (Figure 4a) with sizes around 90 μm , while aragonite and vaterite were observed as polycrystalline agglomerates (around 100 μm size) formed by smaller primary nanocrystals. Calcite crystals displayed the characteristic rhombohedral habits showing the {104} face (Figure 4a). Aragonite precipitated as needle-like agglomerates and vaterite as hexalobulated leaf-like agglomerates (Figure 4b,c), superstructures similar to those reported by Gehrke et al.¹³

In Lyz-bearing experiments, there was a little effect on the growth morphologies of the polymorphs compared with those from protein-free solutions (see Figure 5a–c). Meanwhile, at concentrations of Rib-A, Myo, and α -La higher than 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the growth morphology of the calcite phase was modified either by the appearance of new crystal faces (Figure 5d,g,j–l) or, in the cases of Rib-A and Myo (see Figure 5e,h,i), by the formation of rounded/curved polycrystalline agglomerates in the same droplet. Moreover, the biggest agglomerates were usually found at the gas–liquid–microbridge interfaces. An XRD diagram of those agglomerates collected from different droplets is shown in Figure 6. The diffractogram displays the three characteristic reflections of the calcite phase (JCPDS 5-586), that is, at $2\theta = 29.45^\circ$ ($d = 3.035 \text{ \AA}$), 36.00° (2.495 \AA), and 39.45° (2.285 \AA).

It is interesting to point out the noticeable effect of Rib-A on calcite morphology. At 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rib-A, the proportion of rounded calcite (C_S) is twice that of rhombohedral calcite (C_R). Rhombohedral calcite crystals are modified by the expression of new faces stabilized by these proteins. The newly expressed faces are {100} and {110} prismatic forms and {018} negative rhombohedra. The expression of these new faces is especially notable in the presence of α -La (protein concentration of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figure 5j,k,l).

Based on this, the four globular proteins studied in these experiments modified the growth morphology of precipitated calcite crystals. Among them, Rib-A, Myo, and α -La were more effective than Lyz at producing a more noticeable effect at lower concentrations (Figures 5d,g,j). Finally the most notable effect of these protein concentration on the morphology of the few aragonite and vaterite polymorphs was the crystal size reduction, as well as the size reduction of the constituting primary nanocrystals.

3.6. Surface Ionizable Amino Acids. Table 2 shows the positively (arginine, lysine, histidine) and negatively (aspartate, glutamate) exposed ionizable amino acids for each protein. The number accompanying the amino acid indicates its position in the primary sequence. Most of the ionizable amino acids are placed at the surface of the protein, so the protein surface is constituted by charged and hydrophobic patches with an irregular distribution. Taking into account the aqueous exposition of the ionizable groups, we have used the ExPasy ProtParam tool¹⁴ to calculate the theoretical isoelectric points. The experimental isoelectric points are also shown.^{15a–d} The differences observed between theoretical and experimental iep arise from the modification of the pK 's of the residues owing to the interaction of charged amino acids and the partial burial of charged amino acids.¹⁶

4. Discussion

Our results evidence the effect of the proteins on calcium carbonate nucleation, growth, phase selection, and morphology.

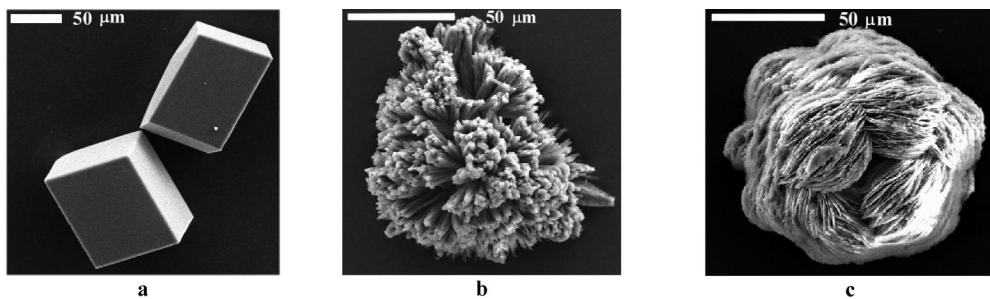


Figure 4. FESEM images of (a) calcite crystal rhombohedra, (b) aragonite needle-like agglomerate, and (c) vaterite leaf-like agglomerate.

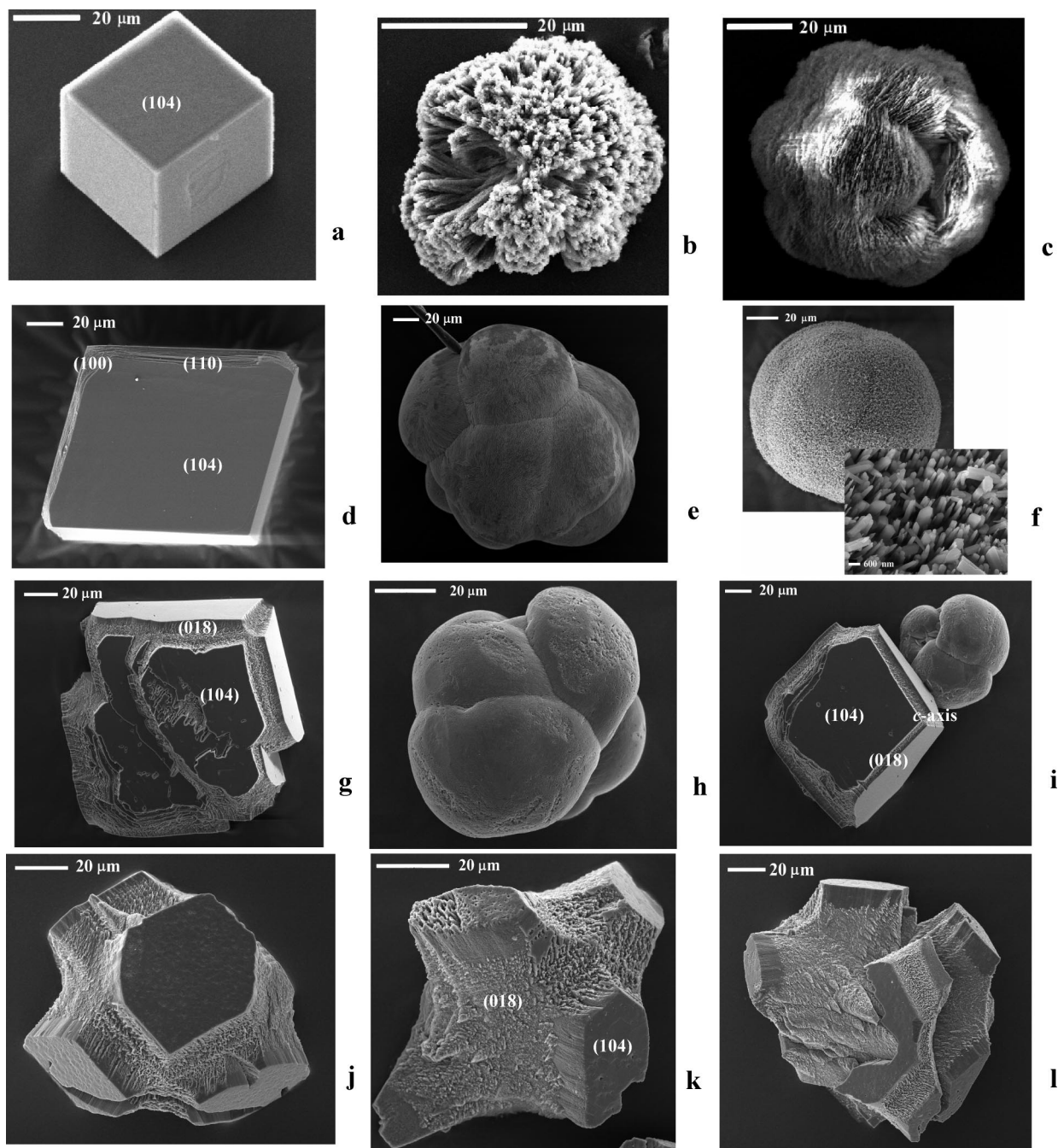


Figure 5. FESEM images of (a) calcite, (b) aragonite, and (c) vaterite with 128 μg/mL Lyz, (d, e) calcite and (f) aragonite with 128 μg/mL Rib-A, (g–i) calcite in presence of 128 μg/mL Myo, and (j–l) calcite in presence of 128 μg/mL α-La.

Also the results suggest that the surface charge and the type and amount of surface ionizable amino acids of the proteins,

which determine their iep, have some effect in the above-mentioned factors. Therefore, certain correlations between the

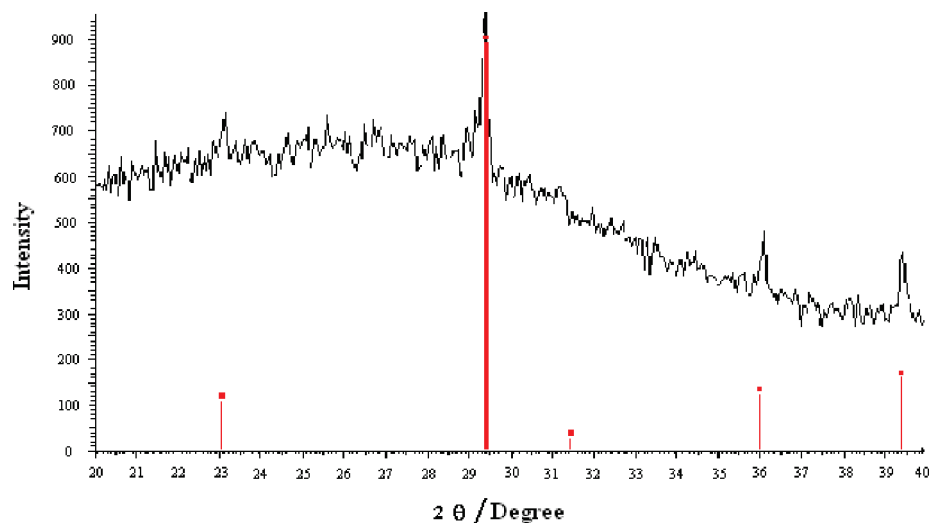


Figure 6. XRD diagram of rounded agglomerates of calcite obtained in Rib-A- and Myo-bearing experiments. The diffractogram displays the three characteristic reflections of the calcite phase (JCPDS 5-586), that is, at $2\theta = 29.45^\circ$ ($d = 3.035 \text{ \AA}$), 36.00° (2.495 \AA), and 39.45° (2.285 \AA).

isoelectric points of globular proteins and the CaCO_3 precipitation parameters can be established.

Modifications of calcium carbonate crystal growth^{2a} and dissolution behavior¹⁷ provide insights related to protein–mineral surface interactions. In both cases modifications of the calcite crystals habit are the result of the preferential adsorption of proteins to specific crystal faces, which become expressed as a consequence of the decrease in their growth (or dissolution) rate. Moreover, morphological effects on calcite growth (inhibition of specific crystal faces) vary depending on the nature of the surface charge of the protein.

In Rib-A- and Myo-bearing experiments, which showed the strongest effect on calcite morphology, two types of interaction occurred: (1) a specific protein–surface interaction on planes $\{110\}$, $\{100\}$, and $\{001\}$, which resulted in a morphological effect with the expression of those crystal faces, and (2) a nonspecific interaction, resulting in the precipitation of rounded agglomerates in the same drop. Such a strong nonspecific interaction probably takes place after the nucleation event, once the supercritical nuclei reach nanometric sizes, at the zone of highest supersaturation in the drops. This interaction induces a change in the growth mechanism of calcite from parabolic, which is produced at low to median supersaturation, to an aggregation–agglomeration mechanism, resulting in big (with respect to control size) rounded agglomerates. The aggregation–agglomeration mechanism¹⁸ was proposed to explain the relaxation of residual Gibbs free energy, ΔG , that occurs in highly supersaturated systems after the nucleation event. According to this mechanism the relaxation of residual ΔG takes place by decreasing the total available solid surface (by the aggregation of nanocrystals) rather than by crystal growth.

For a better understanding of the effect of the electrical charges of the globular proteins on the particular growth behavior of the polymorph calcite, it is necessary to consider the calcite surface speciation model proposed by Van Capellen and co-workers.¹⁹ According to this model, the hydrated calcite surface is composed of different types of surface species, these being responsible for the net calcite surface charge in aqueous suspensions. These surface species form by reactions between the neutral surface complexes $\text{<CO}_3\text{H}^\circ$ and <CaOH° and the soluble species $\text{Ca}^{2+}_{(\text{aq})}$, $\text{H}^+_{(\text{aq})}$, and $\text{CO}_{2(\text{aq})}$ that yield <CaOH_2^+ , <CO_3^- , $\text{<CO}_3\text{Ca}^+$, <CaHCO_3° , <CaCO_3^- , $\text{<CO}_3\text{H}^\circ$, and <CaOH° .

It has been demonstrated by using X-ray reflectivity measurements of the calcite $\{104\}$ –water interface at pH from 6.8 to 12.1 that the proportion of surface species does not vary significantly within this pH range.²⁰ At the zero point charge of calcite, pH_{pzc} , usually between pH 5 and 8, the fraction of positive and negative sites is the same, with a very small proportion of neutral species (less than 2% of <CaHCO_3°). An increment in the pH value has the effect of increasing the proportion of neutral species and deprotonation of 18% <CaOH_2^+ to yield more neutral <CaOH° species. When a suspension of calcite becomes Ca-rich (by, for instance adding Ca^{2+} ions to the solution), the ξ -potential varies from negative to positive values, which demonstrates a change of the calcite surface charge from negative to slightly positive.²¹ Those neutral or basic pH values and a Ca-rich environment closely resemble the solution from which calcite is precipitating in our experiments. Therefore, a slightly positive calcite surface charge with a high proportion of neutral surface species is plausible in our experiments.

Myo and Rib-A are globular proteins with iep intermediate between α -La and Lyz. The iep of Myo is within the range of variation of the solution pH in our experiments, whereas that of Rib-A is slightly above it. In the case of Myo, with 32 positively ionizable surface amino acids, 11 of them are histidines buried or with a surface area less than 50 \AA^2 , whereas there are 21 negatively ionizable amino acids. Because the pK of histidine is around 6–6.5, at neutral pH they will be ionized and the number of positively and negatively charged surface residues will be the same. Therefore the net charge of this protein (the balance between positively and negatively ionized surface residues) in our experimental conditions is very small or zero. At pH values close to the iep of the protein, the dominant adsorption mechanism on the surface of calcite is a hydrophobic interaction, which favors the dehydration of the proteins by their adsorption to a calcite surface.²² In the case of Rib-A, 4 of the 18 positively ionizable surface amino acids are arginine and four are histidine, whereas there are 10 negatively ionizable glutamate and aspartate residues. In our experimental conditions of pH, the net charge of Rib-A will be positive but very small; a hydrophobic protein–substrate interaction with an electrostatic contribution is expected. Because of the presence on the protein surface of four arginines with high

hydrophilic power, Rib-A can potentially form H-bonds with the substrate.

The hydrophobic interactions of Myo and Rib-A are unspecific and can occur, under high supersaturation conditions, once the supercritical calcite nuclei reach a certain nanometric size. This mechanism of hydrophobic interaction of proteins with the surface of small crystallites of calcite may account for the formation of the rounded agglomerates of calcite, as detailed above. Further cementation between primary particles is produced by crystal growth.

The hydrophobic interaction being predominant in protein-rich and highly supersaturated environments at pH values close to the isoelectric point of the protein, when conditions change toward low supersaturation or low protein concentrations, calcite crystals grow to micrometric size and the proteins act as impurities. These two mechanisms can act either at the same time in droplets containing Rib-A- or Myo-bearing solutions or successively one after the other. In the first case, the cause is the nonhomogeneity in the concentration of protein and calcium inside the droplets, which leads to zones with different supersaturation (i.e., solution–gas interface versus bulk solution). In the second one, the cause is the strong decrease of the CaCO₃ supersaturation and protein concentration that occurs after the first nucleation event. Following this reasoning, it would be plausible to expect a higher proportion of agglomerates by increasing the protein concentration. Indeed, we have increased the concentration of Rib-A up to 8000 µg/mL and obtained only rounded agglomerates.

Lyz has a very different effect on calcium carbonate than that of Myo and Rib-A. Lyz (theoretical iep 9.32, experimental iep 11.35) showed a weaker morphological influence on rhombohedral calcite, compared with that of Myo and Rib-A, even at the highest protein concentration studied. At the pH of our experiments, Lyz has the highest positive net charge of all the proteins tested. Therefore, Lyz has the weakest affinity for the slightly positively charged calcite surface. Therefore, to understand the weak adsorption process and the little effect on most of the analyzed precipitation parameters, it is necessary to look at the surface of the protein. Lyz has 18 positively surface charged amino acids, including 11 arginines, and only 10 negatively charged. Arginine has a high potential to form H-bonds being highly hydrophilic. The high content of arginine is responsible for the high solubility of Lyz in water. Because of the high proportion of surface arginine in this protein and its high capacity to form H-bonds, H-bonding between arginine residues and neutral surface species <CO₃H^o, <CaOH^o, and <CaCO₃^o could be responsible for the weakly observed Lyz–CaCO₃ surface interaction.

On the other hand, α-La does not yield rounded agglomerates of calcite, but it shows a strong effect on nucleation, precipitated mass, polymorph selection, and crystal morphology, even at the lowest protein concentration studied. Moreover, the appearance of new calcite faces is indicative of the existence of a specific interaction. The isoelectric point of α-La is 4.83 (exptl iep 4.5), and therefore, at the pH of our experiments the balance between negatively and positively charged surface residues (Table 2) leads to a negative net surface charge. Such a negative surface charge provides an important interaction with the positively charged calcite surface, increasing protein absorption on the calcite surface. This strong electrostatic interaction must be more specific toward the polar outermost surfaces of the growing crystals than toward the nonpolar stoichiometric ones, as is explained below, inhibiting their growth preferentially. The first types of surfaces are formed by planes of Ca and planes of CO₃

groups. However, the nonpolar surfaces, are formed by equal amounts of Ca and CO₃ groups, such as the {104} plane. Thus, the electrostatic interaction must take place between deprotonized negatively charged –COO[–] groups of the proteins and the positively charged <CO₃Ca⁺ species of the calcite surface.

It is also interesting to comment that the four proteins studied favor calcite precipitation over the other calcium carbonate polymorphs. The capacity that some organisms have to select the polymorphic phase is well-known.^{23a,b} There is evidence from many studies that organisms employ specialized organic macromolecules to control calcium carbonate precipitation. For instance, *in vitro* experiments have shown that specific soluble organic macromolecules composing the organic matrix from mollusk shell layers with different mineralogies are able to select the specific polymorphic phase of calcium carbonate.^{23a,b} Polymorph selection is achieved by these macromolecules by inhibiting the formation of one polymorph, thus allowing the selection of other polymorph.^{23a,b,24} Our results suggest that (1) globular proteins with different isoelectric points specifically inhibit either aragonite or aragonite and vaterite formation and (2) proteins with acidic isoelectric points require low concentrations to inhibit the formation of the above-mentioned polymorphs.

