



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE CASCARONES DE
ESPECIES DE DINOSAURIOS DEL PERÍODO CRETÁCICO SUPERIOR Y SU POSIBLE
RELACIÓN CON CASCARONES DE HUEVO DE AVES Y REPTILES ARCOSAURIOS

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

Ms.C. NERITH ROCIO ELEJALDE CADENA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. NURIA VICTORIA SÁNCHEZ PUIG
INSTITUTO DE QUÍMICA

DR. LAURO BUCIO GALINDO
INSTITUTO DE FÍSICA

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

INVESTIGACIONES BIOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE CASCARONES DE
ESPECIES DE DINOSAURIOS DEL PERÍODO CRETÁCICO SUPERIOR Y SU POSIBLE
RELACIÓN CON CASCARONES DE HUEVO DE AVES Y REPTILES ARCOSAURIOS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. NERITH ROCIO ELEJALDE CADENA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ABEL MORENO CÁRCAMO
INSTITUTO DE QUÍMICA



CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2022

DEDICATORIA

“Algún día en cualquier parte, en cualquier lugar indefectiblemente te encontrarás a ti mismo, y ésa, sólo ésa, puede ser la más feliz o la más amarga de tus horas”

Pablo Neruda

En la vida, pequeños ideales se vuelven frecuentemente el único camino por el que andan aquellas voluntades pequeñas que han sido limitadas a no pensar de forma distinta. Así, tratan de estorbarnos para que no soñemos lo suficientemente alto y, como resultado, dejemos de creer en nosotros mismos. Esos pequeños ideales, se vuelven dentro de nosotros, un conjunto de partículas malignas que nos hacen creer que exteriormente tenemos una armadura indestructible, que ya somos lo que tenemos que ser, mientras que, al mismo tiempo, nos carcome poco a poco en nuestro interior. Ante ese engaño, lo único que logramos es perder el camino hacia la felicidad.

En la historia de mi vida, hubo una etapa en donde esos pequeños ideales trataron de secuestrar mi pensamiento. Fui encaminada hacia ellos cuando comencé a dejar de creer en mí misma y en mis capacidades. En aquel tiempo, caí en un profundo sentimiento de frustración que, sin embargo y de forma potente se convirtió en el trampolín que me ayudó a pensar de forma distinta. Los pequeños ideales me engañaron de manera tal, que llegué a creer que lo más digno de la vida era ser alguien más del montón. El proyecto que tienes en tus manos, no es tan solo un escrito que culmina un grado escolar más es un proyecto que guarda en sus entrañas aquel salto que mi voluntad tomó como reto, y que, al construirlo, me llevó a experimentar el derrocamiento de aquellos límites débiles en donde esos pequeños ideales trataron de hundirme. Por lo tanto, me permito escribir con agradecimiento y con una sonrisa en mi rostro.

Primero, dedico esta tesis a Dios por darme salud, paz y fuerzas para salir adelante con la frente en alto, sabiendo que si estaba en la UNAM es porque Él siempre tiene un propósito para mí, y estaba dispuesta a averiguarlo. Luego, dedico esta tesis a mi madre Mireya Cadena Nieves, que, de manera maternal y tierna, siempre me apoyó y me decía que podría lograr todo lo que me propusiera, siempre y cuando, pusiera mi corazón en eso. A mis hermanas Zaira y Laura, porque de una u otra manera, siempre he sido su prioridad y me han dado su apoyo incondicional. Y cada día puedo decir, que creo ciegamente en sus palabras.

En fin, nadie puede quitarnos la capacidad de soñar, y lo más bonito es poder cumplir estos sueños, y que después de tanto esfuerzo y valor, puedas mirar al cielo y decir: ¡Lo logré!

AGRADECIMIENTOS

“Hay que convertir la vida en un sueño, y volver realidad los sueños”

Pierre Curie

A mi familia que siempre estuvieron acompañándome a distancia y dándome su apoyo incondicional.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por los momentos de risas que compartimos y los consejos que siempre me otorgaron. Y a todas las personas que, de una manera directa o indirecta, contribuyeron en el desarrollo de este trabajo.

A mi director de tesis, Dr. Abel Moreno Cárcamo, quién siempre me apoyo desde el primer momento que lo contacté, por su guía y apoyo en la investigación, por su paciencia que a pesar de que cometí muchos errores, siempre me daba fuerzas para continuar.

A la Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig, al Dr. Lauro Bucio Galindo, y al Dr. Roberto Arreguin de los Monteros, quienes siempre me apoyaron durante el proceso de mi trabajo y me brindaron su ayuda y conocimiento. Al Maestro René Hernández del Instituto de Geología por la donación de los cascarones de dinosaurios y guía en temas paleontológicos.

Al Programa de Maestría y Doctorado de Ciencias Químicas, por su diligente trabajo, ayuda y colaboración en cursos y estancias realizadas, los cuales permitieron un crecimiento intelectual, cultural y recuerdos inolvidables y al Instituto de Química por espacio y tiempo otorgado para realizar mis estudios doctorales. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para llevar a cabo mis estudios, Becario No. 889262. Y, por último, y no menos importante, a los sinodales por sus correcciones, consejos y recomendaciones para la finalización de este trabajo.

RESUMEN

Los cascarones de huevo son estructuras compuestas por biominerales que contienen información reproductiva de grandes especies como los vertebrados. Por lo tanto, su estudio ofrece una oportunidad para investigar los taxones extintos debido a la diversa información que se encuentra plasmada en los cascarones de huevo, la cual no está disponible en huesos o en algún otro rastro propio del reino animalia. Además, la información geológica que alguna vez fue puramente biogénico, ya que los cascarones de huevo han experimentado el proceso de fosilización, puede compartir diversas metodologías con otros campos como lo es la mineralogía. Por lo tanto, este trabajo está enfocado en la microestructura y cristalografía de los cascarones de huevo de fósiles colectados en el área de El Rosario, Baja California en México, y de especies modernas utilizando SEM-EDS, XRF, XPS, XRD, entre otras, técnicas utilizadas en la ciencia de materiales y geología estructural.