Moreover, our results evidence that the proteins have opposite effects over calcium carbonate precipitation depending on protein concentration, that is, at low concentration, proteins promote calcium carbonate precipitation, while at higher concentration they inhibit it. This effect is particularly evident when using α-La. This ambivalent behavior of proteins is characteristic of crystallization inhibitors that have a strong affinity for target crystal surfaces.^{25a,b} At low concentrations of the inhibitors and when there is an excess of material supply for crystal growth, they act as substrates promoting nucleation and favoring precipitation due to stereochemical affinity with the crystal surface.²⁶ In contrast, at higher concentration of the inhibitors, they bind to the crystal surface growth sites and inhibit precipitation.²⁷ Furthermore, it has been demonstrated that the effect of the inhibitors increases as they are more negatively charged.^{25a,b} Our results are in agreement with these observations.

There are several possible mechanisms by which these proteins could affect calcium carbonate precipitation: (1) Proteins in solution locally raise Ca²⁺ concentrations in those regions close to negatively charged patches on the protein surface^{2a,3a} (the ionotropic effect). This creates local areas with higher supersaturation values than those of the bulk solution. Nucleation would be favored in these areas, even when supersaturation in the bulk solution is not the critical supersaturation to produce nucleation. Therefore, proteins act as nucleation centers promoting nucleation and increasing the precipitation rate. The importance of the ionotropic effect increases as the negative charge of proteins increases. Our results are in accordance with this hypothesis, since we observed a trend of increasing precipitated mass of calcium carbonate with more acidic isoelectric point of the proteins; in other words, with more negatively charged proteins. (2) Some of these proteins (i.e., α-La) that have an affinity for calcium and act as chelating agents reduce the available calcium concentration in solution and the effective bulk supersaturation. A reduced amount of Ca exhausts crystal growth and inhibits precipitation of calcium carbonate. (3) Proteins can adsorb to the incipient crystals and block their accessible surfaces, impeding further crystal growth.

According to our results, the ionotropic effect seems to be important only when low concentrations of proteins having an

acidic isoelectric point are used. In contrast, at higher concentrations of all the proteins tested, the chelating effects of proteins or the adsorption of proteins to the growing surface, or both become dominant, inhibiting precipitation (with the exception of Lyz) and suppressing it totally at about 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5. Conclusions

The presence of globular proteins with different isoelectric points controls the precipitation of calcium carbonate at four different levels. First, proteins control nucleation. At low concentrations (16, 128, and 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$), α -La favors the nucleation of CaCO_3 , increasing the number of crystals, while Rib-A and Myo inhibit nucleation. At high concentrations, all three proteins inhibit nucleation. The effect of Lyz on CaCO_3 nucleation is small in the concentration range from 16 to 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It is necessary to increase the Lyz concentration up to 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to reach a complete inhibition of CaCO_3 nucleation. Second, proteins control crystal growth. At low protein concentration, the combined effect of proteins on nucleation and growth produces a progressive decrease of the precipitated mass of CaCO_3 with increasing isoelectric point of the proteins. Third, proteins control polymorphism. The four proteins studied, when used at specific concentrations, favor calcite precipitation over the other polymorphs, aragonite and vaterite. It is possible to completely inhibit either aragonite or aragonite and vaterite precipitation using globular proteins with progressively lower isoelectric points. Finally, proteins control crystal morphology. The effect of proteins on the morphology of calcite crystals is either the appearance of new faces (Rib-A, Myo, and α -La) or the formation of big polycrystalline rounded agglomerates (Rib-A and Myo). There is not an appreciable effect of Lyz on CaCO_3 morphology.

Comparative studies like the present one are useful to understand the role of the charge and of the type and amount of ionizable amino acids of proteins on CaCO_3 precipitation. Using globular proteins with different iep allows control of CaCO_3 precipitation parameters. Our results provide insights in understanding mineral precipitation control in organisms. Further studies of these kinds of mechanisms will be helpful to understand the role of macromolecules in the mineral deposition by biological organisms.

Acknowledgment. This work has been partially financed by the Projects "EggDefence" of the CE VFP, PIE200630I133 of Spanish CSIC, and MAT2006/11701 of the Spanish Ministry of Education and Science. A.H.H., J.G.M., and J.M.G.R. belong to the research team "Factoría de Cristalización" (Consolider-Ingenio 2010). A.H.H. acknowledges a fellowship from CONACYT (México). A.R.N. and C.J.L. acknowledge financial support through the Programa Ramón y Cajal (Spain). Ana Cámara-Artigas is kindly acknowledged for helpful assistance in identifying surface ionizable residues of the proteins and Carlos Ruiz for English revision.

References

- (1) Lowestand, H. A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press: New York, 1989.
- (2) (a) Addadi, L.; Weiner, S. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 153–169. (b) Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S.; Addadi, L. *Science* **1996**, *271*, 67–69. (c) Belcher, A. M.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Acta Mater.* **1998**, *46* (3), 733–736. (d) Nys, Y.; Hincke, M. T.; Arias, J. L.; Garcia-Ruiz, J. M.; Solomon, S. E. *Poult. Avian Biol. Rev.* **1999**, *10*, 143–166.
- (3) (a) Addadi, L.; Moradian, J.; Shay, E.; Maroudas, N. G.; Weiner, S. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 2732–2736. (b) Mann, S.; Archibald, D. D.; Didymus, J. M.; Douglas, T.; Heywood, B. R.; Meldrum, F. C.; Reeves, N. J. *Science* **1993**, *261*, 1286–1292.
- (4) Rodríguez-Navarro, A.; García-Ruiz, J. M. *Eur. J. Mineral.* **2000**, *12*, 609–614.
- (5) (a) Arai, T.; Norde, W. *Colloids Surf.* **1990**, *51*, 17–28. (b) Haynes, A. C.; Norde, W. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1994**, *2*, 517–566.
- (6) Haynes, A. C.; Norde, W. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *164*, 394–409.
- (7) (a) García-Ruiz, J. M.; Hernández-Hernández, M. A.; Gómez-Morales, J. *Ind. Crystal. VDI-Ber. Nr.* **2005**, *1901*, 963–968. (b) Jiménez-López, C.; Rodríguez-Navarro, A.; Domínguez-Vera, J. M.; García-Ruiz, J. M. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67*, 1667–1676.
- (8) Layne, E. *Methods Enzymol.* **1957**, *3*, 447–455.
- (9) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- (10) (a) Jiménez-López, C.; Caballero, E.; Huertas, F. J.; Romanek, C. S. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2001**, *65* (19), 3219–3231. (b) Romanek, C. S.; Grossman, E. L.; Morse, J. N. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1992**, *56*, 1, 419–430. (c) Myerson, A. S. *Handbook of Industrial Crystallization*, 2nd ed.; Butterworth Heinemann: Woburn, MA, 2002.
- (11) CCP4: Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography; *Acta Crystallogr.* **1994**, *D50*, 760–763.
- (12) (a) Wang, J.; Dauter, M.; Alkire, R.; Joachimiak, A.; Dauter, Z. *Acta Crystallogr.* **2007**, *D63*, 1254–1268, PDB ID 2VB1. (b) Chatani, E.; Hayashi, R.; Moriyama, H.; Ueki, T. *Protein Sci.* **2002**, *11*, 72–81, PDB ID 1FS3. (c) Maurus, R.; Overall, C. M.; Bogumil, R.; Luo, Y.; Mauk, A. G.; Smith, M.; Brayer, G. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1997**, *1341*, 1–13, PDB ID 1WLA. (d) Chrysin, E. D.; Brew, K.; Acharya, K. R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 37021–37029, PDB ID 1F6S.
- (13) Gehrke, N.; Cölfen, H.; Pinna, N.; Antonietti, M.; Nassif, N. *Cryst. Growth Des.* **2005**, *5* (4), 1317–1319.
- (14) Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M. R.; Appel, R. D.; Bairoch, A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; In *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J. M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2005; pp 571–607.
- (15) (a) Wetter, L. R.; Deutsch, H. F. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *192*, 237–242. (b) Schomberg D., Salzman, M., Eds. *Enzyme Handbook*; Springer-Verlag: Berlin, 1990; Vol 3, pp 1–3; under E.C. 3.1.27.5. (c) Bhowan, A. S. *Handbook of Protein*; A&M Publications: Birmingham, AL, 1990; pp 5–21. (d) Zittle, C. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **1956**, *64*, 144–151.
- (16) Creighton, T. *Proteins: Structures and Molecular Properties*, 2nd ed.; W. H. Freeman & Co: New York, 1993.
- (17) Teng, H. H.; Dove, P. M. *Am. Mineral.* **1997**, *82*, 878–887.
- (18) Rodríguez-Clemente, R.; López-Macipe, A.; Gómez-Morales, J.; Torrent-Burgués, J.; Castaño, V. M. *J. Eur. Ceram. Soc.* **1998**, *18*, 1351–1356.
- (19) Van Capellen, P.; Cherlet, L.; Stumm, W.; Wersin, P. *Geochim. Cosmochim. Acta* **1993**, *57*, 3505.
- (20) Fenter, P.; Geissebühler, P.; DiMasi, E.; Sjafer, G.; Sorensen, L. B.; Sturchio, N. C. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2000**, *64* (7), 1221.
- (21) Cicerone, D. S.; Regazzoni, A. E.; Blesa, M. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *154*, 423.
- (22) Haynes, A. C.; Norde, W. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1994**, *2*, 517–566.
- (23) (a) Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S.; Addadi, L. *Science* **1996**, *271*, 67–69. (b) Belcher, A. M.; Wu, X. H.; Christensen, R. J.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Nature* **1996**, *381*, 56–58.
- (24) Thompson, J. B.; Paloczi, G. T.; Kindt, J. H.; Michenfelder, M.; Smith, B. L.; Stucky, G.; Morse, D. E.; Hansma, P. K. *Biophys. J.* **2000**, *79*, 3307–3312.
- (25) (a) Cody, R. D. *J. Sediment. Petrol.* **1991**, *61*, 704–718. (b) Badens, E.; Veessler, S.; Boistelle, R. *J. Cryst. Growth* **1999**, *198*, 704–709.
- (26) Lahav, M.; Leiserowitz, L. *J. Phys. (Paris)* **1993**, *D26*, B22–B31.
- (27) Black, S. N.; Bromley, L. A.; Cottier, D.; Davey, R. J.; Dobbs, B.; Rout, J. E. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1991**, *87*, 3409–3414.

CG070512Q

Manuscrito 3. Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃).

Influencia de la presencia de proteínas de la matriz de la cáscara de huevo en la precipitación de CaCO₃.

La cáscara de huevo de gallina es un modelo relativamente sencillo de biomineralización controlada de carbonato cálcico. Durante su crecimiento, intervienen diferentes componentes orgánicos (p.ej., proteínas) que regulan la precipitación del carbonato cálcico y que definen tanto la composición mineral y organización final de este material. En particular, estos componentes orgánicos, regularían el flujo de nucleación, la fase polimórfica en la que cristaliza el carbonato cálcico (calcita) y la terminación de la deposición. Para comprender mejor el papel que juegan las proteínas presentes en la matriz orgánica de la cáscara de huevo y los mecanismos de actuación, se ha estudiado como afectan las proteínas de la matriz orgánica en la precipitación del carbonato cálcico. Para ello se han extraído y purificado una serie de fracciones proteicas de la matriz orgánica de la cáscara de huevo y posteriormente se ha estudiado el efecto de estas fracciones sobre el proceso de precipitación de carbonato cálcico.

Estas fracciones se extrajeron de muestras de cáscara de huevo de gallina que se desmineralizaron con una solución de ácido acético al 20 %. Del extracto primario obtenido se separaron tres fracciones pre-purificadas: A, B y C. De estas fracciones solo se utilizaron las fracciones A y B para los estudios de cristalización de carbonato cálcico. Las características de estas fracciones fueron las siguientes: a baja fuerza iónica la FRACCION A esta compuesta de proteínas solubles a pH 5 y a pH 9.5 y la FRACCION B a baja fuerza iónica esta compuesta de proteínas insolubles a pH 5 pero soluble a pH 9.5 a alta y baja fuerza iónica. Estas fracciones fueron a su vez purificadas usando técnicas de cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrofóbica y finalmente pasadas por cromatografía de filtración en

gel. Posteriormente, se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE, con objeto de identificar los componentes individuales de cada una de las fracciones y calcular su peso molecular aparente. De las fracciones A y B se seleccionaron las siguientes fracciones purificadas mediante cromatografía: g, h, n, r (obtenidas a partir de la FRACCION A), y las fracciones: c', g', i', k' (obtenidas a partir de la FRACCION B). Estas fracciones purificadas se analizaron mediante electroforesis en gel teñido con Sypro Ruby Protein Gel Stain y detectadas usando un transiluminador de luz UV. A partir del gel se extrajeron las diferentes bandas para su posterior secuenciación mediante espectrometría de masas.

Los perfiles de electroforesis de las fracciones h, g, n, r, y de las fracciones c', g', i', k' muestran varias bandas, debido a la alta complejidad composicional de la matriz orgánica. Las bandas teñidas más intensamente que aparecen en las fracciones anteriormente mencionadas corresponden a: 1) En la fracción h: proteínas específicas de la quiescencia y cadena A de la ovocleidina-17; 2) En la fracción g: ovotransferrina, ovomucoide, proteínas específicas de la quiescencia y ovocleidina-116; 3) en la fracción n: ovotransferrina, preproalbumina, hemopoxina, precursor de ovoinhibidor, cistatina; 4) en la fracción r: proteínas específicas de la quiescencia, cadena A de ovocleidina-17 y secuencias no-identificadas; 5) en la fracción c': clon AGENAE no identificado, cadena A de ovocleidina-17 y precursor de lisozima C; 6) en la fracción i': clusterin, ovocalixina-116, proteínas con repeticiones tipo EGF y proteínas que contienen dominios tipo I discoindina 3 [Homo sapiens]; 7) en la fracción k': una mezcla de cistatina, ovocleidina-116, glipican 4, ovoalbumina, ovocalixina-32, clusterina, ovocalixina-36, ovotransferrina y lisozima. Únicamente la fracción g' presentó un alto grado de pureza y una única banda teñida que se identificó como ovocleidina-116.

Para el estudio *in vitro* del efecto de la presencia de las diferentes fracciones de la matriz orgánica sobre la precipitación con carbonato cálcico, se ajustó la concentración de dichas fracciones a una concentración final de proteína de 50 µg/mL. Los experimentos se realizaron utilizando el sistema de “la seta de cristalización”, el cual ha sido descrito en detalle anteriormente. El estudio detallado

de los resultados de los experimentos de precipitación muestra que la presencia de las diferentes fracciones afectó a la precipitación de carbonato cálcico a diferentes niveles modificando el flujo de nucleación, selección polimórfica, morfología de los cristales como se detalla a continuación:

a) *Control de la nucleación*: Las diferentes fracciones tuvieron un efecto muy diferente sobre el flujo de nucleación. Algunas de ellas (fracciones h, r, k') fueron especialmente activas y produjeron una reducción muy notable (de 10 veces menos que en el control) del número de cristales en la gota. Este fuerte efecto inhibitorio de la nucleación, se podría deber a que algunas de las proteínas presentes en estas fracciones actúan como agentes quelantes, disminuyendo la concentración de calcio disponible y reduciendo de manera importante los valores de sobresaturación efectiva en el volumen de la solución; b) *Control sobre el polimorfismo*: En los experimentos de control, precipitan los tres polimorfos más comunes del carbonato cálcico (calcita, aragonito o vaterita). En cambio, en presencia de todas las fracciones estudiadas (h, g, n, r, y c', g', i', k'), la única fase que precipita es calcita. Estos resultados refuerzan la idea de que el proceso de mineralización, del carbonato cálcico en organismos, se controla mediante determinados componentes de la matriz orgánica, como ya se había demostrado en otros organismos. En particular, Falini y col., (1996) demuestran que ciertos componentes de la matriz orgánica de conchas de moluscos seleccionan, en experimentos *in vitro*, el mismo tipo de fase polimórfica que aparece en el biomineral de donde han sido extraídas las proteínas; c) *Control sobre la morfología del cristal*: Todas las fracciones estudiadas modificaron de manera notable la morfología de los cristales de calcita precipitados y favorecieron una agregación de los cristales de calcita. Sin embargo, el efecto morfológico de cada una de las fracciones estudiadas sobre los cristales de calcita es diferente como veremos a continuación. Por ejemplo, la presencia de la fracción h produjo cristales de calcita modificados que mostraban aparte de las caras del romboedro, nuevas caras que corresponden a las formas prismáticas {100} y {110}. Este cambio en la morfología, con respecto del control, se debe a una absorción selectiva de las proteínas sobre determinadas caras cristalográficas de los cristales de calcita. Esta interacción específica entre la superficie de las proteínas y la superficie del cristal en formación hace que aparezcan

nuevas caras cristalográficas en los cristales de calcita que no aparecían en los experimentos de control. Las fracciones g y n produjeron la aparición de cristales esféricos formados por caras no singulares que muestran un crecimiento en terrazas escalonadas. Un efecto similar lo produce la ovotransferrina, proteína que está presente en estas fracciones y que podría ser responsable de este efecto morfológico tan marcado aunque inespecífico. Curiosamente, cristales con este tipo de morfología recuerdan a los cristales de calcita de la capa mamilar de la cáscara de huevo. La fracción r, favoreció la formación de esferulitos de calcita formados por aglomerados de nanocristales prismáticos y bandeados de libre ensamblaje. Las fracciones c', g', i', y k', también favorecen la formación de aglomerados globulares, compuestos de nanocristales esféricos orientados en columnas. Por otra parte, la fracción g', compuesta principalmente por ovocleidina-116, que es una de las proteínas principales que aparece en la capa palizada de la cáscara de huevo, produce un efecto muy marcado en la morfología de los cristales de calcita *in vitro*. La fracción k' (una de las fracciones de composición más compleja) produce un efecto similar al de la fracción anterior, ya que también contiene ovocleidina-116.

En conclusión, en este estudio se ha observado que los diferentes componentes de la matriz orgánica analizados influyen de manera muy marcada en el proceso de precipitación de carbonato cálcico en experimentos *in vitro*. Es especialmente relevante, el control que ejercen sobre el proceso de nucleación, polimorfismo (seleccionado solo a la calcita) y morfología de los cristales. Estos resultados demuestran que estos componentes tienen un papel fundamental en la regulación del proceso de mineralización de la cáscara de huevo y determinan su composición mineralógica y microestructural.

Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO₃)

A. Hernández-Hernández^{a,1}, M.L. Vidal^b, J. Gómez-Morales^{a,*}, A.B. Rodríguez-Navarro^c, V. Labas^d, J. Gautron^b, Y. Nys^b, J.M. García Ruiz^a

^aLaboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-UGRA), Edificio López Neyra, PT Campus de la Salud, Avda. Conocimiento, s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

^bINRA, UR83, Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France

^cDepartamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, 18002 Granada, Spain

^dINRA, UMR85 Physiologie de la Reproduction et des Comportements, F-37380 Nouzilly, France

Available online 3 December 2007

Abstract

To understand the role of eggshell organic matrix on the biomineralization process, we have tested the influence of different purified fractions of the eggshell organic matrix on calcium carbonate (CaCO₃) precipitation. Purification was carried out after successive anion-exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography of two different prepurified eggshell extracts (A) and (B); the purified fractions (named *g*, *h*, *n* and *r*) and (*c'*, *g'*, *i'*, *k'*) respectively were diluted to 50 µg/ml before being tested *in vitro* and analysed by the sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) procedure and mass spectrometry. The precipitation experiments were carried out by the method of vapour diffusion on *crystallization mushrooms*. Each purified fraction showed a different effect on CaCO₃ precipitation. Some of them exhibited a strong inhibitory effect on nucleation, thus suppressing the precipitation of CaCO₃ almost totally while the others did not produce any notable effect. However, all fractions favoured the precipitation of calcite over the other CaCO₃ polymorphs. Additionally, all fractions modified in a different manner the size and morphology of the precipitated calcite crystals.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: A1. Biocrystallization; A1. Morphology; A1. Nucleation; B1. Biomacromolecules; B1. Calcium compounds

1. Introduction

The hen eggshell is a protective barrier for the egg content which allows the extrauterine development of the chick embryo [1]. It consists mainly of a mineral part (>95%) made of columnar calcite crystals and a pervading organic matrix (1–3.5% of the remaining material), making a composite structure with excellent mechanical properties [1,2]. It is deposited while the egg is residing in the hen's uterus, or shell gland, in less than 20 h. Three different stages during eggshell formation can be differentiated, namely (a) initial, (b) fast growth and (c) termination.

Eggshell deposition starts with calcium carbonate (CaCO₃) spheruliths nucleating on the eggshell membranes at the initial stage. The growth continues until adjacent spheruliths fuse together. Then, columnar crystals (palisades) emerge from the spherules during the fast growth stage. Columnar crystal growth proceeds until eggshell calcification is terminated with the deposition of the cuticle layer (termination stage). Fig. 1 shows the texture of the final hen eggshell.

Calcite crystals forming the eggshell precipitate in the uterine fluid, an acellular milieu containing ionized calcium and bicarbonate greatly in excess of the solubility product of calcite, as well as the native and soluble organic precursor of the shell matrix [3]. Eggshell organic matrix is composed by proteins, glycoproteins and proteoglycans in the calcified layers and by different types of collagens in the eggshell membranes. Three groups of molecules have

*Corresponding author. Tel: +34 958 181643; fax: +34 958 181632.

E-mail addresses: hernanh@ugr.es (A. Hernández-Hernández), jaime@lec.csic.es (J. Gómez-Morales).

¹Tel.: +34 958 181644; fax: +34 958 181632.

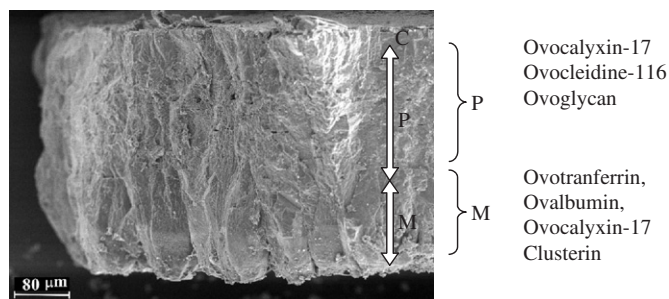


Fig. 1. FESEM image of the eggshell cross-section showing the mammillary layer (M), the palisade (P), the cuticle (C) and some of the identified eggshell proteins.

been found in eggshell: ubiquitous components such as osteopontin and clusterin [4–6], egg white proteins such as ovalbumin, lysozyme, ovotransferrin, and organic constituents unique to the process of shell calcification. The last group comprises dermatan and keratan proteoglycans [2,7] as well as ovocleidins and ovocalyxins [4,5,8]. Some of these organic components are thought to regulate the shell mineralization and particularly crystal growth. There is a variety of experimental evidence for these assumptions [1,8–11].

The aim of this study is to evaluate the effects of different purified fractions containing an array of eggshell organic matrix components on CaCO_3 precipitation, in particular on the nucleation process, polymorphism and morphology of the CaCO_3 crystals. This information is useful to identify active components participating in the eggshell mineralization and to elucidate their role in eggshell calcification.

2. Experimental procedure

2.1. Preparation and purification of eggshell extracts

Organic matrix proteins were extracted by demineralization of the eggshells of 50 hen eggs using acetic acid as a demineralizing agent [5]. Two different prepurified fractions corresponded to (A) supernatant of eggshell extract and (B) pellets solubilized in 10 mM diethanolamine DEA/HCl, 1 M NaCl, were extracted from the initial crude eggshell extract. Characteristics of these fractions are the following: at low ionic strength, fraction A is composed of proteins soluble at pH 5 and 9.5, and fraction B is composed of proteins insoluble at pH 5 at low ionic strength but soluble at pH 9.5 at high and low ionic strengths.

Fractions A and B were further purified by anion-exchange chromatography ($7.5 \times 50 \text{ mm}^2$ 300VHP575P Vydac column $5 \mu\text{m}$, Vydac, Hesperia, USA) using 10 mM (DEA)/HCl, pH 9.5 (buffer A) and 10 mM DEA/HCl, 1 M NaCl, pH 9.5 (buffer B) as the mobile phases with flow rate of 1 ml/min. Then some of the collected fractions were submitted to hydrophobic interaction

chromatography ($0.7 \times 2.5 \text{ cm}^2$ phenyl sepharose high performance HiTrap Amersham column, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) using 50 mM NaP, 1.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7 (buffer A) and 50 mM NaP, pH 7 (buffer B) as the mobile phases, flow rate of 1 ml/min; protein elution performed with a gradient from 1.5 to 0 M of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in 10 min, and finally, selected fractions were separated by gel filtration chromatography (7.5×60 TSK-gel G2000SW column, Tosoh Bioscience, Hampton, UK) using 50 mM NaP, 0.3 M NaCl, pH 7 as the mobile phase (flow rate of 0.6 ml/min). Between the various steps of purification fractions were dialysed and concentrated. From soluble eggshell extracts we obtained purified fractions *h*, *g*, *n* and *r*, and from initially insoluble eggshell extracts, the purified fractions *c'*, *g'*, *i'* and *k'*. The total amount of protein in the purified fractions was measured by the Bradford procedure (kit Uptima UPF8640 Coo Protein Assay, Interchim, Montluçon, France). Protein concentration of fractions (700–6500 $\mu\text{g/ml}$) was adjusted by dilution to 50 $\mu\text{g/ml}$ before being tested *in vitro*. To identify individual components the apparent molecular weights of components of these fractions were determined by the SDS-PAGE technique [11] and each band was submitted to digestion by trypsin. The amino acid sequences from the different peptides were obtained by LC-MSMS: nanochromatography (CapLC, Waters, Mildford, USA) coupled to mass spectrometry (ESI/Q-TOF, Waters, Mildford, USA).

2.2. Precipitation experiments

Certified chemical reagents and Milli-Q water (Millipore) were used to prepare stock solutions of CaCl_2 (Sigma, Lot. 110K0226) and NH_4HCO_3 (Sigma, Lot. 78H0114). Precipitation experiments were carried out by vapour diffusion using the sitting drop method on “crystallization mushrooms” (Triana Science & Technology, S.L., Granada, Spain) [13], at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ and 1 atm. Two *mushrooms* containing 10 microbridges were run in parallel. A *mushroom* for fractions *h*, *g*, *n*, and *r*, and the other one for *c'*, *g'*, *i'* and *k'*. Each *mushroom* contained two microbridges to allocate 40 μl drops of the control solution (20 mM CaCl_2) and eight microbridges to allocate the protein-bearing solutions. They were composed of 38 μl of the diluted purified fraction (50 $\mu\text{g/ml}$) plus 2 μl 400 mM CaCl_2 . A 3 ml of the NH_4HCO_3 solution (10 mM) was poured into the bottom container of the *mushroom*. The system was closed and sealed with silicon grease. The precipitation reaction was initiated by the simultaneous diffusion of NH_3 gas and CO_2 gas released by the underlying NH_4HCO_3 solution. The pH, recorded in a preliminary control experiment, started at 5.2 and increased progressively to 8.3.

The time elapsed from the moment of closing the *mushrooms* until the appearance of the first precipitate (induction time, t_i), the total number of crystals precipitated in the microbridges (TNC) and the identification of polymorphs, were all determined using an optical

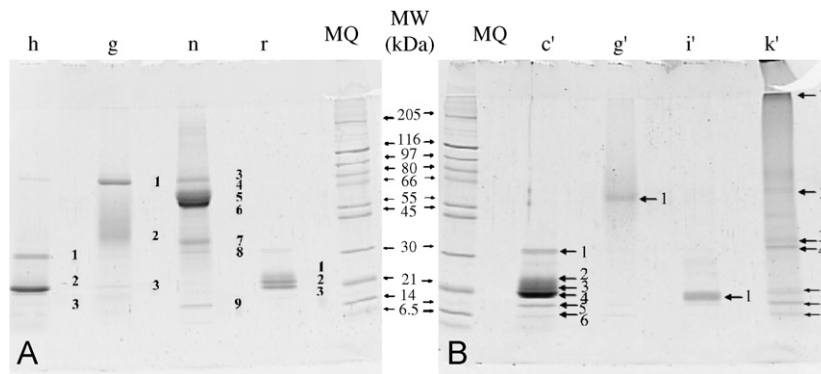


Fig. 2. SDS-PAGE of purified fractions obtained from fractions A and B after successive anion-exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography. *h*: (1) clone AGENAE: non-identified, CFAD-pig complement factor D precursor (C3 convertase activator, adipsin), (2) quiescence-specific protein, (3) quiescence-specific protein, ovocleidin-17, chain A; *g*: (1) ovotransferrin, (2) ovomucoid, (3) quiescence-specific protein, ovocleidin-116; *n*: (3) ovotransferrin, preproalbumin, (4) preproalbumin, ovoinhibitor precursor, (5) preproalbumin, hemopoxin, (6) hemopoxin, vitamin-D binding protein precursor, (7) ovoinhibitor precursor, (8) EGF-like repeats and discoidin, (9) cystatin; *r*: (1) quiescence-specific protein, (2) quiescence-specific protein, ovocleidin-17, chain A, (3) non-identified sequences; *c'*: (1) non-identified sequence (2) ovocleidin-17, chain A, quiescence-specific protein, (3) ovocleidin-17, chain A, (4) ovocleidin-17, chain A, lysozyme C precursor, (5) no sequence; *g'*: (ovocleidin-116); *i'*: clusterin, ovocalyxin-116, EGF-like repeats and discoidin I-like domains containing protein 3 [*Homo sapiens*]; *k'*: (1) cystatin, ovocleidin-116, glypican 4, ovalbumin, and ovocalyxin-32, (2) glypican 4, clusterin, ovocalyxin-36, (3) lysozyme C precursor, (4) ovotransferrin, (5) no sequence, (6) lysozyme C precursor and (7) no sequence. MQ: molecular weight markers.

microscope (SZH10 Olympus, 14 \times), the latter based on characteristic morphologies of crystals associated to each CaCO₃ phase, i.e. calcite, aragonite and vaterite. These crystals were obtained in preliminary experiments in the absence of protein and conveniently characterized [13]. At the end of the runs the precipitates were harvested from the microbridges having been previously rinsed several times with deionized Milli-Q water, dried at room temperature, and finally coated with gold and inspected with a field emission scanning electron microscope (FESEM, Gemini-1530). The average size of crystals (diameter or length of the characteristic dimension) was averaged by measuring at least 10 crystals and a maximum of 50 crystals in precipitates with a larger number of crystals. X-ray diffraction data were recorded on a Bruker Smart 6000 CCD detector with Kappa configuration (X8 Proteum) using Cu K α radiation from a Bruker Microstar micro-focus (Montel Optics) rotation anode generator, operating at 45 kV and 60 mA.

3. Results

The electrophoretic profiles of fractions *h*, *g*, *n*, and *r* and *c'*, *g'*, *i'* and *k'* as well as the putative identity of the stained bands are shown in Fig. 2a,b. Most of the fractions are composed of several bands, of which the more intensely stained correspond to the following compounds: *h* (quiescence-specific proteins and ovocleidin-17 chain A), *g* (ovotransferrin, ovomucoid, quiescence-specific protein and ovocleidin-116), *n* (ovotransferrin, preproalbumin, hemopoxin, ovoinhibitor precursor, cystatin), *r* (quiescence-specific protein, ovocleidin-17 chain A and non-identified sequences), *c'* (clone AGENAE not identified, ovocleidin-17 chain A and lysozyme C precursor), *i'* (clusterin, ovocalyxin-116, EGF-like repeats and discoidin

Table 1

CaCO₃ precipitation in the presence of different purified fractions of eggshell matrix proteins whose concentrations were adjusted to 50 μ g/ml, using as reference conditions 20 mM CaCl₂ and 10 mM NH₄HCO₃ at 23 \pm 2 $^{\circ}$ C

Run	t_i (min)	TNC	% CaCO ₃ polymorphs			L (μ m)
			C	A	V	
<i>Mushroom 1</i>						
Controls	1100	124	60	18	22	~90
<i>g</i>	1680	12	100	0	0	86
<i>h</i>	1100	147	100	0	0	59
<i>n</i>	1300	112	100	0	0	195
<i>r</i>	>1300	10	100	0	0	130–230
<i>Mushroom 2</i>						
Controls	960	77	55	22.5	22.5	~95
<i>c'</i>	960–1200	59	100	0	0	62
<i>g'</i>	960–1200	40	100	0	0	62–118
<i>i'</i>	960–1200	77	100	0	0	49–138
<i>k'</i>	>1360	11	100	0	0	118.5

TNC, average total number of crystals; C, calcite; A, aragonite; V, vaterite; t_i , induction time for nucleation measured visually with error \pm 60 min. In the case of fractions *c'*, *g'* and *i'*, t_i oscillates between 960 and 1200 min. L , average size.

I-like domains containing protein 3 [*Homo sapiens*]), *k'* (a mixture of cystatin, ovocleidin-116, glypican 4, ovalbumin, ovocalyxin-32, clusterin, ovocalyxin-36, ovotransferrin and lysozyme). Only fraction *g'* has a higher level of purity as the stained band correspond to ovocleidin-116. Some of the proteins are known, and their isolation and identification in the eggshell have been reviewed elsewhere [8] while other components have yet to be identified.

The effects of the purified fractions on the CaCO₃ nucleation (TNC, t_i), polymorphism and average size of crystals are shown in Table 1. In *mushroom 1* the fractions

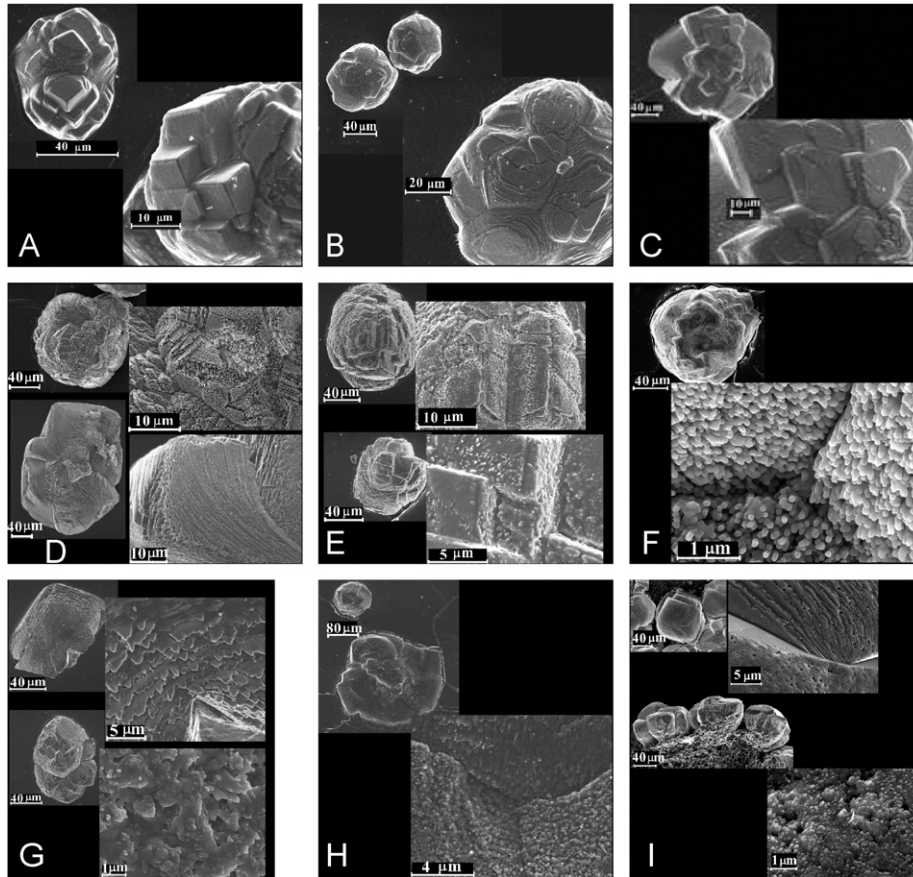


Fig. 3. FESEM images of calcite crystals precipitated in drops composed of 20 mM CaCl_2 plus eggshell purified fractions (protein-bearing solutions with a concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). They correspond to: (A) fraction *h*, (B) fraction *g*, (C) fraction *n*, (D) fraction *r*, (E) fraction *c'*, (F) fraction *g'*, (G) fraction *i'* and (H) fraction *k'*, and (I) correspond to the mammillary knob layer of the eggshell.

h and *n* did not produce notable effects on the nucleation with respect to the control, as deduced by comparing the TNC and t_i . However, fractions *g* and *r* inhibited clearly the nucleation of CaCO_3 decreasing drastically the number of crystals (less than 12 crystals in each microbridge) and increasing t_i . In *mushroom 2* the fractions *c'* and *i'* behaved similarly to *h* and *n* in *mushroom 1*; *g'* slightly inhibits the nucleation and *k'* behaved as a strong inhibitor. The differences in the effects on nucleation found in the control samples in both *mushrooms* must be exclusively attributed to differences in the local temperature in their surroundings; although the average laboratory temperature was kept at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Unfortunately, we cannot replicate the experiments to perform a statistic study because we lack sufficient amounts of the purified fractions.

A notable effect of organic fractions on CaCO_3 polymorphism is observed. Whereas in the control samples mixtures of 60% calcite, 18% aragonite and 22% vaterite (*mushroom 1*) and 55% calcite, 22.5% aragonite and 22.5% vaterite (*mushroom 2*) are obtained, in the presence of all purified fractions the only polymorph obtained is calcite. Calcite crystals grown in the control samples are isolated crystals with average size around 90–95 μm while aragonite and vaterite are observed as polycrystalline agglomerates (around 100 μm size) formed by smaller primary nanocrystals.

Calcite crystals display the characteristic cleavage rhombohedral habits showing the $\{104\}$ face. Aragonite precipitates as needle-like agglomerates and vaterite as hexalobulated leaf-like agglomerates (figures similar to those shown in Ref. [13]).

In the presence of fraction *h* the crystals precipitated are twinned and elongated (Fig. 3A). In these crystals inhibition always started at corners of $\{104\}$ faces. The symmetry of the newly expressed faces corresponds to that of the $\{100\}$ and $\{110\}$ prismatic forms of calcite. In the presence of purified fractions *g* and *n*, we obtain spherulithic calcite crystals (see Fig. 3B and C) displaying terraced morphology with macro steps. These crystals resemble those present in the mammillary knob layer of the eggshell (see Fig. 3I). Both fractions share the presence of ovotransferrin, which has been found to be present in the mammillary knob layer [8]. Another protein found in fraction *n* is preproalbumin, a precursor of ovalbumin. Ovalbumin has been also described in the mammillae. In fraction *r* the spheruliths obtained are agglomerates of prismatic nanocrystals displaying self-organized banding. This last observation was found at high magnification (Fig. 3D).

In the presence of purified fractions *c'*, *g'*, *i'* and *k'* (Fig. 3E–H) we obtained polydisperse precipitates whose

average size oscillated between 60 and 140 μm . They were formed by globular agglomerates composed of spherical (Fig. 3E) or oriented columnar nanocrystals (Fig. 3F,G, and H). It is worth mentioning that fraction g' , which produces these particular agglomerates, is composed exclusively of ovocleidin-116, the core protein of ovoglycan. This molecule which contains dermatan sulphate glycosaminoglycan chain is polyanionic and acidic with calcium affinity and is likely to modulate crystal growth during palisade formation. This molecule noticeably affects the morphology of calcite crystals precipitated *in vitro* [12]. In the agglomerate of Fig. 3G we can see that adjacent arrays of nanocrystals are fused.

In the agglomerates formed in the presence of fraction k' , it was difficult to distinguish the effect of a particular component, since this fraction was very complex; however, the texture of these agglomerates, formed by columnar nanocrystals, is similar to that produced by fraction g' , which contained only ovocleidin-116. It is interesting to note that both fractions (g' and k') contain ovocleidin-116 and inhibit the precipitation.

4. Discussion and conclusions

The effects on CaCO_3 precipitation *in vitro* of purified fractions composed by arrays of eggshell matrix proteins provide with insights on their possible role on the formation of the eggshell. The biomineralization processes in general are exquisitely modulated by organisms through specialized physicochemical mechanisms and specific organic molecules. These organic molecules are released sequentially at defined times to the growth media playing an important role in the control of the polymorphic phase, size, morphology and orientation of individual crystals. In this way, organisms are able to exert a superior control over mineralization processes [14]. Avian eggshell formation is interesting as it is a relatively simple form of biomineralization. Eggshell microstructure is the result of some degree of control exerted by the organic matrix components affecting the mineralogy, size and morphology of individual growing crystals [1,2,8] and of a competitive process during growth of adjacent crystals resulting in a columnar microstructure with a preferential crystallographic orientation [15]. These characteristics are very well defined and constant within a given avian species indicating the existence of a high degree of control over the eggshell formation.

The purification experiments reveal the great complexity of the eggshell organic matrix, with numerous proteins present in eggshell extract. Some of them have also been identified in the uterine fluid and may have been trapped along the different stages of the process of shell calcification. They represent a broad range of putative functions which are currently explored either by analogy with the role of these proteins in other organs, or by direct test *in vitro*, i.e. analysing their effects on CaCO_3 precipitation.

Fractions affect precipitation at different levels:

(i) All fractions select calcite among three possible anhydrous polymorphs, e.g., calcite, aragonite or vaterite. This result shows that soluble organic components participate in the selection of the eggshell mineral phase. Similar specificity over polymorphic selection has been observed by other authors using soluble organic macromolecules extracted from mollusc shells [16]. They have proved *in vitro* that these components can specifically select the same polymorphic phase of calcium carbonate as that of shell layer from which they were extracted, i.e., aragonitic or calcitic. Levi et al. [17] showed that macromolecules that promoted calcite nucleation are strongly polyanionic and more strongly acidic than aragonite inducing ones. Acidic proteins could act as chelating agents reducing the available calcium concentration in solution and the effective supersaturation. A reduced degree of supersaturation will favour the precipitation of the most stable polymorph, which is calcite [18,19]. Other mechanism for polymorph selection is the inhibition of the nucleation by selective adsorption of macromolecules on the nascent nuclei of a stable polymorph thus allowing the growth of the metastable one. Because of the presence of soluble polyanionic acidic macromolecules in the eggshell extracts, the first mechanism is probably the one acting during the selection of the polymorph calcite.

(ii) All fractions modified in a different manner the morphology of the precipitated calcite crystals. The change in the growth morphology is obviously produced by the presence of one or a group of soluble macromolecules with a certain three-dimensional conformation. These macromolecules have a high number of $-\text{COO}^-$ and $-\text{NH}_3^+$ groups on their surfaces, and depending on their isoelectric points and the pH of the experiment, they have a certain net positive, negative or zero surface charge. Alteration in the growth morphology by eggshell organic macromolecules with respect to the equilibrium morphology, the cleavage rhombohedra, seems to be the result of a change of the growth mechanism depending on the fraction used. This change is influenced by the specificity of the protein–surface interaction during the precipitation process. In the absence of macromolecules (control experiment) and at the low supersaturation at which the experiments are made, the parabolic mechanism acts during the formation of rhombohedral calcite. In the presence of fraction h a preferential adsorption of macromolecules to specific crystal faces, which become expressed as a consequence of the decrease in their growth rate, is the mechanism responsible for the change in growth morphology. In this case crystals expressed new and well defined crystallographic faces $\{100\}$ and $\{110\}$, in spite of being twinned crystals. Fractions g and n , however, produce spheruliths with terraced microstructure composed by macrosteps. Our hypothesis is that 2D-nucleation mediated growth could be the most likely mechanism acting during the formation of these spheruliths, and ovotransferrin, which is found in both fractions, may be

the specific macromolecule interacting with the solid phase. Further experiments of CaCO_3 precipitation in the presence of ovotransferrin will be necessary to check this hypothesis. This growth mechanism has been also reported in experiments of CaCO_3 precipitation in the presence of increased amounts of aerosol OT [20]. In the above cases specific protein–surface interactions seem to govern the precipitation process.

In the presence of fractions r , c' , g' , i' and k' a strong and non-specific protein–surface interaction most probably governs the process, which results in the precipitation of globular agglomerates composed of spherical or columnar primary nanocrystals. Such a strong non-specific interaction probably takes place after the nucleation event, once the supercritical nucleus reaches nanometric sizes, at the zone of highest supersaturation in the drops. The big globular agglomerates are thus the result of an aggregation–agglomeration–growth mechanism [21]. The texture of the agglomerates obtained in the presence of fraction g' , composed of oriented columnar nanocrystals, is influenced by ovocleidin-116, the only macromolecule composing this fraction (Fig. 3F). Also fraction k' , a complex fraction containing ovocleidin-116, produces the formation of agglomerates with microtexture similar to those found in the presence of fraction g' .

(iii) Some fractions exhibit a strong inhibitory effect on nucleation, suppressing the precipitation of CaCO_3 almost completely, while others do not produce any notable effect. Some organic macromolecules present in the fractions can affect CaCO_3 nucleation because they can act as strong chelating agents, reducing the available calcium concentration in solution and the effective bulk supersaturation to values at which the nucleation is greatly reduced. The effect is manifested at very low concentrations (i.e. $50 \mu\text{g/ml}$). This behaviour is characteristic of potent crystallization inhibitors that have a strong affinity for target crystal surfaces [22].

In conclusion, the effects of purified fractions of the eggshell organic matrix on CaCO_3 precipitation have been tested. We found that macromolecules of these fractions are active in selecting calcite as the precipitating solid phase and changing the growth mechanisms. This change results in peculiar morphologies which in some cases resemble those found in eggshell. In some cases we have identified putative macromolecules responsible for these effects, although further experiments must be carried out to confirm this. Finally, some of the fractions with different macromolecular composition exhibited a similar strong inhibitory effect on nucleation. This finding indicates that there is more than one specific macromolecule acting as a strong Ca-chelating agent.

Acknowledgements

This work has been partially financed by the Projects “EggDefence” of the CE VFP, PIE 2006301133 of Spanish CSIC and MAT2006/11701 of the Spanish Ministry of Education and Science. The Spanish team acknowledge also to the Factoría de Cristalización (Consolider-Ingenio 2010) for logistic support. AHH acknowledges a fellowship from CONACYT (México). ARN acknowledges financial support through the Program Ramón y Cajal (Spain). We thank Dr. J. Cartwright for English corrections.

References

- [1] Y. Nys, M.T. Hincke, J.L. Arias, J.M. Garcia-Ruiz, S.E. Solomon, *Poult. Avi. Biol. Rev.* 10 (1999) 143.
- [2] J.L. Arias, D.J. Fink, S. Xiao, A.H. Heuer, A.I. Caplan, *Int. Rev. Cytol.* 145 (1993) 217.
- [3] J. Gautron, M.T. Hincke, Y. Nys, *Connect. Tissue Res.* 36 (1997) 195.
- [4] M.T. Hincke, *Connect. Tissue Res.* 31 (1995) 227.
- [5] J. Gautron, M.T. Hincke, M. Panheleux, J.M. Garcia-Ruiz, T. Boldicke, Y. Nys, *Connect. Tissue Res.* 42 (2001) 255.
- [6] M. Pines, V. Knopov, A. Bar, *Matrix Biol.* 14 (1995) 765.
- [7] M.S. Fernández, A. Moya, L. López, J.L. Arias, *Matrix Biol.* 19 (2001) 793.
- [8] Y. Nys, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke, *Compt. Rend. Palevol.* 3 (2004) 549.
- [9] J. Gautron, M. Pain, S. Solomon, Y. Nys, *Br. Poult. Sci.* 37 (1996) 853.
- [10] M. Panheleux, M. Bain, M.S. Fernandez, I. Morales, J. Gautron, J.L. Arias, S.E. Solomon, M. Hincke, Y. Nys, *Br. Poult. Sci.* 40 (1999) 240.
- [11] A.M.H. Ahmed, A.B. Rodriguez-Navarro, M.L. Vidal, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, Y. Nys, *Br. Poult. Sci.* 46 (2005) 268.
- [12] M.S. Fernandez, K. Passalacqua, J.I. Arias, J.L. Arias, *J. Struct. Biol.* 148 (1) (2004) 1.
- [13] J.M. Garcia-Ruiz, M.A. Hernández-Hernández, J. Gómez-Morales, *VDI-Ber. Nr 1901* (2005) 963.
- [14] L. Addadi, S. Weiner, *Angew. Chem. Int. Ed.* 31 (1992) 153.
- [15] J.M. Garcia-Ruiz, A.B. Rodríguez-Navarro, *Competitive crystal growth: the avian eggshell model*, in: D. Allemand, J.P. Cuif (Eds.), *Biom mineralization 93*, Musée Océanographique de Monaco, Monaco, 1994, p. 85.
- [16] G. Falini, S. Albeck, S. Weiner, L. Addadi, *Science* 271 (1996) 67.
- [17] Y. Levi, S. Albeck, A. Brack, S. weiner, L. Addadi, *Chem. Eur. J.* 4 (1998) 389.
- [18] T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada, *Geochim. Cosmochim. Acta* 51 (1987) 2757.
- [19] C. Jiménez-López, E. Caballero, F.J. Huertas, C.S. Romanek, *Geochim. Cosmochim. Acta* 65 (19) (2001) 3219.
- [20] I. López-Macipe, J. Gómez-Morales, R. Rodríguez-Clemente, *J. Crystal Growth* 166 (1996) 1015.
- [21] R. Rodríguez-Clemente, J. López-Macipe, J. Gómez-Morales, J. Torrent-Burgués, V.M. Castaño, *J. Eur. Ceram. Soc.* 18 (1998) 1351.
- [22] E. Badens, S. Veessler, R. Boistelle, *J. Crystal Growth* 199 (1999) 704.

Manuscrito 4. Identification of some active proteins on the process of hen eggshell formation.

Identificación de algunas proteínas activas en el proceso de formación de la cascara de huevo.

La cáscara de huevo de gallina es una estructura biocerámica porosa con un alto grado de organización, compuesta en aproximadamente el 95% de su peso por CaCO_3 en el polimorfo mas estable (calcita) y en 1-3.5% en peso de una matriz orgánica, lo cual le convierte en un material con excelentes propiedades mecánicas.

Los cristales de carbonato cálcico (en forma de calcita) que forman la cáscara de huevo precipitan en el fluido uterino el cual contiene los precursores orgánicos e iones Ca^{2+} y HCO_3^- en exceso respecto al producto de solubilidad de la calcita.

El papel principal de la cáscara de huevo es la de resguardar al embrión de las agresiones externas del ambiente, al mismo tiempo que permite el intercambio de agua y gases entre el embrión y el ambiente exterior durante su desarrollo fuera del útero, además es una fuente de calcio una vez agotadas las reservas de este ion en la yema.

La cáscara de huevo muestra una textura en gradiente, formada mediante un proceso en tres etapas: a) etapa inicial, mediante una nucleación heterogénea de agregados esferulíticos de calcita, formando espacios entre ellos, lo cual facilita al pollito fracturar el cascaron desde su parte interior y facilitar su salida, b) etapa de crecimiento activa, que consiste en una deposición lineal, dando lugar a una estructura mas compacta (de dentro hacia fuera) lo que refuerza la pared del cascarón y alternada por unos poros; finalmente c) etapa terminal, que corresponde al cese del crecimiento de los cristales, la cual culmina con una capa delgada de cristales perpendiculares a la superficie del cascarón, y finalmente recubriendo al cascarón es depositada una capa rica en material orgánico conocido como cutícula, en cuya parte

mas interna se deposita una fina capa de cristales de hidroxiapatito, además de contener los pigmentos del cascarón (Nys, Y. et al., 1999 y 2004)

Desde hace casi 20 años se ha venido haciendo un gran esfuerzo para aislar, purificar e identificar las diferentes proteínas y macromoléculas orgánicas presentes en el fluido uterino (que contiene los precursores de la cáscara) y de la matriz orgánica de la cáscara del huevo. Todos estos estudios han permitido agrupar a las proteínas de la matriz en tres grupos: a) proteínas de la clara de huevo como la lisozima, ovalbúmina y ovotransferrina, b) proteínas ubicuas tales como la osteopontina y clusterina, y c) proteínas específicas de la cáscara tales como ovocleidina-17, ovocalixina-32, ovocalixina-36 y ovocleidina-116 (Gautron et al., 2001).

Es bien conocido que algunas de estas proteínas regulan la mineralización de la cáscara y en particular el crecimiento de la calcita. Para identificar algunas estas proteínas activas en el proceso de formación de la cáscara de huevo, hemos usado la estrategia de comparar los efectos en la precipitación del CaCO_3 *in vitro* de tres proteínas comerciales extraídas de la clara del huevo, que se encuentran presentes en la matriz orgánica de la cáscara, con el efecto de los fluidos uterinos recolectados en las tres principales etapas de formación de la cáscara del huevo y con el efecto de fracciones de proteínas extraídas y purificadas de la cáscara (Hernández-Hernández, 2008a).

Los estudios de precipitación de CaCO_3 en presencia de estas proteínas de la cascara, se llevaron a cabo usando una técnica de difusión de vapor desarrollada en nuestro laboratorio conocida como “*la seta*” de cristalización. Siguiendo el protocolo reportado en otro trabajo (Hernández-Hernández, 2008b) al mismo tiempo que fue registrada la evolución del pH durante el proceso de precipitación de CaCO_3 en presencia de los fluidos uterinos. Los parámetros estudiados fueron: el tiempo de inducción de la nucleación, el número de cristales y la identificación de los diferentes polimorfos (calcita, aragonito y vaterita) mediante microscopía óptica, en base a su morfología y mediante estudios de difracción de rayos-X de polvos y por otro lado la afinidad de estas proteínas por las superficie de los cristales de CaCO_3 .

Los resultados obtenidos revelan por un lado que los fluidos uterinos incrementaron en gran medida la densidad de nucleación de los cristales de CaCO_3 en comparación con las fracciones purificadas y las proteínas comerciales. Por otro lado, tanto las fracciones purificadas como los fluidos uterinos favorecen la formación de la fase calcita frente a los otros polimorfos de CaCO_3 más comunes (vaterita y aragonito) y por último que algunas proteínas presentes en el fluido uterino y en los extractos purificados de la cáscara de huevo presentan una fuerte afinidad por la superficie de los cristales de CaCO_3 . Estudios de electroforesis (SDS-PAGE) de estas muestras, antes y después de la precipitación con CaCO_3 revelaron que algunas de estas proteínas desaparecen de la disolución. Entre las proteínas con alta afinidad al CaCO_3 se encuentran: la ovocleidina-17, ovocalixina-32, osteopontina y la ovocleidina-116. Estas proteínas deben tener un papel activo en el crecimiento, agregación e inhibición del CaCO_3 . Mientras que las proteínas que no desaparecen de la disolución orgánica tras la precipitación del CaCO_3 sugieren que pueden actuar regulando el escenario químico en el cual tiene lugar la mineralización del cascarón ya sea aumentando la sobresaturación y por tanto favoreciendo la nucleación como es el caso de la ovalbúmina, ovotransferrina y en menor medida de la lisozima o tamponando el pH y por tanto favoreciendo el crecimiento cristalino como es el caso de la ovocleidina-17 y ovocalixina-36, componentes minoritarios pero con muy diferentes puntos isoeléctricos. Por otro lado, es bien sabida la actividad biológica antimicrobiana de algunas proteínas, como de la lisozima, ovotransferrina, o como se sospecha de la ovocalixina-36.