En primer lugar, la morfología del área superficial, así como los microagregados y los conos mamilares observados en el área transversal de cascarones de huevo fosilizados de las especies ornitópodas (*Spheroolithus* y *Lambeosaurinae*) y terópodos (*Prismatoolithus*) son diferentes entre sí, lo que nos indica que no corresponden al mismo orden. A diferencia de las observadas en los cascarones de especies modernas (emú, avestruz y cocodrilo) que permite identificar la linealidad de los límites de las partes que componen al cascarón. En segundo lugar, la composición química de los cascarones de huevos fosilizado permitió identificar principalmente minerales como: calcita, albita y cuarzo. Además, también se identificaron elementos como P, S, K, Mn, Fe, Sr, Cr, Cu, y Zn, los cuales son un indicativo de que los cascarones sufrieron alteraciones diagenéticas, mientras que, de los cascarones de las especies modernas, se determinó que están compuestos únicamente de calcita. Así mismo, la posible identificación de vibraciones causadas por aminoácidos mediante el uso de FTIR, nos proporciona información acerca de la función de la estructura biomineralizada, ya que probablemente haya cumplido la función de escudo, proporcionando un ambiente adecuado para la conservación de las proteínas, presentes en los cascarones de huevo fosilizados. En tercer lugar, el estudio del área superficial y de la rugosidad de los cascarones de diferentes especies, se realizó utilizando el análisis de dimensiones fractales obtenidas de la información de imágenes de AFM y SEM de las dos superficies, externa e interna. Este tipo de caracterizaciones tanto estructurales como ópticas, contribuye fuertemente al campo de investigación paleontológica, principalmente porque este tipo de muestras son únicas debido a la relevancia biológica en México que permitirá comprender las especies que se han extinguido millones de años atrás. En cuarto lugar, la purificación de proteínas de cascarones de huevo de especies modernas se llevó a cabo utilizando le técnicas de FPLC mediante el método

de exclusión molecular, permitiendo obtener dos proteínas del cascarón de huevo de avestruz (SCA-1 y SCA-2) y emú (DCA-1 y DCA-2), y una del cascarón de huevo de cocodrilo (CCA-2).

Adicional, se llevó a cabo la caracterización de las proteínas presentes dentro del mismo orden (Struthioniformes); de los grupos de función de acuerdo con las características estructurales determinadas *in-silico*; y de los homólogos en diferentes organismos, con la finalidad de ver la relación filogenética presente en todas las clases de especies. Este estudio demostró que las proteínas del orden *Struthioniformes* y *Anseriformes* presentaron regiones altamente conservadas en comparación con los demás órdenes, incluso de las especies de tortugas, cocodrilo, pez y erizo, obtenidos durante el Blast de partida. Por lo tanto, se sugiere que esta región altamente conservada en todas los órdenes de especies se haya conservado evolutivamente.

ABSTRACT

Eggshells are structures composed of biominerals that contain reproductive information for large species such as vertebrates. Therefore, their study offers an opportunity to investigate extinct taxa due to the diverse information that is plastered in eggshells, which is not available in bones or in any other trace typical of the animal kingdom. In addition, geological information that was once purely biogenic, since eggshells have undergone the process of fossilization, can share various methodologies with other fields such as mineralogy. Therefore, this work is focused on the microstructure and crystallography of the eggshells of fossils collected in El Rosario, Baja California in Mexico, and of modern species using SEM-EDS, XRF, XPS, XRD, among other techniques used in materials science and structural geology.

First, the morphology of the surface area, as well as the microaggregates and the mammillary cones observed in the cross-section area of fossilized eggshells of the ornithopod (*Spheroolithus* and Lambeosauriane) and theropod (*Prismatoolithus*) species are different from each other, which indicates that they do not correspond to the same clade. Unlike those observed in the eggshells of modern species (emu, ostrich, and crocodile) that allows to identify the linearity of the limits of the parts that make up the eggshell. Second, the chemical composition of the fossilized eggshells made it possible to identify mainly minerals such as calcite, albite and quartz. In addition, elements such as P, S, K, Mn, Fe, Sr, Cu, Cr, and Zn were also identified which are an indication that the eggshells have diagenetic alteration, while the eggshells of modern species are determined that they are composed solely of calcite. Likewise, the possible identification of vibrations caused by aminoacids using FTIR, provides us with information about the function of the biomineralized structures, since it has probably fulfilled the function of a shield, providing a suitable environment for the conservation of proteins, present in fossilized eggshells. Third, the study of the surface area and the roughness of the eggshells of different species was carried out using the analysis of fractal dimensions obtained from the information of the AFM and SEM images of both surfaces, external and internal. This type of structural and optical characterization contributes strongly to the field of paleontological research, mainly because these types of samples are unique due to the biological relevance in Mexico that will allow us to understand the species that have become extinct millions of years ago. Fourth, the purification of proteins from eggshells of modern species was carried out using FPLC techniques by means of the molecular exclusion method, allowing to obtain two proteins from the ostrich (SCA-1 and SCA-2), emu (DCA-1 and DCA-2), and on from the crocodile eggshells (CCA-2).