Identification of Some Active Proteins in the Process of Hen Eggshell Formation[†]

A. Hernández-Hernández,[‡] J. Gómez-Morales,^{*,‡} A. B. Rodríguez-Navarro,[§] J. Gautron,^{||} Y. Nys,^{||} and J. M. García-Ruiz[‡]

Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT (CSIC-UGRA), Edificio Instituto López Neyra, Avda. Conocimiento, s/n. P.T. Campus Salud, 18100, Armilla (Granada), Spain, Departamento de Mineralogía y Petrología, Universidad de Granada, Campus Fuentenueva, s/n 18002 Granada, Spain, and INRA, UR83, Recherches Avicoles, 37380 Nouzilly, France

Received July 20, 2008; Revised Manuscript Received October 2, 2008

ABSTRACT: The hen eggshell is formed in a three-stage sequential process, namely, the initial stage (nucleation of calcite crystals), the active growth phase (linear deposition), and the terminal stage (inhibition of crystal formation). During these phases, different proteins are sequentially expressed in the uterine fluid. Some of them are thought to regulate the shell mineralization and particularly crystal growth. To identify proteins that are actively involved in this process, we have analyzed and compared the effects on CaCO₃ precipitation in vitro of some commercial egg white proteins, some noncommercial purified fractions of the eggshell organic matrix and, also of uterine fluids extracted from the hen uterus during each one of the stages of calcification. Uterine fluids strongly increased the nucleation density with respect to commercial proteins and purified fractions of the shell. A few identified acidic proteins (ovocleidin-17, ovocalyxin-32, osteopontin and ovocleidin-116) showed a strong affinity for the CaCO₃ surfaces and were selectively removed from the solution during its precipitation. These proteins may have an active role on CaCO₃ growth, aggregation, and inhibition. Other proteins, with very different isoelectric points, seem to regulate the chemical environment in which the precipitation takes place, that is, by buffering the pH favoring crystal growth as the couple ovocleidin-17 and ovocalyxin-21.

Introduction

The hen eggshell is a calcified structure which functions as a protective barrier for the egg content and allows the extrauterine development of the chick embryo.^{1,2} It consists mainly of a mineral part (>95%) made of calcite crystals and a pervading organic matrix (1–3.5%), making a composite material with excellent mechanical properties.^{2–4} It is deposited in a very short time (less than 20 h), while the egg passes through the hen's uterus (shell gland). The eggshell formation is a very well regulated spatio-temporal process, resulting in a material with very well defined compositional and ultrastructural/microstructural characteristics which are common to all avian species. It is also a useful model to understand biomineralization processes in other biological systems. Three different stages during eggshell formation can be differentiated: (a) initial, (b) active-fast growth, and (c) terminal.

It is normally assumed, based on morphological features, that the avian eggshell is composed of six layers. However, only the two innermost non-calcified layers (the inner and outer shell membranes made of a network of organic fibers) are well differentiated. In the calcified part, there is continuity across its thickness as a result of the continuous mode of eggshell deposition. The inner zone of the calcified shell is made of irregular cones (mammillary knob layer), the tips of which are penetrated by the outer membranes fibers. During the initial stage of eggshell formation (stage I) the deposition of the mammillary knobs on the outer shell membrane and the subsequent nucleation of calcite spheruliths take place. The growth continues until adjacent spheruliths fuse together and from there

columnar calcite units arise as the lateral growth of crystals is constrained. This type of process in a restricted space is denominated competitive crystal growth as crystals compete for the limited available space.⁵ Columnar calcite crystals extend beyond the bases of the cones during the fast growth stage (stage II) forming the palisade layer. Columnar crystal growth proceeds until the arrest of calcification, which is characterized by the deposition of a thin vertical crystals layer and the cuticle (stage III). The vertical crystal layer is composed of small crystallites aligned in a perpendicular form to the shell surface. The cuticle is a rich organic coating containing hydroxyapatite in its inner zone⁶ and pigments.^{2,7}

The mineral part of the shell is made of calcite crystals precipitating from the uterine fluid, which is an acellular milieu secreted by the distal part of the oviduct. This fluid contains calcium and bicarbonate ions greatly in excess of the solubility product of calcite, as well as other ionic species such as magnesium and phosphate and the organic precursor components of the eggshell organic matrix.⁸ Organic components comprise proteins, glycoproteins, and proteoglycans. Among the numerous components identified are egg white proteins as ovalbumin, lysozyme and ovotransferrin, ubiquitous components such as osteopontin and clusterin^{9–12} and organic constituents unique to the process of shell calcification. This last group comprises dermatan and keratan proteoglycans,^{3,13} ovocleidins and ovocalyxins.^{9,14,15} A recent proteomic survey of the acid-soluble organic matrix of the calcified chicken eggshell layer has allowed the identification of several hundred proteins in the shell.¹⁶ The number of these organic components and their concentration change in the uterine fluid along the different stages of eggshell deposition in a well defined way.¹⁷ In each stage specific organic components are expressed at a given concentration. Also, these organic components are secreted at specific times and locations in the oviduct and incorporated at specific substructural regions of the eggshell. For instance, type X collagen is mostly found at the eggshell membranes, keratan

[†] Part of the special issue (Vol 8, issue 12) on the 12th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules, Cancun, Mexico, May 6–9, 2008.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jaime@lec.csic.es.

[‡] IACT (CSIC-UGRA).

[§] Universidad de Granada.

^{||} INRA.

sulfate proteoglycans are the main components of the mammillary knobs,^{18,19} and osteopontin has been found in eggshell associated with particular crystallographic faces of calcite in the palisade region.²⁰ On the other hand, in vitro precipitation tests show that some of these components influence calcium carbonate precipitation. In particular, they affect the nucleation flux, the polymorph selection, the crystal size and the morphology. For instance, eggshell membrane collagen and osteopontin are known to inhibit calcite crystal growth, whereas mammillary keratan sulfate proteoglycan is involved in calcite nucleation.

It is becoming commonly accepted that macromolecules contribute to the regulation of the eggshell mineralization process. However, the mechanisms involved in the interaction of the organic macromolecules with the inorganic phase have not yet been fully elucidated. It is not only the action of one macromolecule in a given condition that must be established, but also the spatio-temporal interactions of a big array of macromolecules.²¹ These biological macromolecules differ in molecular weight, isoelectric point (pI), and concentration. It has been demonstrated by in vitro experiments that model globular proteins with different pI and varying concentrations influence CaCO₃ precipitation at different levels, that is, during nucleation, polymorph selection, crystal growth, and crystal morphology.²²

In order to find evidence of the implication of macromolecules in eggshell formation and to identify some of the macromolecules actively involved in the process, we decided to analyze and compare the effects on calcium carbonate precipitation of macromolecular solutions with different levels of complexity, that is, (1) egg white proteins which are commercially available, (2) purified eggshell matrix extracts (results previously published),²³ and (3) uterine fluids collected at the three main stages of eggshell formation. In particular, we have analyzed the effects on the nucleation, crystal growth, polymorphism and morphology of the precipitated crystals, and then, we have compared the morphology of synthetic crystals obtained in vitro with those present in vivo in various eggshell regions.

Materials and Methods

Organic Macromolecular Solutions. In a first stage, we have used three pure commercial egg white proteins, that is, hen egg white lysozyme (Seikagaku Lot E98301, pI 11.35, MW 14313 Da), hen egg white ovalbumin (Sigma, lot 93H7105, pI 4.5–4.6, MW 45000 Da) and ovotransferrin (type I chicken egg white Lot 107F8020, pI 6.1, MW 77000 Da). Stock solutions of the three proteins were prepared and their concentrations were measured by the Layne method,²⁴ using a Varian Cary UV–vis spectrometer at a wavelength of 280 nm. These stock solutions were used to prepare protein bearing experiments. The concentration of CaCl₂ solution was kept constant at 20 mM, meanwhile the concentration of each one of the three proteins varied (16, 128, 512, 2000, and 5000 µg/mL). In a second stage we have analyzed previous results of the influence on CaCO₃ precipitation of some purified fractions of the eggshell organic matrix²³ and used these results for their comparison with those of this work. All the purified fractions were an array of proteins and other macromolecular components except one of them which was composed mainly of ovocleidin-116 (OC-116). In a third stage we have used as protein bearing solutions uterine fluids extracted at the three main stages of the eggshell formation. Uterine fluids were extracted as already described.¹⁷ Laying hens (ISA BROWN) were housed individually in cages located in a windowless, air conditioned poultry house. They were subjected to a cycle of 14 h of light: 10 h of darkness and were fed ad libitum on a layers diet. Cages were equipped with a computerized system to record the precise time of daily egg laying (oviposition). Ovulation was considered to occur 0.5 h after oviposition. Eggs were expelled with an intravenous injection of 50 µg/hen of prostaglandin (prostaglandin F2α) at 6–9 h (initial stage, I), 14–18 h (active growth calcification phase, II) and 22–23 h (terminal phase of shell calcification, III) after the preceding

oviposition. Uterine fluid was collected immediately after the egg expulsion by gravimetry into a plastic test tube placed at the entrance of the everted vagina. An aliquot of these three fluids was used to analyze the total calcium concentration by atomic absorption spectroscopy and the total protein content by the Bradford method²⁵ using ovalbumin as standard. Uterine fluid proteins were electrophoretically separated using the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) method. Gels were loaded with 40 and 20 µL of each uterine fluid, before and after CaCO₃ precipitation. Proteins were stained with Sypro Ruby Protein Gel Stain. The identification of stained bands displayed in the electrophoretic profile was carried out by comparing them to previously published electrophoretic profiles.^{2–17} Gels were scanned using an infrared imaging system (Odyssey, Licor) and relative protein quantification was performed as already described.²⁶

Precipitation Experiments. Precipitation experiments were carried out by CO₂ vapor diffusion using the sitting drop crystallization method on a “crystallization mushroom” at 20 °C and 1 atm total pressure. Calcium carbonate precipitated in aqueous drops of 40 µL containing the corresponding protein bearing solution and 20 mM CaCl₂ (800 µg/mL Ca), except in the case of the uterine fluids of stages I, II, and III whose Ca concentration were higher. In addition to the added Ca (800 µg/mL) these fluids contain also natural Ca (170 µg/mL in fluid I, 370 µg/mL in fluid II and 480 µg/mL in fluid III). The pH of the drops was raised by the diffusion of NH₃ gas released by the underlying NH₄HCO₃ solution (10 mM) contained in the bottom part of the *mushroom*. The reagent concentrations of the control experiment (20 mM CaCl₂ and 10 mM NH₄HCO₃) were the same as those reported in previous works.^{22,23} Experiments were finished at 48 h, the mushrooms were opened and both solutions and solids were withdrawn from the microbridges for subsequent analysis.

Analysis. The evolution of the pH along the experiments, the induction times for nucleation (*t_i*), the crystalline phase and crystalline habit of the precipitated particles have been analyzed following the procedures described in previous papers.^{22,23} The total number of crystals (TNC) in each drop has been determined by counting the crystals with the use of an optical microscope. For this purpose the drops are divided in four quadrants in top view, and the cross-section is divided into three regions: surface of the drops, wall and bottom of the microbridges where drops are deposited.

In some cases, prior to FESEM observations, the crystals were treated with proteinase K buffer (PKb) to highlight the inorganic material removing all the proteins, according to the protocol described by Shiao et al.²⁷ When using the uterine fluids as protein bearing solutions the remaining solutions after the experiments of CaCO₃ precipitation were also analyzed by the SDS–PAGE method. The residual calcium concentration of these fluids was analyzed by atomic absorption spectroscopy.

Results

Compared Precipitation of CaCO₃ in Macromolecules Bearing Solutions. In Table 1 are summarized the main results of the precipitation experiments using commercial egg white proteins and uterine fluids collected at the stages I, II, and III. The results of the control experiment are also included. Figure 2 shows a general view of the drops containing CaCO₃ precipitates when using the uterine fluids and the control sample.

In lysozyme, ovalbumin and ovotransferrin bearing experiments, *t_i* were typically around 1000 min, while TNC ranged from 50 to 130. There was always a mixture of the three main CaCO₃ polymorphs (calcite, aragonite and vaterite), though with increasing protein concentration, the percentage of calcite tends to increase. In contrast, in the uterine fluid bearing experiments, *t_i* was extremely short (a few seconds), the TNC was at least 2 orders of magnitude higher than in the other protein bearing experiments using commercial proteins or purified eggshell fractions (over 10 000 crystals per drop) and the crystalline phase was always calcite.

pH Evolution in the Control and Uterine Fluid Bearing Experiments. Figure 3 shows the pH profiles of uterine fluids bearing experiments. It can be observed that the pH evolution

Table 1. Precipitation of CaCO₃ in Macromolecule Bearing Solutions^a

macromolecular solution	Ca _o + Ca _{ad} (μg/mL)	protein (μg/mL)	t _i (min)	TNC and polymorphs (%)	crystal size L (μm)	pH _i	pH _f
control	800	0	≈900	40 (55% C 22% V 23% A)	100–200	5.3	7.3
lysozyme	800	128		52 (84% C 5% V 11% A)	65, 113	5.8	7.2
		512	≈700	60 (84% C 6%V 10% A)	68, 113		
ovalbumin	800	128	≈900	56 (58% C 26% V 16% A)	120, 180	5.0	7.0
		512	1080	133 (61% C 38%V 1% A)	51, 83	5.2	7.1
ovotransferrin	800	128	1000	57 (77% C 21% V 2% A)	90, 110	5.0	7.2
		512	1080	98 (88% C 12%V 0% A)	52–74, 134 ^b	4.9	7.2
Uterine fluid I	970	92	<0.2	≥10.000 (100% C)	≈6–20	7.6	9.03
Uterine fluid II	1170	455	<0.2	≥10.000 (100% C)	5, 10, 24, 52	7.43	8.25
Uterine fluid III	1280	163	<0.2	≥10.000 (100% C)	≈5–22	6.5	8.44

^a TNC, t_i, C, A, and V stands for total number of precipitated crystals per drop, induction time, calcite, aragonite, and vaterite, respectively. pH_i (initial pH); pH_f (final pH). ^b Refers to aggregates of crystals.

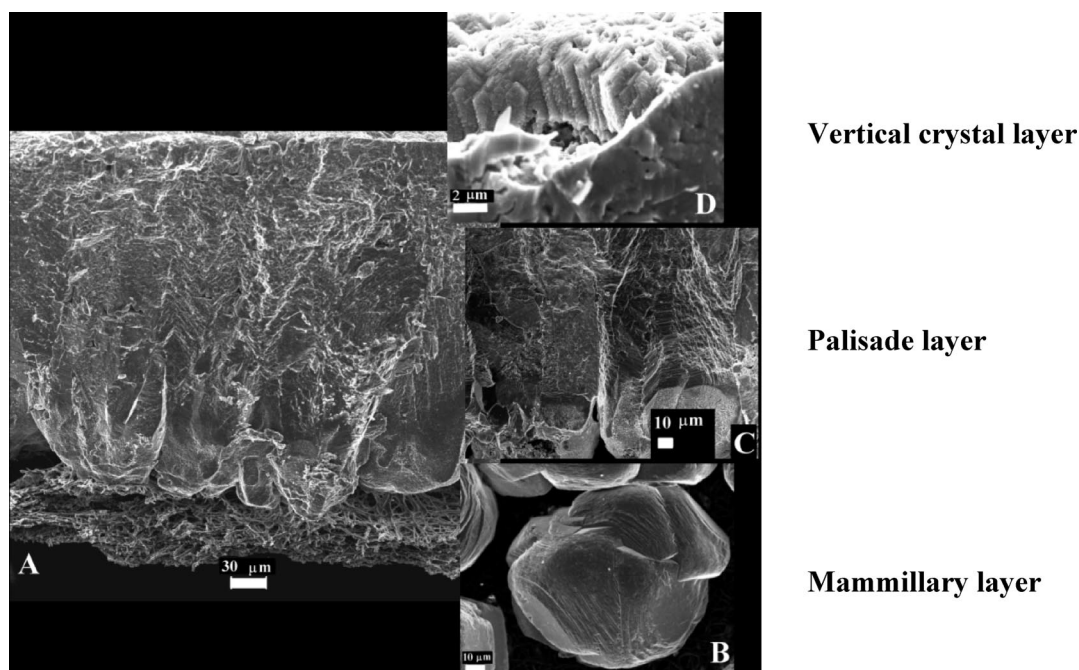


Figure 1. FESEM images of the cross-section of a hen eggshell (A) and details of the different structural parts formed during the three consecutive stages of eggshell formation: (B) mammillary knobs formed at the initial stage or stage I, (C) palisade layer formed at the fast growth stage or stage II and (D) thin vertical crystal layer covered by the cuticle at the termination stage or stage III.

in experiments using the uterine fluids of stages I and III displayed a profile similar to that of the control experiment. In these experiments the pH increased sharply until reaching the plateau. However, the pH profile recorded during the experiment in which we used fluid of the stage II was notably different during the first 30 min, thus indicating a peculiar behavior of fluid II during precipitation (Figure 3b). This different behavior consisted of an initial decrease in the pH and then a slow increase. Later, the pH increases sharply until reaching the plateau. The different behavior of uterine fluid II was also manifested when adding 2 μL of 400 mM CaCl₂ to 38 μL of fluid II during the preparation of the uterine fluid bearing samples. This addition did not affect significantly the initial pH of the fluid. However, the addition of the same calcium concentration to uterine fluids I and III induced a pH decrease of 0.38 and 1.15 units, respectively. Therefore, we suspect that fluid II acted as a strong buffer. The buffering capacity of the uterine fluid of stage II was also shown when using uterine fluids of the same stage but extracted on two different days (Figure 3b'). The protein concentrations (97 and 479 μg/mL) were very different on both days, but in both experiments the pH oscillated to compensate the strong pH increase that the diffusion of NH₃ would produce. From a chemical engineering point of view,

the uterine fluid II acted as a pH-stat system favoring the growth of calcite at this stage.

Electrophoretic Profile (SDS–PAGE) of the Uterine Fluids. Figure 4 shows the electrophoretic profile of uterine fluids, before and after CaCO₃ precipitation. In Figure 4a (uterine fluid I) the more intense stained bands (higher concentration) correspond to egg white proteins such as ovalbumin (45 kDa) and ovotransferrin (80 kDa). Additionally, a nonassigned band at around 240 kDa was observed in one of the samples. At a much reduced staining intensity, we observed a band at 15 kDa (assigned to lysozyme). Eggshell matrix proteins specific to the uterine tissue, such as ovocleidin-17 (OC-17), ovocalyxin-32 (OCX-32), and ovocalyxin-21 (OCX-21), were also observed. At around 50 kDa, there is a smear of bands that could correspond to osteopontin. After CaCO₃ precipitation the bands below 45 kDa completely disappeared, with the exception of the lysozyme band. In contrast, the bands over 45 kDa associated to ovalbumin, ovotransferrin and the 240 kDa bands remained with the same staining intensity.

In the electrophoretic profile of fluid II (Figure 4b, left-hand side) the following bands from top to bottom are observed: a nonassigned band at 240 kDa, three closely spaced bands corresponding to ovocleidin-116 (OC-116), ovotransferrin (weakly

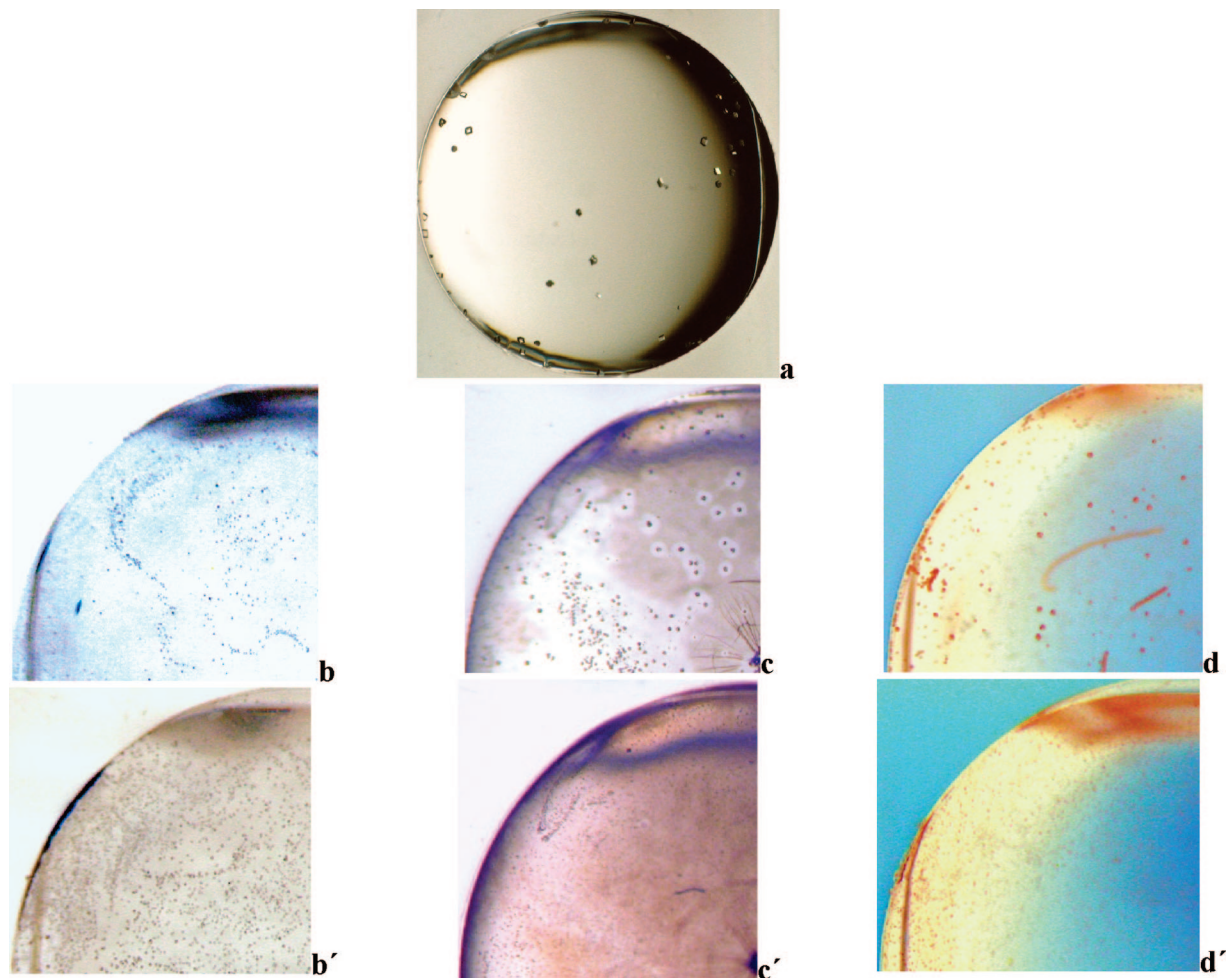


Figure 2. Optical microscopy views of drops containing CaCO_3 crystals precipitated in the control experiment (a) and in uterine fluids bearing experiments of either stage I (b: surface of the drop, b': bottom part of the drop), stage II (c: surface of the drop, c': bottom part of the drop) and stage III (d: surface of the drop, d': bottom part of the drop). The diameter of drop is 6.0 mm. Panels b–d' correspond to a quadrant of the drop.

stained) and an intensely stained band at around 70 kDa. Below this band, a smear of bands at around 50 kDa appear that possibly correspond to osteopontin. Three bands can also be observed that have been assigned to ovocalyxin-36 (OCX-36), ovocalyxin-32 (OCX-32), and ovocleidin-17 (OC-17). Below these bands we found that of lysozyme (weakly stained) and another band at 13 kDa. After CaCO_3 precipitation, the intensely stained bands of OC-116, the nonassigned band at 240 kDa, that assigned to osteopontin and the less intense band of OCX-32 disappeared, thus indicating that these proteins were completely removed from the fluid during the precipitation process. The electrophoretic profile of fluid III (Figure 4b, right-hand side) displays all the bands observed in the previous fluid samples except those corresponding to OC-116 and lysozyme. The most intensely stained bands are the following four: two of them within the interval from 160 to 240 kDa, one at around 70 kDa and another situated around 30 kDa, which seems to correspond to OCX-32. An additional band was also observed at very low molecular weight (around 10 kDa). After CaCO_3 precipitation most of the bands below 66 kDa including OCX-32 together with those placed at the top of electrophoretic profile disappeared.

Effect on Calcite Morphology of Macromolecule Bearing Solutions. Figure 5 compares the morphology of the calcite crystals found at structurally different eggshell regions, that is, the mammillary knobs, palisade and vertical crystal layer (Figure 5a–c) with the morphology of calcite crystals obtained from

uterine fluid bearing precipitation experiments. Most representative morphologies of calcite crystals precipitating in uterine fluids I, II and III bearing solutions are displayed in Figure 5d–f. FESEM observation of crystals grown in vitro in the uterine fluid bearing experiments (Figure 5) shows the presence of globular agglomerates and modified rhombohedral crystals (Fluid I) which are similar to those crystals collected from the mammillary knob at the initial stage of the eggshell formation (Figure 5d). Aggregates of calcite obtained when using uterine fluid of the stage II are quasi-spherical or rods made of microcrystals elongated along the *c*-axis (Figure 5e). Those crystals obtained with Fluid III are elongated along the *c*-axis, compact (they do not show any holes) and are similar to crystals observed at the final stage of eggshell formation which are also elongated (Figure 5f). Some of them revealed peanut-like morphology.

The treatment of crystals and eggshell samples with proteinase K buffer (PKb, a nonspecific protease), allowed us to observe the presence of 300–450 nm diameter holes on these crystals. This finding indicates that most probably the holes contained aggregates of proteins occluded during eggshell formation or during the growth of crystals on in vitro experiments. The occurrence of these holes is very common in crystals obtained from uterine fluids collected at stage I and II which is also in agreement with a high frequency of holes found in the mammillary and palisade layer. In contrast, the holes are neither

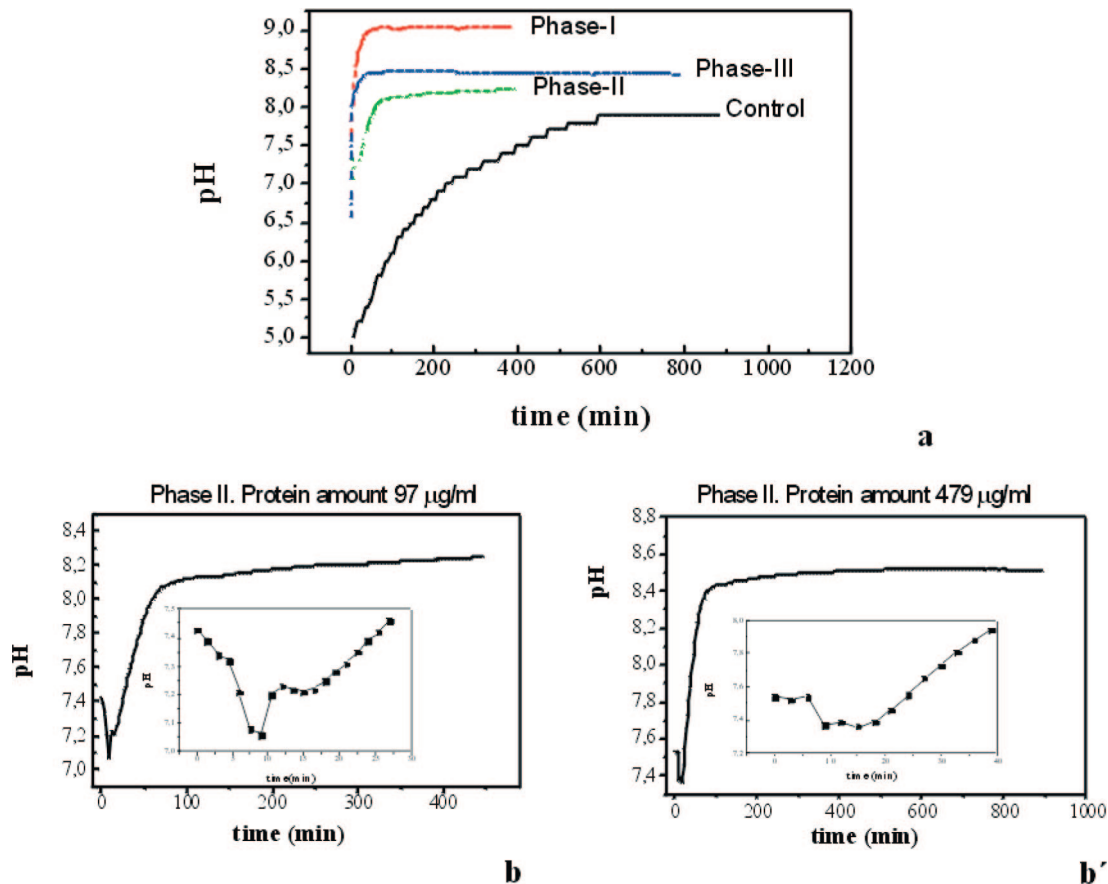


Figure 3. pH profiles of (a) uterine fluid bearing experiments of the three main stages of the eggshell formation and of the control experiment. (b) pH-profile recorded when using the uterine fluid of the stage II and (b') pH-profile recorded in the experiment using an uterine fluid of the stage II collected in a different day. Insets in both figures correspond to the pH evolution during the first 30 min.

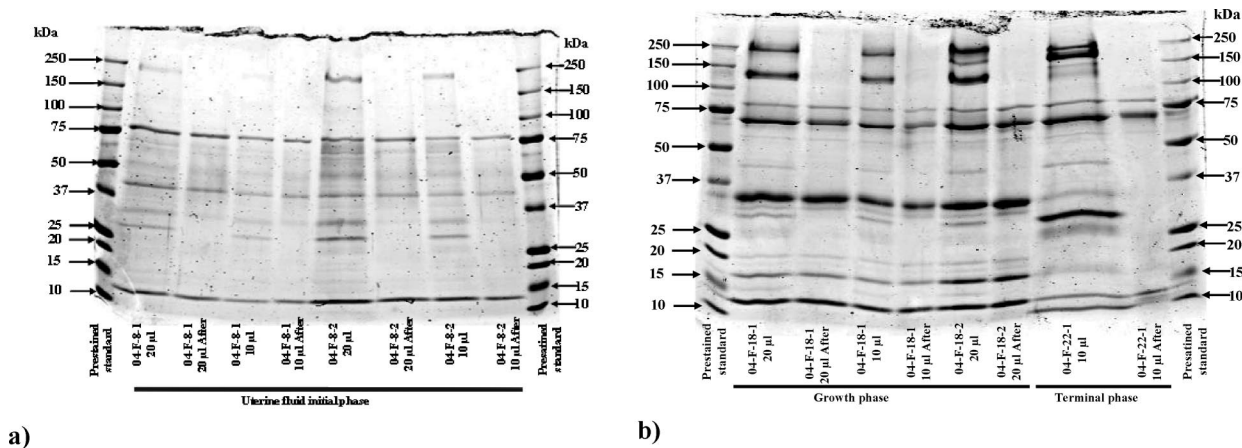


Figure 4. SDS-PAGE profiles of uterine fluids before and after CaCO_3 precipitation. (a) Uterine fluids of stage I and (b) uterine fluids of stages II and III. In the uterine fluid of the stage I, the stained bands corresponding to OC-17, OCX-21, OCX-25, OCX-32, and OCX-36 disappeared, meanwhile those of lysozyme, ovalbumin, and ovotransferrin remain after CaCO_3 precipitation. In the uterine fluid of the stage II the stained bands of OC-116, 240 kDa, OCX-25, OCX-32 and OCX-36 disappeared while those of lysozyme, ovotransferrin, OC-17 and OC-21 remained after CaCO_3 precipitation. Finally, in the uterine fluid of the stage III the bands of OC-116, 207 kDa and OCX-32 disappeared, meanwhile those of ovotransferrin, 10 and 66 kDa remained. There is a smear of bands around 50 kDa that could correspond to osteopontin.

found at the upper part of the eggshell in the vertical layer nor in the crystals obtained from the uterine fluid at stage III, which produced compact aggregates of crystals.

The calcite morphologies obtained when using the commercial egg white proteins lysozyme, ovalbumin and ovotrans-

ferrin at two different concentrations, 128 and 512 $\mu\text{g/mL}$, are displayed in Figure 6a–c and Figure 6d–f, respectively. Figure 6g shows the morphologies of calcite crystals precipitated in the presence of a purified fraction of the eggshell organic matrix which contain mainly OC-116.

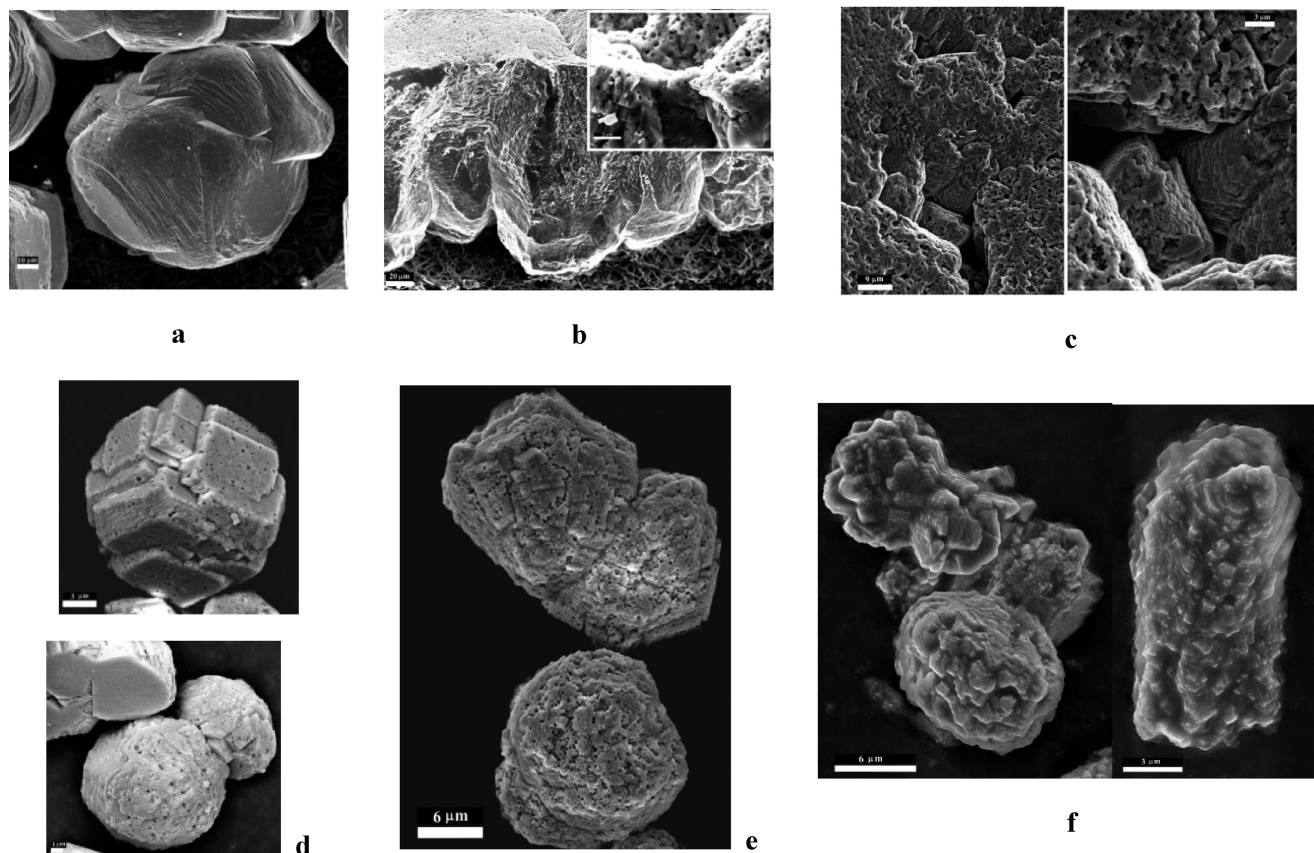


Figure 5. FESEM images of (a) crystals of the mammillary layer of the eggshell deposited at the initial stage; (b) eggshell of the palisade layer deposited during the fast growth phase; (c) eggshell of the terminal phase; (d) crystals grown in the presence of the uterine fluid of the stage I; (e) crystals grown in the presence of the uterine fluid of the stage II; (f) crystals grown in the presence of the uterine fluid of the stage III.

When using lysozyme and ovalbumin at low protein concentration ($128 \mu\text{g/mL}$), calcite crystals displayed rhombohedral habits bounded by the $\{104\}$ face (Figure 6a,b). These crystals are similar to those found in the control experiment. In contrast, the use of ovotransferrin at $128 \mu\text{g/mL}$ modified the rhombohedral habit of calcite by expressing new though not very well defined faces (Figure 6c,f). The symmetry of the newly expressed faces in the case of ovotransferrin corresponds to that of the $\{110\}$ first-order prismatic form of calcite and to those of second-order prismatic faces $\{100\}$ as deduced by comparison with calcite crystal model built using SHAPE V 7.1 (Shape Software). Those new faces were not flat and showed a terraced morphology with well-defined microsteps advancing parallel to $\{104\}$ rhombohedral crystal faces. At higher concentration of ovotransferrin ($512 \mu\text{g/mL}$), the edge between rhombohedral faces were inhibited and new faces with the symmetry of $\{108\}$ rhombohedral faces were expressed. The expression of these new faces reduced the size of the rhombohedral $\{104\}$ faces of calcite crystals. In the experiments using lysozyme and ovalbumin a morphological effect could only be observed in the case of ovalbumin when its concentration increased to $512 \mu\text{g/mL}$ (Figure 6d,e). However, in the later cases the identification of the specific crystallographic faces could not be possible because of the large modification of the calcite morphologies. In Figure 6e, the calcite crystal morphology is almost spherical and only the remnant of $\{104\}$ faces are shown. Finally, the most marked effect on crystal morphology was found when using a purified fraction of the eggshell organic matrix contain-

ing OC-116, which yielded calcite crystals as agglomerates of nanocrystals (Figure 6g).

Discussion

To understand the role of organic components during eggshell formation, we have used macromolecule bearing solutions with different levels of complexity, from the simplest containing only one type of macromolecular species to the most complex that could simulate the natural process. In particular, we have analyzed the effects on *in vitro* calcium carbonate precipitation of (1) commercial egg white proteins also present in eggshell matrix, and (2) uterine hen fluids extracted at the three main stages of eggshell formation. In the first group we used three commercially available proteins which are lysozyme, ovalbumin and ovotransferrin. Also, we have compared our results with previous results obtained in our laboratory about the influence on CaCO_3 precipitation of purified extracts of the eggshell organic matrix.²³ This strategy and the resulting information give us insights into the role and effects of individual organic components as well as their combined effects and mutual interactions during the process of eggshell formation.