Additionally, the characterization of the proteins presents within the same order (Struthioniformes) was carried out; of the groups of function according to the structural characteristics determined *in-*

silico; and of the homologues in different organisms, in order to see the evolutionary and/or phylogenetic relationship present in all kinds of species. This study showed that the proteins of the order *Struthioniformes* and *Anseriformes* presented highly conserved regions in comparison with the other orders, including the species of turtles, crocodile, fish, and hedgehog, obtained during the starting BLAST. Therefore, it is suggested that this highly conserved region in all species orders has been evolutionarily conserved.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Resumen.....	V
Abstract.....	VII
Tabla de Contenido.....	IX
Lista de Figuras.....	XIV
Lista de Tablas.....	XXVI
Lista de Ecuaciones.....	XXVIII
Lista de Abreviaturas y Acrónimos.....	XXIX
Capítulo 1. Información General.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.1.1 Formación del cascarón.....	2
1.1.2 Especies en estudio.....	3
1.1.2.1 Avestruz.....	3
1.1.2.2 Emú.....	4
1.1.2.3 Cocodrilo americano.....	4
1.1.2.4 Dinosaurios.....	5
1.1.2.4.1 Familia Hadrosauridae.....	5
1.1.2.4.2 Familia Lambeosaurinae.....	5
1.1.2.4.3 Familia Troodontidae.....	6
1.1.3 Estudios realizados en cascarones de huevo.....	6
1.1.3.1 Cascarones de huevos fosilizados.....	6
1.1.3.2 Cascarones de huevo de especies actuales.....	7
1.2 Justificación.....	8
1.3 Hipótesis.....	9
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 Objetivo general.....	9
1.4.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2. Análisis elemental y morfológico de los cascarones de diferentes especies.....	11
2.1 Introducción.....	12
2.1.1 Ornamentación presente en los huevos.....	12
2.1.1.1 Tipos de huevos con cascarón calcáreo rígido.....	13

2.1.2 Parataxonomía de huevos fosilizados.....	13
2.1.3 Ubicación geográfica de la colecta de los cascarones de huevo de dinosaurio...	14
2.2 Metodología.....	15
2.2.1 Caracterización morfológica por microscopia electrónica de barrido (SEM).....	15
2.2.2 Mapeo usando microscopia electrónica de barrido de alta resolución (HRSEM) y espectroscopia de energía dispersiva (EDS).....	15
2.2.3 Caracterización elemental por fluorescencia de rayos-X (XRF).....	15
2.2.4 Caracterización elemental por espectroscopia foto-electrónica de rayos-X (XPS).....	16
2.3 Resultados y Discusión.....	16
2.3.1 Cascarones de huevos en estudio.....	16
2.3.1.1 Cascarones de dinosaurio.....	16
2.3.1.2 Cascarones de especies actuales.....	17
2.3.2 Caracterización morfológica usando SEM.....	18
2.3.2.1 Identificación de estructuras presentes en la superficie externa e interna.....	18
2.3.2.1.1 Estructuras en cascarones de huevo de dinosaurio.....	18
2.3.2.1.2 Estructuras en cascarones de huevo de especies actuales.....	20
2.3.2.2 Identificación de estructuras presentes en la sección transversal.....	21
2.3.2.2.1 Estructuras en cascarones de huevo de dinosaurio.....	21
2.3.2.2.2 Estructuras en cascarones de huevo de especies actuales.....	22
2.3.3 Análisis de la distribución elemental mediante EDS.....	25
2.3.3.1 Análisis elemental de cascarones de huevo de dinosaurios.....	25
2.3.3.2 Análisis elemental de cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo.....	27
2.3.4 Mapeo por EDS de los cascarones de huevo de dinosaurio.....	28
2.3.5 Análisis elemental por XRF de cascarones de huevo de dinosaurio.....	29
2.3.6 Estados electrónicos de los elementos determinados mediante XPS de los cascarones de huevo de dinosaurio.....	30
2.4 Conclusiones.....	35
2.5 Anexos.....	35
Anexo 2.1: Análisis elemental de los cascarones de huevo de dinosaurio por EDS.....	35
Anexo 2.2: Análisis del mapeo realizado por EDS en cascarones de huevo de dinosaurio.....	37
Anexo 2.3: Estados electrónicos de los elementos por XPS.....	41
Capítulo 3. Composición molecular de cascarones de huevo aves, reptiles y dinosaurios.....	48
3.1 Introducción.....	49

3.2 Metodología	50
3.2.1 Identificación de minerales mediante el uso de espectroscopia de fotoluminiscencia (FS).....	50
3.2.2 Identificación mineralógica mediante espectroscopia Raman (microRaman).....	50
3.2.3 Caracterización de minerales por difracción de rayos-X (XRD).....	50
3.2.4 Determinación de las moléculas orgánicas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR).....	50
3.3 Resultados y Discusión	51
3.3.1 Determinación de la fluorescencia de moléculas presentes en los cascarones de huevo mediante FS.....	51
3.3.1.1 Fotoluminiscencia en cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo.....	51
3.3.1.2 Fotoluminiscencia en cascarones de huevo de dinosaurio.....	53
3.3.2 Identificación molecular en cascarones de huevo de dinosaurio mediante microRaman.....	55
3.3.3 Determinación de las fases usando XRD.....	59
3.3.3.1 Difracción de rayos-X en cascarones de huevo dinosaurio.....	60
3.3.3.2 Difracción de rayos-x en cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo.....	62
3.3.4 Caracterización de moléculas orgánicas utilizando FT-IR.....	64
3.4 Conclusiones	68
3.5 Anexos	69
Anexo 3.1: Determinación de la fotoluminiscencia de los cascarones de huevo por FS.....	69
Anexo 3.2: Análisis molecular por espectroscopía Raman.....	77
Anexo 3.3: Caracterización de cristalitas por XRD.....	81
Anexo 3.4: Moléculas orgánicas caracterizadas por FT-IR.....	82
Capítulo 4. Determinación de la rugosidad y área superficial de los cascarones de especies ancestrales y actuales	85
4.1 Introducción	86
4.2 Metodología	88
4.2.1 Identificación de la morfología de los poros y dimensión fractal (2D) por microscopia electrónica de barrido (SEM) de cascarones de huevo de dinosaurio.....	88
4.2.2 Determinación de la dimensión fractal (3D), rugosidad y área superficial mediante microscopia de fuerza atómica (AFM) de cascarones de huevo de dinosaurio.....	88
4.3 Resultados y Discusión	89

4.3.1 Determinación de la dimensión fractal (2D) e identificación del diámetro de los poros mediante imágenes de SEM de cascarones de huevo de dinosaurio.....	89
4.3.2 Determinación de la dimensión fractal (3D), rugosidad y área superficial mediante imágenes de AFM de cascarones de huevo de dinosaurio.....	92
4.3.3 Identificación del tamaño y morfología de los poros en cascarones de huevo de dinosaurio y especies actuales.....	96
4.4 Conclusiones.....	99
4.5 Anexos.....	100
Anexo 4.1: Determinación de la rugosidad y el tamaño del poro mediante SEM y AFM.....	100
Capítulo 5. Relación bioquímica de los cascarones de aves y reptiles con otras especies.....	107
5.1 Introducción.....	108
5.2 Metodología.....	110
5.2.1 Proteínas intraminerales.....	110
5.2.1.1 Aislamiento de proteínas intraminerales.....	110
5.2.1.2 Purificación de proteínas intraminerales.....	110
5.2.1.3 Identificación de las proteínas intraminerales.....	111
5.2.1.4 Determinación del peso molecular.....	111
5.2.1.5 Análisis mediante dispersión de luz dinámica (DLS).....	112
5.2.1.6 Crecimiento de cristales.....	112
5.2.2 Construcción del árbol filogenético.....	112
5.2.2.1 Inferencia evolutiva de las estruthiocalcinas.....	112
5.2.2.2 Identificación de los residuos evolutivamente conservados y construcción del árbol filogenético.....	112
5.3 Resultados y Discusión.....	113
5.3.1 Aislamiento de proteínas intraminerales presentes en los cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo.....	113
5.3.2 Optimización del método para la purificación de proteínas intraminerales.....	114
5.3.2.1 Purificación mediante UPLC.....	114
5.3.2.1.1 Proteínas del cascarón de huevo de cocodrilo (CCA-1 y CCA-2).....	114
5.3.2.1.2 Cristalización de las proteínas de cascarón de huevo de cocodrilo.....	115
5.3.2.2 Purificación mediante FPLC.....	116
5.3.2.2.1 Proteínas de cascarón de huevo de avestruz (SCA-1 y SCA-2).....	116
5.3.2.2.2 Proteínas de cascarón de huevo de emú (DCA-1 y DCA-2).....	117
5.3.2.2.3 Proteínas de cascarón de huevo de cocodrilo (CCA-1 y CCA-2).....	119

5.3.3 Estudio bioinformático preliminar de las proteínas intraminerales.....	120
5.3.3.1 Inferencia evolutiva de las proteínas estruthiocalcinas.....	120
5.3.3.1.1 Búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos.....	121
5.3.3.1.2 Uso de herramientas bioinformáticas para seleccionar y analizar posibles candidatos.....	121
5.3.3.2 Identificación de los regiones evolutivamente conservadas y construcción del árbol filogenético.....	122
5.4 Conclusiones.....	129
5.5 Anexos.....	130
Anexo 5.1: Agentes precipitantes utilizados en la prueba de cristalización.....	130
Anexo 5.2: Identificación de las regiones conservadas de las secuencias obtenidas mediante QuickBLAST.....	131
Capítulo 6. Conclusiones Generales y Perspectivas.....	136
6.1 Discusiones Generales.....	137
6.2 Perspectivas.....	138
6.3 Referencias Bibliográficas.....	139
6.3.1 Capítulo 1.....	140
6.3.2 Capítulo 2.....	142
6.3.3 Capítulo 3.....	144
6.3.4 Capítulo 4.....	146
6.3.5 Capítulo 5.....	148
Capítulo 7. Participación en Eventos y Artículos Publicados.....	150
7.1 Participación en Eventos.....	151
7.1.1 Cursos.....	151
7.1.2 Congresos/Simposios.....	151
7.2 Artículos Publicados.....	151

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Capítulo 1. Información General	
Figura 1-1. Ilustración de las partes que componen al cascarón.....	3
Figura 1-2. Recreación de un dinosaurio ornitópodo correspondiente a la familia Lambeosaurinae.....	6
Figura 1-3. Recreación de un dinosaurio terópodo correspondiente a la familia Troodontidae...	6
Figura 1-4. Estructura tridimensional de la ovocleidina-17 (OC-17) (A) obtenida a partir del cascarón de huevo de gallina y de la estruthiocalcina-1 (SCA-1) (B) obtenida a partir del cascarón de huevo de avestruz.....	8
Capítulo 2. Análisis Elemental de los Cascarones de Diferentes Especies	
Figura 2-1. Ilustración de los cascarones de huevos de forma radial. A. Testudinoide; B. Crocodiloide; C. Geckooide; D. Esferulíticos; E. Prismáticos; F. Ornitoides.....	13
Figura 2-2. A. Mapa general de la localidad del sitio de excavación. B. Localidad precisa donde se colectaron los cascarones de huevo. I. <i>Spheroolithus</i> muestra 1. II. Cascarones de la familia Lambeosaurinae. III. <i>Spheroolithus</i> muestra 2. IV. <i>Prismatoolithus</i> . V. Ootaxon no identificado.....	14
Figura 2-3. Imágenes de SEM de cascarones de huevo de dinosaurios. I. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; IV. <i>Prismatoolithus</i> ; V. Ootaxon no identificado; CT. Cutícula; MD. Mineral diagenético; PM. Palizada mineral; CM. Conos mamilares.....	19
Figura 2-4. Imágenes de SEM de cascarones de huevo de especies actuales en estudio. CT. Cutícula; LC. Lamina cristalina; PM. Palizada mineral; CM. Conos mamilares.....	21
Figura 2-5. Imágenes de SEM de la sección transversal de cinco cascarones de huevo de dinosaurios. A. Sección transversal; B. Estructuras observadas en la palizada mineral; C. Conos mamilares; D. Estructuras presentes en la cutícula; I. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; IV. <i>Prismatoolithus</i> ; V. Ootaxon no identificado. La superficie externa se encuentra en la parte inferior de las imágenes de la sección transversal.....	23
Figura 2-6. Imágenes de SEM de la sección transversal de cascarones de huevo de especies actuales. A. Sección transversal; B. Estructuras observadas en la palizada mineral; C. Conos mamilares; D. Estructuras presentes en la cutícula; AV. Avestruz; EM. Emú; CO. Cocodrilo. La superficie externa se encuentra en la parte superior de las imágenes de la sección transversal.....	24
Figura 2-7. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón <i>Spheroolithus</i> muestra 1. A. Superficie externa; B. Superficie interna.	26
Figura 2-8. Composición elemental en porcentaje de peso molecular de los cinco cascarones de huevo de dinosaurio. A. Superficie externa; B. Superficie interna; Naranja: <i>Spheroolithus</i> muestra 1; Verde: Familia Lambeosaurinae; Amarillo: <i>Spheroolithus</i> muestra 2; Morado:	