Our results reveal that individual commercial eggwhite proteins (lysozyme, ovalbumin, ovotransferrin) at concentrations comparable to those found in the uterine fluid have a relatively weak effect on calcite selection, nucleation and growth. In contrast, the purified eggshell organic matrix fractions and the uterine fluid bearing solutions were very effective and, for instance, selected exclusively calcite as precipitating polymorph. Additionally, some purified fractions of the eggshell organic

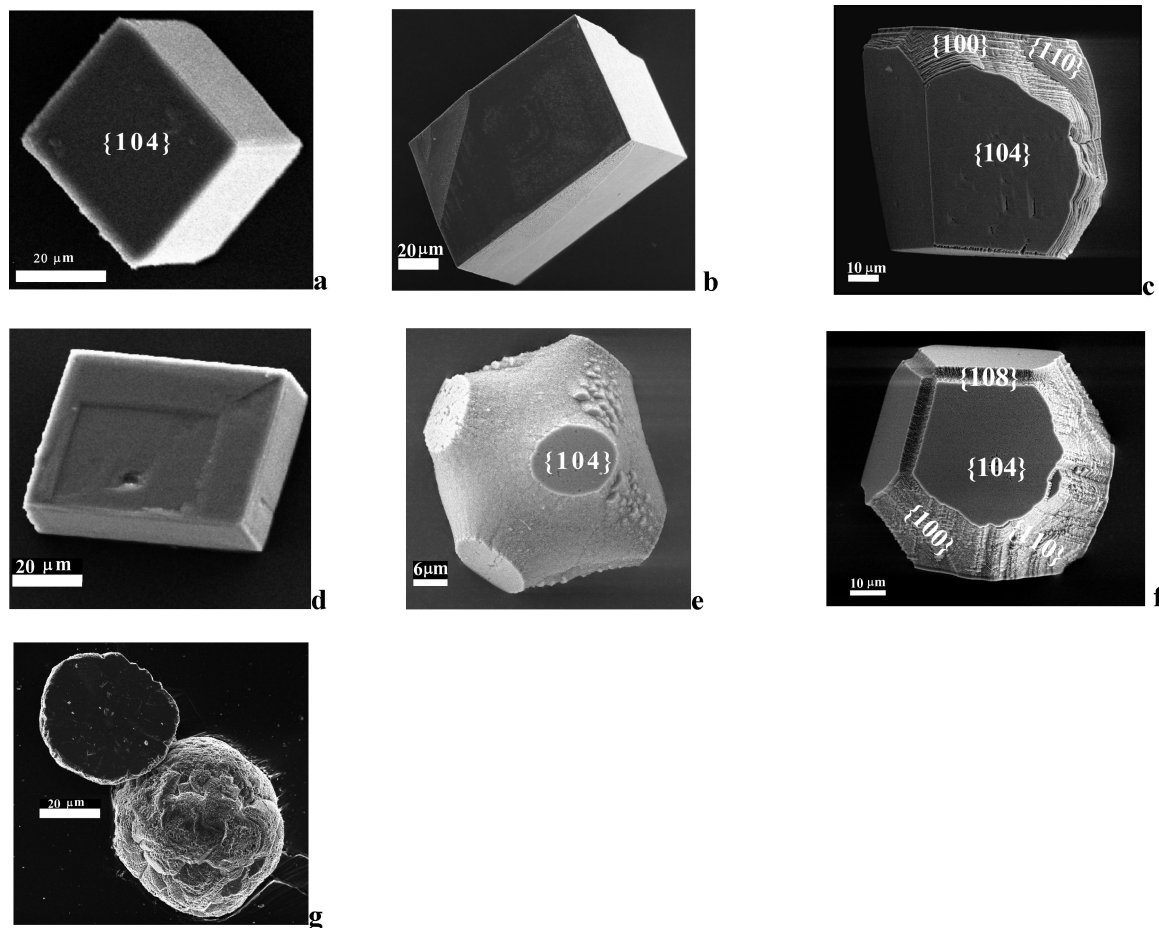


Figure 6. FESEM images of (a) calcite grown in the presence of 128 $\mu\text{g/mL}$ lysozyme; (b) calcite grown using 128 $\mu\text{g/mL}$ ovalbumin, (c) calcite grown using 128 $\mu\text{g/mL}$ ovotransferrin; (d) calcite grown using 512 $\mu\text{g/mL}$ lysozyme; (e) calcite grown using 512 $\mu\text{g/mL}$ ovalbumin; (f) calcite grown in the presence of 512 $\mu\text{g/mL}$ ovotransferrin; (g) calcite crystals grown in the presence of a purified fraction of the eggshell containing mainly ovocleidin-116. Most representative calcite faces are indexed.

matrix studied by Hernandez-Hernandez et al.²³ (i.e., fractions *g* composed of ovotransferrin, ovomucoid, quiescence-specific protein and ovocleidin-116, and the fraction *r* composed of quiescence-specific protein, ovocleidin-17, chain A, and some nonidentified sequences) showed a remarkable ability to inhibit the nucleation. The fraction *g'*, which was composed mainly of OC-116, was very active in modifying the growth mechanism from a spiral mechanism to an aggregation–agglomeration growth mechanism. However, uterine fluids with highly complex organic and inorganic composition (those from which calcite crystals forming the eggshell precipitate *in vivo*)^{2,16} have a much stronger effect in each one of the precipitation stages (i.e., nucleation, crystal growth and morphology modification). The stronger effect of uterine fluids compared to egg white proteins or eggshell extracts could be due to the following reasons: (1) there is not a significative alteration of the natural state of the original components, (2) the possible cooperative or even synergistic interactions between the wide array of organic components present in these fluids, and (3) the specific chemical and environmental scenario, namely, pH, partial pressure of CO_2 and biologically available calcium that only exist in this latter system.²²

It is important to understand the evolution of the chemical environment (i.e., uterine fluid) in which eggshell forms. During the different stages, the composition of the uterine fluid changed in the number and concentration of the diverse organic components.^{2,13,17,31} At the same time the concentration of

calcium and the partial pressure of CO_2 supplied throughout the uterus varied in a regulated manner to produce the mineralization of the shell in a very short time (around 20 h).

There is very limited information regarding the specific role of the individual organic components involved in eggshell mineralization.^{2,32} In this respect, comparison of electrophoretic profiles SDS–PAGE of the uterine fluids before and after CaCO_3 precipitation (Figures 4a,b) with their respective pH profiles when the uterine fluids were used as protein bearing solutions in CaCO_3 precipitation experiments is specially relevant in order to shed light to determine which are the active proteins regulating eggshell growth and those active in regulating the chemistry of the system. We propose that those proteins that have been removed by the precipitate in successive stages (and do not show up in the electrophoretic profiles after CaCO_3 precipitation) have a strong affinity toward calcite surfaces and should have an active role in controlling calcite growth or its aggregation behavior.²³ Among these proteins are the acidic proteins OC-17, OCX-32 and osteopontin (see Table 2), which are selectively removed by the precipitate. These proteins should display a net negative charge during the precipitation process (which takes place within the pH range from 7.6 to 9.03) whereas calcite crystals at this pH range are neutral or positively charged. Calcite point of zero charge, pH_{pzc} , is around 8.3 and the concentration of Ca^{2+} in the uterine fluid bearing solutions is slightly higher than in the control experiment. Under these conditions electrostatic interactions can take place between these

Table 2. Molecular Weight, Isoelectric Point and Localization of Some Selected Proteins Associated to the Process of Eggshell Formation^{15,28–30}

protein	localization	MW (kDa)	pI (theoretical)
ovalbumin	egg white, uterine fluid of the stage I	45.0	4.5
ovotransferrin	eggshell membranes, uterine fluid of the stage I	77.0	6.05
lysozyme	eggshell membranes, uterine fluid of the three stages specially at the growth phase	14.3	9.3
ovomuroid clusterin		21.2	
	the bases of the mammillary cores, and palisade	52	
ovocalyxin-21		21	9.3
ovocalyxin-25		25	8.84
ovocalyxin-32	the external part of the calcified shell (palisade, vertical crystal layer and cuticle)	32	6.81
ovocalyxin-36	eggshell membranes and basal parts of the mammillary cores, and palisade matrix	38	5.62
ovocleidin-116	mammillary and palisade layers	77.3	6.62
ovocleidin-17 (chain A)	mammillary and palisade layers	15.7	4.03
cystatin		15.6	8.4
ovoglican		207	
osteopontin	in the core of the eggshell membranes, at the bases of the mammilla, in the outer of and throughout the palisade layer	55	4.5–4.6

proteins and calcite leading to their adsorption to calcite surfaces during crystal growth. The adsorption of proteins to calcite could occur through deprotonized negatively charged $-\text{COO}^-$ groups of the proteins and the positively charged surface complexes, that is, $<\text{CO}_3\text{Ca}^+$. As a result of this process, the calcite crystals show modified rhombohedral morphologies as was found in our previous work²² using an acidic model globular protein. Additionally, calcite crystals treated with proteinase-K buffer reveal holes that indicate the previous presence of adsorbed and/or occluded proteins.

In fluid II, OC-116, osteopontin and lysozyme (a minority component) are removed after CaCO_3 precipitation. OC-116, with pI of 6.62, and osteopontin, with pI 4.5–4.6 (Table 2) are both negatively charged along the precipitation process (the pH ranged from 7.43 to 8.25), while the CaCO_3 crystals must be neutral or positively charged due to the charge reversion caused by the higher concentration of Ca^{2+} respect to that in the control experiment.

On the other hand, proteins remaining in solution after CaCO_3 precipitation should not be so active in the control of mineralization. However, they could also influence calcium carbonate precipitation by modifying the chemical environment (i.e., pH, supersaturation, level of Ca). For instance, in fluid I, ovalbumin, ovotransferrin and lysozyme, proteins that are not removed by CaCO_3 precipitation, slightly favors calcite nucleation in *in vitro* experiments. Moreover, OCX-21 and OC-17, which have very different isoelectric points (pI 9.3 and pI 4.1 respectively), may be responsible for the high buffering capacity of fluid II in spite of being minority components of the complex mixture of proteins. The fact that OCX-21 and OC-17 are minority components and have different isoelectric points could explain the similar buffering capacity of the two fluids of the stage II tested (those collected in different days, whose concentrations were 97 and 479 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively). In the formation of this buffer other basic proteins like lysozyme could have participated. However, because of the peculiar pH behavior described above was only found when using uterine fluid of the stage II as protein bearing solution, we can discard the presence of this protein in the buffer. This pH-stat chemical scenario favors the growth of calcite³² and could explain the fast growth stage during eggshell formation in which large columnar calcite crystals (palisades) are deposited. Also, in fluid II bearing experiments, lysozyme is removed by the precipitate, probably adsorbed because of the surface charge reversion caused by the previous adsorption of OC-116 and osteopontin. Interestingly, lysozyme, though its main putative role is as a bactericidal, has been found in the palisade layer of eggshell.¹⁰ In fluid III bearing experiments,

OCX-32 was selectively removed after CaCO_3 precipitation. In general, OCX-32 shows a high absorption affinity to calcite and has a high inhibitory effect of the precipitation of CaCO_3 . This result is consistent with previously reported work that describes the inhibition of the precipitation that fluid III has on metastable solutions formed by calcium chloride and sodium bicarbonate. The authors believe that this protein could have an important role in the arrest of eggshell mineralization.⁹

Regarding the control over the crystal growth processes, we have found that all organic components tested affected calcium carbonate precipitation at three fundamental levels: (a) selecting or at least favoring the precipitation of a particular mineral phase, (b) controlling the number of crystals or the nucleation flux, and (c) controlling crystal morphology and the aggregation behavior.

At the first level, calcite formation is favored over the other calcium carbonate polymorphs (e.g., aragonite and vaterite). This study shows that eggshell extracts and uterine fluids were especially effective in selecting calcite and suppressing totally the appearance of vaterite and aragonite, despite the fact that the system is supersaturated with respect to the three main calcium carbonate polymorphs (e.g., calcite, aragonite and vaterite) as well as other common calcifying minerals (i.e., hydroxyapatite). Only in the terminal stage hydroxyapatite is found. This superior capacity for selecting a specific polymorphic mineral phase is well described in other biological mineralization processes. For instance, some mollusc shell proteins are able to switch from calcite to aragonite and back.^{33,34}

Macromolecules also have an important effect on the nucleation flux. We have observed that some individual egg white proteins and purified fractions of the organic matrix are active in controlling calcite nucleation. Nevertheless, uterine fluids are much more active and induced a more intense nucleation. These phenomena occurred irrespectively of the stage of eggshell formation at which these fluids were extracted. In our experimental system, we have added calcium to the uterine fluid to reproduce the control conditions. This added calcium could explain partly a more intense nucleation. However, the small difference in calcium concentration in the uterine fluid bearing solution compared to that of the control solution could not explain by itself such a large increase in nucleation density. The uterine fluid bearing solutions produced a total number of calcite crystals per drop which was at least 2 orders of magnitude more intense than any other individual commercial proteins or purified extracts of the eggshell organic matrix tested. In our opinion, the presence of charged proteins and other

organic compounds facilitate adsorption of calcium ions to their surface therefore favoring the nucleation of calcite by a mechanism known as the ionotropic effect.³⁵

Alternatively, some proteins have a strong affinity to specific calcite surfaces and could favor the nucleation more actively acting as templates. This template effect is due to a stereochemical matching between the disposition of specific functional groups (i.e., COOH⁻) in the proteins or their motifs and the arrangement of carbonate or calcium ions in specific target calcite faces. The large increase in the nucleation could also be due to a cooperative interaction of different proteins and/or other organic components present in the fluids since the same individual components or eggshell extracts composed of a lower array of organic components show a much more limited effect on nucleation. However, we cannot discard the possibility that the lower effect of individual components on CaCO₃ precipitation could be due to an alteration of the natural state of proteins derived from the extraction and purification procedures. If some proteins act as a template for calcite nucleation at their natural state, any alteration of their molecular configuration could significantly decrease their capacity to induce calcite nucleation by a template mechanism.

Finally, in vitro CaCO₃ precipitation experiments show that individual commercial egg white proteins, at concentrations similar to those found in the uterine fluids, have very weak effect on crystal morphology. In contrast, purified extracts of the eggshell organic matrix and uterine fluids have a strong and specific effect on calcite crystal morphologies. For instance, fluid I induced the overexpression of specific crystal faces of calcite, that is, the {110} and {100} prismatic forms of calcite. On the other hand, fluid II and III bearing solutions seem to promote aggregation of calcite crystals and modified the calcite morphologies on a less specific way.

Modifications in crystal growth morphology can provide insights regarding protein–mineral surface interactions.³⁵ The type of modification depends on the specificity of the protein–mineral interactions. In the case that there is stereochemical compatibility between the protein and a particular crystal face, the protein will be preferentially adsorbed to this face and all symmetrically equivalent faces. These faces will be expressed as a consequence of reductions in their normal growth rate and the morphology of the crystals will be modified accordingly. However, in other cases a nonspecific adsorption of proteins (to minimize hydrophobic interaction with the solution) can explain a greater modification of calcite crystals in an unspecific way resulting in rounded crystals without well-defined crystal faces.^{22,36}

The above results shed light into understanding what occurs in vivo. Although these results cannot explain how eggshell growth is stopped, we have shown how specific eggshell organic extracts are highly effective in decreasing crystal nucleation. The sum of all these findings suggest the high level of control exerted by the organism over the biomineralization of the shell and, in particular, over the formation of its mineral part, which is composed of calcite crystals of well-defined orientation, size and morphologies. In addition to the control of crystal growth exerted by the organic matrix components,^{2,3,7} there is a competitive process during the growth of adjacent crystals resulting in a columnar microstructure with a preferential crystallographic orientation.^{5,37}

This precise control over composition and the microstructural characteristics of the eggshell has important consequences in

the mechanical properties, integrity and functionality of this biomaterial.^{26,38}

Conclusions

In summary, to understand the role of organic components during eggshell formation, we have used organic bearing solutions with different levels of complexity, from the simplest (individual eggshell proteins) to the most complex and realistic composition (uterine fluids) that could simulate the natural process. Using this approach, we found that the precise control of eggshell formation can be due to the combined action of the components present in the uterine fluid which regulate crystal growth and the chemistry of the system. However, in vitro CaCO₃ precipitation experiments reveal that some specific acidic proteins (including OC-17, OCX-32, OC-116 and osteopontin) inside the uterine fluid and in the purified eggshell extracts have a strong affinity for the surface of CaCO₃ and are selectively removed from the solution during its precipitation. These proteins must have an active role in CaCO₃ growth, aggregation and inhibition. Other proteins regulate the chemical environment in which the precipitation takes place, that is, by buffering the pH favoring crystal growth as for instance the OC-17 and OCX 21. Individual egg white proteins (lysozyme, ovalbumin, ovotransferrin), at concentrations similar to those found in uterine fluids, affected slightly the nucleation density and growth morphology of calcite in in vitro experiments, but did not select exclusively calcite as precipitating polymorph.

Acknowledgment. This work was supported by funding received from the European Community for the project Egg Defense (QLRT-2001-01606). A.H.H., J.G.M. and J.M.G.R. also acknowledge the Excellence project RNM1344 of the Junta de Andalucía and to the “Factoría de Cristalización” (Consolider Ingenio 2010).