<i>Prismatoolithus</i> ; Azul : Ootaxon no identificado. El recuadro muestra una ampliación del área donde el porcentaje de los elementos presentes es muy bajo.....	26
Figura 2-9. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en los cascarones pulverizados de avestruz (A), emú (B), y cocodrilo (C) y del porcentaje en masa de los elementos identificados (D). Naranja : Avestruz; Verde : Emú; Morado : Cocodrilo.....	27
Figura 2-10. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón <i>Spheroolithus</i> muestra 1. A . Superficie externa; B . Superficie interna.	29
Figura 2-11. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X del cascarón <i>Spheroolithus</i> muestra 1 de la superficie externa e interna. Los estados electrónicos de algunos elementos presentes en el cascarón corresponden con los observados por EDS y XRF.....	32
Figura 2-12. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie externa del cascarón de huevo <i>Spheroolithus</i> muestra 1. E.E : Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	34
ANEXO 2.1: Análisis elemental de los cascarones de huevo de dinosaurio por EDS	
Figura 2-13. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	36
Figura 2-14. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	36
Figura 2-15. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	36
Figura 2-16. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del ootaxon no identificado. A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	37
ANEXO 2.2: Análisis del mapeo realizado por EDS en cascarones de huevo de dinosaurio	
Figura 2-17. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	38
Figura 2-18. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	39
Figura 2-19. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . A . Superficie externa; B . Superficie interna.....	40

Figura 2-20. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	41
ANEXO 2.3: Estados electrónicos de los elementos por XPS	
Figura 2-21. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie interna del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1. E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	42
Figura 2-22. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> de la superficie externa e interna. Los estados electrónicos de algunos elementos presentes en el cascarón corresponden con los observados por EDS y XRF.....	43
Figura 2-23. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie externa del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	44
Figura 2-24. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie interna del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	45
Capítulo 3. Composición Molecular de Cascarones de Huevo de Aves, Reptiles y Dinosaurios	
Figura 3-1. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de avestruz en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	52
Figura 3-2. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	55
Figura 3-3. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1. A-C. Superficie externa; D-F. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca.....	57
Figura 3-4. Espectros Raman del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 en las tres zonas correspondientes. A. Superficie externa; B. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca; θ. Calcita; ω. Albita; ϵ. Cuarzo; ρ. Anhidrita.....	58

Figura 3-5. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . A-C. Superficie externa; D-F. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca.....	58
Figura 3-6. Espectros Raman del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> en las tres zonas correspondientes. A. Superficie externa; B. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca; θ. Calcita; ω. Albita; ε. Cuarzo; ρ. Anhidrita; ψ. SiO ₂	59
Figura 3-7. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	61
Figura 3-8. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	62
Figura 3-9. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de avestruz. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	63
Figura 3-10. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de emú. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	63
Figura 3-11. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de cocodrilo. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	64
Figura 3-12. Espectros de FT-IR de los cascarones de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 (A, B) y <i>Prismatoolithus</i> (C, D) de ambas superficies. A, B. Superficie externa; B, D. Superficie interna. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	67
ANEXO 1: Determinación de la fotoluminiscencia de los cascarones de huevo por FS	
Figura 3-13. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de emú en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	70
Figura 3-14. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de cocodrilo en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	71
Figura 3-15. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	72
Figura 3-16. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2 en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	73
Figura 3-17. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del ootaxon <i>Prismatoolithus</i> en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía	

de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos	76
Figura 3-18. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del ootaxon no identificado en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos	77
ANEXO 3.2: Análisis Molecular por Espectroscopia Raman	
Figura 3-19. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. A-C. Superficie externa; D-F. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca.....	78
Figura 3-20. Espectros Raman del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae en las tres zonas correspondientes. A. Superficie externa; B. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca; θ. Calcita; ω. Albita; ε. Cuarzo; ρ. Anhidrita; ψ. SiO ₂ ; τ. Hematita; π. Hidroxiapatita.....	78
Figura 3-21. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. A-C. Superficie externa; D-F. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca.....	79
Figura 3-22. Espectros Raman del cascarón de huevo <i>Spheroolithus</i> muestra 2 en las tres zonas correspondientes. A. Superficie externa; B. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca; θ. Calcita; ω. Albita; ε. Cuarzo; ψ. SiO ₂	79
Figura 3-23. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. A-C. Superficie externa; D-F. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca.....	80
Figura 3-24. Espectros Raman del cascarón de huevo del ootaxon no identificado en las tres zonas correspondientes. A. Superficie externa; B. Superficie interna; Bz. Zona negra; Rz. Zona roja; Wz. Zona blanca; θ. Calcita; ω. Albita; ε. Cuarzo; ρ. Anhidrita.....	80
ANEXO 3.3: Caracterización de cristalitas por XRD	
Figura 3-25. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	81
Figura 3-26. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	82
Figura 3-27. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del ootaxon no identificado. A. Superficie externa; B. Superficie interna.....	82
ANEXO 3.4: Moléculas orgánicas caracterizadas por FT-IR	
Figura 3-28. Espectros de FT-IR de los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae (A, B), <i>Spheroolithus</i> muestra 2 (C, D) y ootaxon no identificado (E, F) de ambas superficies. A, C, E. Superficie externa; B, D, F. Superficie interna. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos.....	84

Capítulo 4. Determinación de la Rugosidad y Área Superficial de los Cascarones de Huevo de Especies Ancestrales y Actuales

Figura 4-1. Representación de la superficie del cascarón de huevo con comportamiento fractal (Koch curve). El recuadro muestra el zoom sobre las superficies de cascarón de huevo donde se observa la auto-afinidad.....	88
Figura 4-2. Imágenes de SEM usadas para el análisis por conteo de cajas. A. Imágenes de SEM a 1000x; B. Imágenes binarias; I. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; IV. <i>Prismatoolithus</i> ; V. Ootaxon no identificado.....	90
Figura 4-3. Dimensión fractal 2D a partir de imágenes de SEM de los cascarones de huevo de dinosaurio. Sph S1. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; Lmb. Lambeosaurinae; Sph S2. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; Prsm. <i>Prismatoolithus</i> ; NI. Ootaxon no identificado. Los valores de la dimensión fractal (D) se encuentran entre 1.69 y 1.87, respectivamente.....	91
Figura 4-4. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1.....	91
Figura 4-5. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1.....	92
Figura 4-6. Dimensión fractal 3D a partir de imágenes de AFM de los cascarones de huevo de dinosaurio. Sph S1. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; Lmb. Lambeosaurinae; Sph S2. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; Prsm. <i>Prismatoolithus</i> ; NI. Ootaxon no identificado. Los valores de la dimensión fractal (D) se encuentran entre 2.25 y 2.5, respectivamente.....	93
Figura 4-7. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1. SE. Superficie externa; SI. Superficie interna; 1. Imagen de AFM; 2. Perfiles de las estructuras superficiales; A. Perfil correspondiente al eje X; B. Perfil correspondiente al eje Y.....	94
Figura 4-8. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . SE. Superficie externa; SI. Superficie interna; 1. Imagen de AFM; 2. Perfiles de las estructuras superficiales; A. Perfil correspondiente al eje X; B. Perfil correspondiente al eje Y.....	95
Figura 4-9. Área superficial basada de imágenes AFM de los cascarones de huevo de dinosaurio. Sph S1. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; Lmb. Lambeosaurinae; Sph S2. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; Prsm. <i>Prismatoolithus</i> ; NI. Ootaxon no identificado.....	96
Figura 4-10. Correlación entre la dimensión fractal y el área superficial de los cascarones de huevo de dinosaurio. E. Superficie externa; I. Superficie interna; Sph S1. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; Lmb. Lambeosaurinae; Sph S2. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; Prsm. <i>Prismatoolithus</i> ; NI. Ootaxon no identificado.....	96
Figura 4-11. Distribución de los poros usando ImageJ de los cascarones de huevo dinosaurio en estudio. E. Superficie externa; I. Superficie interna; 1. <i>Spheroolithus</i> muestra 1 (negro); 2. Lambeosaurinae (rojo); 3. <i>Spheroolithus</i> muestra 2 (azul); 4. <i>Prismatoolithus</i> (verde); 5. Ootaxon no identificado (purpura).....	97

Figura 4-12. Morfología de los poros de los cascarones de huevo de dinosaurio bajo estudio y de las especies filogenéticamente relacionados. A. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; B. Lambeosaurinae; C. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; D. <i>Prismatoolithus</i> ; E. Ootaxon no identificado; F. Avestruz; G. Emú; H. Cocodrilo.....	98
Figura 4-13. Diseño de los poros presentes en cascarones de huevo de dinosaurio. A. Angusticanaliculato; B. Tubocanaliculato; C. Multicanaliculato; D. Prolatocanaliculato; E. Rimocanaliculato; F. Obliquicanaliculato.....	100
ANEXO 4.1: Determinación de la rugosidad y el tamaño del poro mediante SEM y AFM	
Figura 4-14. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. A. Perfil A; B. Perfil B.....	101
Figura 4-15. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo Lambeosaurinae. A. Perfil A; B. Perfil B...	102
Figura 4-16. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. A. Perfil A; B. Perfil B.....	102
Figura 4-17. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. A. Perfil A; B. Perfil B.....	102
Figura 4-18. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . A. Perfil A; B. Perfil B.....	103
Figura 4-19. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . A. Perfil A; B. Perfil B.....	103
Figura 4-20. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. A. Perfil A; B. Perfil B.....	103
Figura 4-21. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. A. Perfil A; B. Perfil B.....	104
Figura 4-22. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. SE. Superficie externa; SI. Superficie interna; 1. Imagen de AFM; 2. Perfiles de las estructuras superficiales; A. Perfil correspondiente al eje X; B. Perfil correspondiente al eje Y.....	104
Figura 4-23. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. SE. Superficie externa; SI. Superficie interna; 1. Imagen de AFM; 2. Perfiles de las estructuras superficiales; A. Perfil correspondiente al eje X; B. Perfil correspondiente al eje Y.....	105