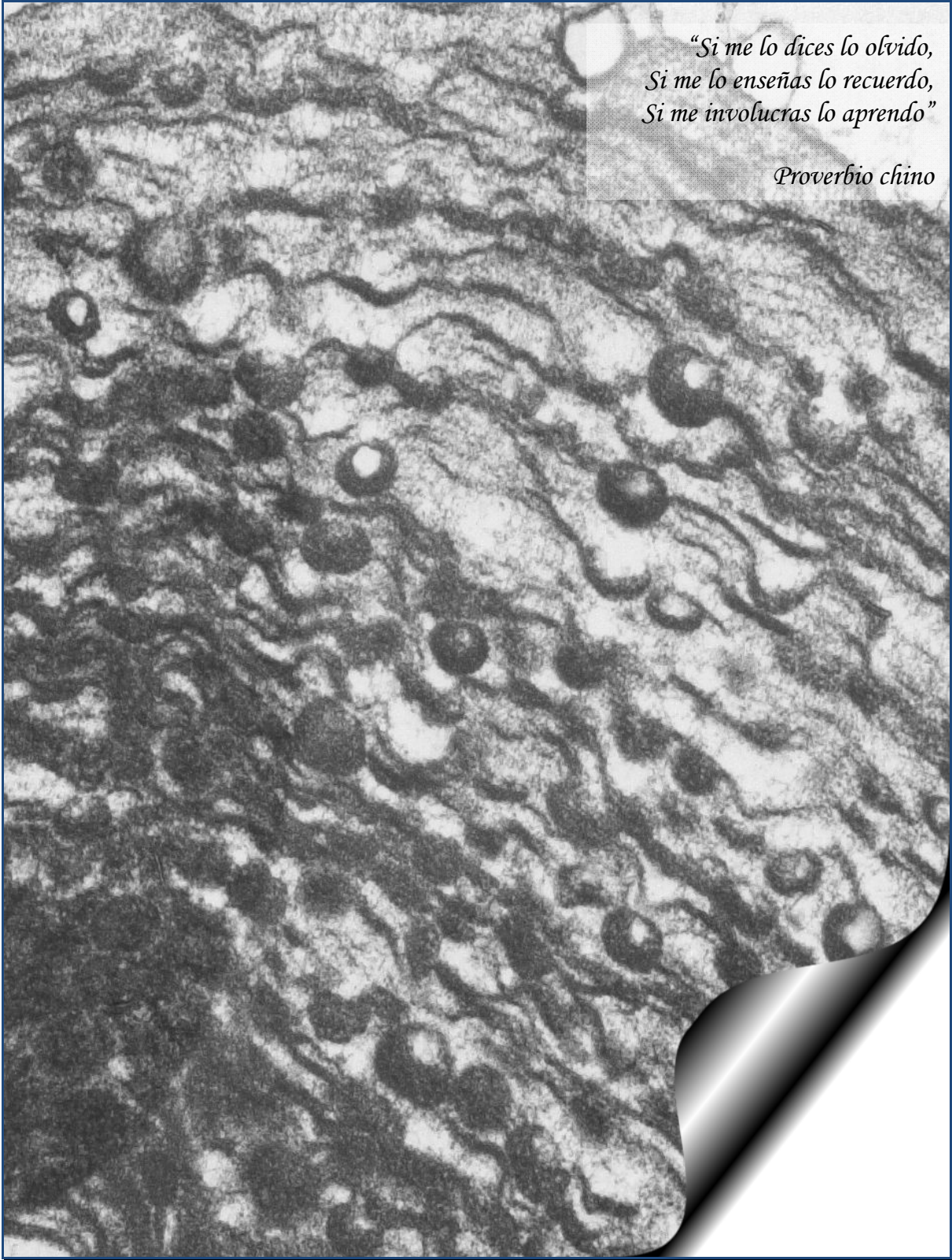
References

- (1) Fink, D. J. *MRS Bull.* **1992**, *17*, 27–31.
- (2) Nys, Y.; Gautron, J.; García-Ruiz, J. M.; Hincke, M. T. *C. R. Palevol.* **2004**, *3*, 549–562.
- (3) Arias, J. L.; Fink, D. J.; Xiao, S.; Heuer, A. H.; Caplan, A. I. *Int. Rev. Cytol.* **1993**, *145*, 217–250.
- (4) Simkiss, K.; Wilbur, K. M. *Biomaterialization: Cell Biology and Mineral Deposition*; Academic Press: San Diego, 1989.
- (5) Rodríguez-Navarro, A.; García-Ruiz, J. M. *Eur. J. Mineral.* **2000**, *12*, 609–614.
- (6) Dennis, J. E.; Xiao, S. Q.; Agarval, M.; Fink, D. J.; Heuer, A. H.; Caplan, A. I. *J. Morphol.* **1996**, *228*, 287–306.
- (7) Nys, Y.; Hincke, M. T.; Arias, J. L.; García-Ruiz, J. M.; Solomon, S. E. *Poult. Avian Biol. Rev.* **1999**, *10*, 143–166.
- (8) Nys, Y.; Zawadzki, J.; Gautron, J.; Mills, A. D. *Poult. Sci.* **1991**, *70*, 1236–1245.
- (9) Gautron, J.; Hincke, M. T.; Mann, K.; Panheleux, M.; Bain, M.; McKee, M. D.; Solomon, S. E.; Nys, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 39243–39252.
- (10) Hincke, M. T.; Gautron, J.; Panheleux, M.; García-Ruiz, J.; McKee, M. D.; Nys, Y. *Matrix Biol.* **2000**, *19*, 443–453.
- (11) Mann, K.; Gautron, J.; Nys, Y.; McKee, M. D.; Bajari, T.; Schneider, W. J.; Hincke, M. T. *Matrix Biol.* **2003**, *22*, 397–407.
- (12) Pines, M.; Knopov, V.; Bar, A. *Matrix Biol.* **1995**, *14*, 765–771.
- (13) Fernández, M. S.; Moya, A.; López, L.; Arias, J. L. *Matrix Biol.* **2001**, *19*, 793–803.
- (14) Gautron, J.; Murayama, E.; Vignal, A.; Morisson, M.; McKee, M. D.; Rehault, S.; Labas, V.; Belghazi, M.; Vidal, M. L.; Nys, Y.; Hincke, M. T. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 5273–5286.
- (15) Hincke, M. T. *Connect. Tissue Res.* **1995**, *31*, 227–233.
- (16) Mann, K.; Macek, B.; Olsen, J. V. *Proteomics* **2006**, *6*, 3801–3810.
- (17) Gautron, J.; Hincke, M. T.; Nys, Y. *Connect. Tissue Res.* **1997**, *36*, 195–210.
- (18) Arias, J. L.; Fernández, M. S.; Dennis, J. E.; Caplan, A. I. *Connect. Tissue Res.* **1991**, *26*, 37–45.

- (19) Fernandez, M. S.; Arias, J. L. *Eur. Symp. Egg Qual. Egg Prod.* **1999**, 81–86.
- (20) Hincke, M. T. *J. Histochem. Cytochem.* **2008**, 56, 467–476.
- (21) Arias, J. L.; Mann, K.; Nys, Y.; Garcia-Ruiz, J. M.; Fernandez, M. *Handbook of Biomineralization*; Bauerlein, E., Ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH and Co: Weinheim, 2007.
- (22) Hernández-Hernández, A.; Rodríguez-Navarro, A.; Gómez-Morales, J.; Jiménez-Lopez, C.; Nys, Y.; García-Ruiz, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2008**, 8, 1495–1502.
- (23) Hernández-Hernández, A.; Vidal, M. L.; Gómez-Morales, J.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Labas, V.; Gautron, J.; Nys, Y.; García-Ruiz, J. M. *J. Cryst. Growth* **2008**, 310, 1754–1759.
- (24) Layne, E. *Methods Enzymol.* **1957**, 3, 447–454.
- (25) Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248–254.
- (26) Ahmed, A. M. H.; Rodríguez-Navarro, A. B.; Vidal, M. L.; Gautron, J.; García-Ruiz, J. M.; Nys, Y. *Br. Poult. Sci.* **2005**, 46, 268–279.
- (27) Shiao, J. C.; Tzeng, C. S.; Leu, C. L.; Chen, F. C. *J. Fish Biol.* **1999**, 54, 302–309.
- (28) <http://www.worthington-biochem.com/OA/default.html>.
- (29) Diamond, R. *J. Mol. Biol.* **1974**, 82, 371–391.
- (30) Holen, E.; Elsayed, S. *Int. Arch. Allergy Immol.* **1990**, 91, 136–141.
- (31) Fernandez, M. S.; Passalacqua, K.; Arias, J. I.; Arias, J. L. *J. Struct. Biol.* **2004**, 148, 1–10.
- (32) Mann, K.; Siedler, F. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1696, 41–50.
- (33) Belcher, A. M.; Wu, X. H.; Christensen, R. J.; Hansma, P. K.; Stucky, G. D.; Morse, D. E. *Nature* **1996**, 381, 56–58.
- (34) Falini, G.; Albeck, S.; Weiner, S.; Addadi, L. *Science* **1996**, 271, 67–69.
- (35) Addadi, L.; Weiner, S. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1992**, 31, 153–169.
- (36) Jimenez-Lopez, C.; Rodriguez-Navarro, A.; Dominguez-Vera, J. M.; Garcia-Ruiz, J. M. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, 67, 1667–1676.
- (37) Garcia-Ruiz, J. M. *Mat. Sci. Eng. C- BioS.* **1995**, 3, 95–100.
- (38) Rodríguez-Navarro, A. B.; Yebra, A.; Nys, Y.; Jiménez-López, C.; García-Ruiz, J. M. *Eur. J. Mineral.* **2000**, 12, 609–614.
- (39) Rodríguez-Navarro, A.; Kalin, O.; Nys, Y.; García-Ruiz, J. M. *Brit. Poult. Sci.* **2002**, 43, 395–403.

CG800786S

Capítulo 4

A black and white electron micrograph of a cell, showing a complex network of membranes and organelles. The image is framed by a dark border, and the bottom right corner is curled up like a page. A semi-transparent text box is overlaid in the upper right quadrant.

*“Si me lo dices lo olvido,
Si me lo enseñas lo recuerdo,
Si me involucras lo aprendo”*

Proverbio chino

CONCLUSIONES

Para entender los procesos de formación de biominerales de carbonato calcio es necesario conocer los mecanismos mediante los cuales los organismos controlan la precipitación de carbonato cálcico. En estos procesos juegan un papel fundamental determinadas proteínas y otros componentes orgánicos específicos que promueven y regulan la formación de la fase mineral.

A fin de estudiar la interacción entre proteínas y minerales de carbonato cálcico y así entender mejor los procesos de biomineralización, es necesario estudiar en detalle el efecto de las proteínas sobre la precipitación de carbonato cálcico y en particular sobre los procesos de nucleación, selección de fases polimórficas, alteración de los mecanismos de crecimiento y modificación de la morfología y tamaño de los cristales de carbonato cálcico.

Para ello, en esta tesis, se ha desarrollado un micrométodo de precipitación de carbonato cálcico basada en una técnica de difusión de vapor en gota sedente. Este método se ha utilizado para simular *in vitro* las condiciones de formación de biominerales de carbonato cálcico en sistemas biológicos.

El sistema experimental seleccionado denominado la “*seta de cristalización*” permite controlar y seguir de forma directa *in situ e in tempore* el proceso de precipitación mediante microscopía óptica. Asimismo, permite determinar con facilidad los principales parámetros del proceso de cristalización tales como: a) la evolución del pH durante el transcurso de un experimento; b) el número de cristales, su morfología y tamaño; c) identificar la fase polimórfica de los cristales de carbonato cálcico, en base a su morfología. Además, al ser un micrométodo, permite trabajar con volúmenes de solución muy pequeños (del orden de microlitros), que usan una cantidad muy pequeña de proteína u otros extractos orgánicos de especial relevancia en los estudios de

biomineralización. Por lo general, la cantidad disponible de estos componentes orgánicos es muy escasa y se necesita métodos que minimicen su gasto.

Una vez caracterizado el comportamiento del sistema de la “*seta de cristalización*” en el caso de la precipitación de carbonato cálcico en ausencia de aditivos, hemos utilizado este sistema para estudiar los mecanismos de interacción entre proteínas y minerales de carbonato cálcico, durante el proceso de precipitación, como primera aproximación para estudiar los procesos de biomineralización. Para ello, en primer lugar, se han utilizado proteínas modelo (lisozima, ribonucleasa, mioglobina y α -lactoalbúmina) que tienen tamaño semejante (alrededor de 14 kDa) y la misma conformación (globular), pero que difieren en su carga superficial, ya que tienen puntos isoeléctricos diferentes.

Se ha observado que la presencia de este tipo de proteínas afecta de manera notable al proceso de precipitación de carbonato cálcico y modifica los principales parámetros de cristalización medidos: Flujo de nucleación, crecimiento cristalino, selección de fases polimórficas, morfología y tamaño de los cristales.

Además hemos observado, que a bajas concentraciones de proteína, se promueve la nucleación mientras que a altas concentraciones, la nucleación se inhibe. Las cuatro proteínas estudiadas estabilizan a la calcita frente a otras fases polimórficas del carbonato cálcico (aragonito y vaterita). Sin embargo, las proteínas con punto isoeléctrico más bajo son las más efectivas en favorecer la formación de calcita inhibiendo de forma casi completa la formación de las otras fases polimórficas. Asimismo, las proteínas modifican la morfología de los cristales de calcita y/o promueven la formación de aglomerados redondeados policristalinos. Este efecto es tanto mayor cuanto más cercano es el punto isoeléctrico de la proteína al pH neutro.

En esta tesis se ha elegido como modelo de estudio de los mecanismos de biomineralización el proceso de formación de la cáscara de huevo ya que es un sistema relativamente simple comparado con otros sistemas biológicos. Para entender el proceso

de formación de este biomaterial hemos realizado una serie de experimentos de precipitación de carbonato calcio *in vitro* en presencia de diferentes proteínas y extractos orgánicos que intervienen en el desarrollo de la calcificación de la cáscara. Este tipo de estudios nos ha permitido identificar que proteínas son activas y cual es la posible función que éstas ejercen en el proceso de regulación de la mineralización de la cáscara. Con esta finalidad, hemos estudiado disoluciones de moléculas biológicas con diferentes grados de complejidad, partiendo del caso más simple al más complejo y que reprodujesen de forma aproximada las condiciones de formación del biomineral en el sistema real. En los diferentes casos estudiados hemos utilizado: 1) proteínas comerciales extraídas de la clara de huevo; 2) extractos purificados de la matriz orgánica de la cáscara de huevo y 3) el fluido uterino extraído en las tres principales etapas de formación de la cascara de huevo.

Los principales resultados de estos estudios indican que hay componentes más activos que otros (p.ej., determinados extractos de la matriz orgánica de la cáscara de huevo) y que afectan de forma más notable a la precipitación del carbonato calcio. Sin embargo, el control preciso en la formación de la cáscara de huevo no se debe a la actuación independiente de unos componentes específicos sino que parece ser debido al efecto combinado de todos los componentes presentes en el fluido uterino. El efecto combinado de los componentes del fluido uterino produce una nucleación muy intensa, de varios órdenes de magnitud mayor que cualquiera de los componentes individuales estudiados por separado. Asimismo, seleccionan como única fase del carbonato cálcico a la calcita (que es la fase mineral de la cáscara de huevo).

En lo que respecta al papel de los componentes individuales del fluido uterino, algunos pueden influir y preparar el escenario químico para la formación del carbonato cálcico, ya sea aumentando la sobresaturación y en consecuencia favoreciendo la nucleación (p.ej., ovalbúmina, ovotransferrina y en menor medida la lisozima), o bien, tamponando el pH y favoreciéndose de este modo el crecimiento cristalino (como en el caso de la ovocleidina-17 y ovocalixina-36, componentes minoritarios pero con muy diferentes puntos isoeléctricos). Además, los experimentos de precipitación *in vitro* revelan que algunas proteínas ácidas (como ovocleidina-17, ovocalixina-32,

ovocleidina-116 y osteopontina) presentan una afinidad muy fuerte por el carbonato cálcico, ya que se retiran de la solución durante la precipitación de éste. Este efecto puede ser indicativo de que estas proteínas juegan un papel muy importante en el crecimiento, agregación o inhibición del carbonato cálcico.

Por último, dado que a concentraciones similares a las encontradas en el fluido uterino, la lisozima, ovoalbúmina y ovotransferrina, presentan un efecto sobre la precipitación del carbonato cálcico comparativamente débil, refuerza la hipótesis de que el papel fundamental de estas proteínas es actuar como agentes antimicrobianos y no como reguladores del proceso de calcificación.

PERSPECTIVAS

El desarrollo de nuevos métodos y sistemas de cristalización que permiten un alto grado de control sobre el proceso de precipitación, como el propuesto en este trabajo de tesis, abre nuevas posibilidades y en nuestro caso ha facilitado el estudiar los mecanismos de interacción entre proteínas y el carbonato cálcico, de gran interés para entender los procesos de formación de minerales por organismos. Este tipo de estudios se puede extender a otros biomateriales, fosfatos, oxalatos etc., por lo que las posibilidades futuras de extender este trabajo son ilimitadas.

Por otro lado, es bien conocido que durante el proceso de formación de tejidos mineralizados no solo intervienen proteínas solubles, sino que determinados materiales orgánicos insolubles (fracción poco explorada) tienen un papel muy importante como sustratos o como plantillas que hacen de soporte y dan forma al tejido y sobre los que ocurre la mineralización. Es por tanto de especial interés realizar estudios de biomineralización *in vitro* usando membranas orgánicas, fibras de colágenos, etc. presentes en los sistemas biológicos: por ejemplo, en otolitos de peces, conchas de moluscos, huesos. En este respecto, el dispositivo experimental utilizado permitiría hacer este tipo de estudios. Por ejemplo, un estudio que podría ser muy interesante sería el intentar crecer artificialmente una cáscara de huevo de gallina *in vitro* partiendo de las membranas internas del cascarón (parte no mineralizada), y haciendo llegar un flujo continuo de solución mineralizante (p.ej., fluido uterino extraído durante la fase activa de formación de la cáscara de huevo), que se podría introducir por un sistema de finos canales para alimentar el sistema con el fluido de manera continua. Asimismo, se podrían controlar otros parámetros como: temperatura (a la temperatura corporal de la gallina), y mantener la sobresaturación del sistema (de la forma más parecida al sistema *in vivo*).

Otro tema a profundizar es estudiar los mecanismos de recrecimiento de cristales de carbonato cálcico en presencia de proteínas modelo (proteínas con una carga

superficial específica) usando como semillas cristales perfectos de calcita. Todos estos estudios, se podrían realizar utilizando el método de “*la seta de cristalización*”.

Para estudios encaminados a comprender los fenómenos de biomineralización haciendo uso de los componentes orgánicos individuales, los métodos de cristalización hasta ahora utilizados requieren de la extracción, aislamiento y purificación de los componentes que se van a investigar, lo que implica muchas horas de trabajo. Una alternativa, para llevar a cabo estudios de biomineralización ahorrando horas de trabajo, sería mediante el uso de un método de cristalización de proteínas desarrollado en nuestro laboratorio basado en la cristalización directa en geles de electroforesis. En nuestro caso, la precipitación de carbonato cálcico se llevaría a cabo directamente en la banda de proteína o fracción orgánica de interés. Estudios previos de este tipo de ensayos los hemos realizado, pero hemos observado que hay una interacción química entre los geles de electroforesis convencionales y el carbonato cálcico, enmascarando el efecto de las proteínas. Es por ello, que se requiere adaptar el método para este tipo de estudios, por ejemplo seleccionando un gel lo más inerte posible o favoreciendo la difusión de la proteína, desde la banda, hacia la solución precipitante.

Otro reto, generado por una experiencia previa obtenida en el laboratorio durante estudios de precipitación de carbonato cálcico en presencia de otolitos de peces teleósteos, es el poder llevar a cabo estudios de desmineralización utilizando el sistema de “*la seta de cristalización*” controlando la fuerza motriz del sistema y por un fenómeno de Ostwald-ripening, favorecer la aparición de cristales de calcita dando lugar a que los cristales de aragonito, que forman la estructura de los otolitos, sea removida dejando expuesta la fracción orgánica insoluble.