Figura 24. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. SE. Superficie externa; SI. Superficie interna; 1. Imagen de AFM; 2. Perfiles de las estructuras superficiales; A. Perfil correspondiente al eje X; B. Perfil correspondiente al eje Y.....	106
Capítulo 5. Relación de los Cascarones de Aves y Reptiles con Otras Especies	
Figura 5-1. Ejemplo de un árbol filogenético. Se puede observar los puntos de ramificación (puntos cafés) obtenidos por duplicación génica o especiación, y el ancestro común de las secuencias (punto morado).....	109
Figura 5-2. A. Cromatograma correspondiente al cascarón de huevo de cocodrilo. B. Gel de SDS-PAGE al 12% de la purificación de las CCA-1 (fracción 2) y CCA-2 (fracción 3) usando fase reversa. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa.....	114
Figura 5-3. Espectros de masa de las proteínas CCA-1 (A) y CCA-2 (B). I.M. Ion molecular.....	115
Figura 5-4. DLS de las proteínas crococalcina-1 (CCA-1, A) y crococalcina-2 (CCA-2, B). d. Diámetro hidrodinámico.....	115
Figura 5-5. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 12% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de avestruz mediante el método filtración en gel utilizando citratos 50 mM pH 3.6 como fase móvil y una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La línea verde indica las fracciones que se tomaron para el gel, las cuales se encuentran tabuladas con su respectivo volumen. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa.....	116
Figura 5-6. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 12% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de avestruz mediante el método filtración en gel utilizando citratos 50 mM pH 3.6 como fase móvil y una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa.....	117
Figura 5-7. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 15% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de emú mediante el método intercambio catiónico utilizando como fase móvil citratos 50 mM pH 3.6 como buffer A y citratos 50 mM pH 3.6 + 1.0 M NaOH como buffer B, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa.....	118
Figura 5-8. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 12% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de emú mediante el método filtración en gel utilizando acetato de amonio 100 mM pH 5.0 + 1.0 M guanidina como fase móvil y una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa.....	118
Figura 5-9. Cromatogramas (A, B, C) y gel SDS-PAGE al 15% (D) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de cocodrilo mediante el método filtración en gel utilizando fosfatos 10 mM pH 7.55 (A), bicarbonatos 50 mM pH 7.8 (B) y tris-HCl 50 mM	

pH 8.0 (C) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa..... 120

Figura 5-10. Gráfico de correlación del PI vs PM de las proteínas obtenidas del QuickBLAST tomando como referencia la SCA-1 y SCA-2..... 122

Figura 5-11. Alineamiento pareado de las 40 secuencias e identificación de bloques asociados con el porcentaje de identidad. El bloque superior corresponde a especies de aves relacionadas con la SCA-2. El bloque del centro corresponde a especies del orden Testudines. El bloque inferior corresponde a especies relacionadas con la SCA-1. **P83515.1.** *Struthio camelus* (SCA-2); **XP_025926949.1.** *Apteryx rowi*; **XP_013801306.1.** *Apteryx mantelli*; **P84618.2.** *Rhea americana* (RCA-2); **P84616.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-2); **XP_025977246.1.** *Dromaius novaehollandiae*; **XP_035425211.1.** *Cygnus atratus*; **XP_032037982.1.** *Aythya fuligula*; **XP_038024161.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_035169392.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_040394638.1.** *Cygnus olor*; **XP_005443542.1.** *Falco cherrug*; **XP_037244175.1.** *Falco rusticolus*; **XP_010564359.1.** *Haliaeetus leucocephalus*; **XP_029872161.1.** *Aquila chrysaetos chrysaetos*; **XP_014817435.1.** *Calidris pugnax*; **XP_026512179.1.** *Terrapene carolina triunguis*; **XP_023966471.1.** *Chrysemys picta bellii*; **XP_039376632.1.** *Mauremys reevesii*; **XP_039376633.1.** *Mauremys reevesii*; **XP_037745434.1.** *Chelonia mydas*; **XP_034619350.1.** *Trachemys scripta elegans*; **XP_042716842.1.** *Chrysemys picta bellii*; **P83514.1** *Struthio camelus* (SCA-1); **P84617.2.** *Rhea americana* (RCA-1); **P84615.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-1); **XP_032041511.1.** *Aythya fuligula*; **XP_038021737.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_040400689.1.** *Cygnus olor*; **XP_035425210.1.** *Cygnus atratus*; **XP_035169393.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_029871070.1.** *Aquila chrysaetos chrysaetos*; **XP_033918754.1.** *Melopsittacus undulatus*; **XP_030327925.1.** *Strigops habroptila*; **XP_041261516.1.** *Onychostruthus taczanowskii*; **XP_014746250.1.** *Sturnus vulgaris*; **XP_030816725.1.** *Camarhynchus parvulus*; **XP_019334710.1.** *Alligator mississippiensis*; **XP_038144619.1.** *Cyprinodon tularosa*; **XP_041484247.1.** *Lytechinus variegatus*. Los códigos se encuentran en orden de superior/izquierda a inferior/derecha..... 123

Figura 5-12. Árbol filogenético de las 40 secuencias de proteínas organizadas por el orden de la especie a la que corresponden. Secuencias externas: **Rojo.** Cocodrilía: **XP_019334710.1.** *Alligator mississippiensis*. **Amarillo oscuro.** Temnopleuroida: **XP_041484247.1.** *Lytechinus variegatus*. **Verde grisaseo.** Cyprinodontiformes: **XP_038144619.1.** *Cyprinodon Tularosa*. Secuencias relacionadas a la SCA-2: **Morado.** Struthioniformes: **P83515.1.** *Struthio camelus* (SCA-2); **XP_025977246.1.** *Dromaius novaehollandiae*; **P84616.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-2); **P84618.2.** *Rhea americana* (RCA-2). **Naranja.** Apterygiformes: **XP_013801306.1.** *Apteryx mantelli*; **XP_025926949.1.** *Apteryx rowi*. **Verde.** Anseriformes: **XP_040394638.1.** *Cygnus olor*; **XP_035425211.1.** *Cygnus atratus*; **XP_035169392.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_038024161.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_032037982.1.** *Aythya fuligula*. **Azul.** Charadriiformes: **XP_014817435.1.** *Calidris pugnax*. **Rosado oscuro.** Falconiformes: **XP_037244175.1.** *Falco rusticolus*; **XP_005443542.1.** *Falco cherrug*. **Rosado claro.**

Accipitriformes: XP_010564359.1. <i>Haliaeetus leucocephalus</i> ; XP_029872161.1. <i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i> . Amarillo claro. Testudine: XP_042716842.1. <i>Chrysemys picta bellii</i> ; XP_034619350.1. <i>Trachemys scripta elegans</i> ; XP_039376633.1. <i>Mauremys reevesii</i> ; XP_039376632.1. <i>Mauremys reevesii</i> ; XP_037745434.1. <i>Chelonia mydas</i> ; XP_023966471.1. <i>Chrysemys picta bellii</i> ; XP_026512179.1. <i>Terrapene carolina triunguis</i> . Secuencias relacionadas a la SCA-1: Rosado claro. Accipitriformes: XP_029871070.1. <i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i> . Gris. Psittaciformes: XP_030327925.1. <i>Strigops habroptila</i> ; XP_033918754.1. <i>Melopsittacus undulatus</i> . Morado claro. Passeriformes: XP_030816725.1. <i>Camarhynchus parvulus</i> ; XP_014746250.1. <i>Sturnus vulgaris</i> ; XP_041261516.1. <i>Onychostruthus taczanowskii</i> . Morado oscuro. Struthioniformes: P84615.2. <i>Dromaius novaehollandiae</i> (DCA-1); P84617.2. <i>Rhea americana</i> (RCA-1); P83514.1 <i>Struthio camelus</i> (SCA-1). Verde. Anseriformes: XP_038021737.1. <i>Anas platyrhynchos</i> ; XP_032041511.1. <i>Aythya fuligula</i> ; XP_035169393.1. <i>Oxyura jamaicensis</i> ; XP_040400689.1. <i>Cygnus olor</i> ; XP_035425210.1. <i>Cygnus atratus</i> . Los bootstrap se muestran para una de las ramas.....	125
Figura 5-13. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1. SCA-1) y del orden Cocodrilina (XP_019334710.1. <i>Alligator mississippiensis</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....	126
Figura 5-14. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2), del orden Temnopleuroidea (A) (XP_041484247.1. <i>Lytechinus variegatus</i>) y del orden Cyprinodontiformes (B) (XP_038144619.1. <i>Cyprinodon Tularosa</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....	127
Figura 5-15. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1. SCA-1; P84615.2. DCA-1; P84617.2. RCA-1). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....	128
Figura 5-16. Alineamiento de las secuencias primarias entre las especies del orden Struthioniformes (P83514.1. SCA-1) y del orden Anseriformes (XP_038021737.1. <i>Anas platyrhynchos</i> ; XP_032041511.1. <i>Aythya fuligula</i> ; XP_035169393.1. <i>Oxyura jamaicensis</i> ; XP_040400689.1. <i>Cygnus olor</i> ; XP_035425210.1. <i>Cygnus atratus</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....	128
ANEXO 5.1: Agentes precipitantes utilizados en la prueba de cristalización	
Figura 5-17. Agentes precipitantes utilizados en las pruebas de cristalización de las proteínas obtenidas del cascarón de huevo de cocodrilo.....	130
ANEXO 5.2: Identificación de las regiones conservadas de las secuencias obtenidas mediante QuickBLAST	
Figura 5-18. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes: XP_025977246.1. <i>Dromaius novaehollandiae</i> ; P84616.2. <i>Dromaius</i>	

<p>novaehollandiae (DCA-2); P83515.1. SCA-2; P84618.2. (RCA-2). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p> <p>Figura 5-19. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Apterygiformes (XP_013801306.1. <i>Apteryx mantelli</i>; XP_025926949.1. <i>Apteryx rowi</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>131</p> <p>131</p>
<p>Figura 5-20. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Anseriformes (XP_040394638.1. <i>Cygnus olor</i>; XP_035425211.1. <i>Cygnus atratus</i>; XP_035169392.1. <i>Oxyura jamaicensis</i>; XP_038024161.1. <i>Anas platyrhynchos</i>; XP_032037982.1. <i>Aythya fuligula</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>132</p>
<p>Figura 5-21. Alineamiento de las secuencias primarias del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Charadriiformes (XP_014817435.1. <i>Calidris pugnax</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>133</p>
<p>Figura 5-22. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Falconiformes (XP_037244175.1. <i>Falco rusticolus</i>; XP_005443542.1. <i>Falco cherrug</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>133</p>
<p>Figura 5-23. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Accipitriformes (XP_010564359.1. <i>Haliaeetus leucocephalus</i>; XP_029872161.1. <i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>134</p>
<p>Figura 5-24. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Testudines (XP_037745434.1. <i>Chelonia mydas</i>; XP_042716842.1. <i>Chrysemys picta bellii</i>; XP_034619350.1. <i>Trachemys scripta elegans</i>; XP_039376633.1. <i>Mauremys reevesii</i>; XP_039376632.1. <i>Mauremys reevesii</i>; XP_023966471.1. <i>Chrysemys picta bellii</i>; XP_026512179.1. <i>Terrapene carolina triunguis</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>134</p>
<p>Figura 5-25. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1. SCA-1) y del orden Accipitriformes (XP_029871070.1. <i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>135</p>
<p>Figura 5-26. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1. SCA-1) y del orden Psittaciformes (XP_030327925.1. <i>Strigops habroptila</i>; XP_033918754.1. <i>Melopsittacus undulatus</i>). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio.....</p>	<p>135</p>
<p>Figura 5-27. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1. SCA-1) y del orden Passeriformes (XP_030816725.1. <i>Camarhynchus parvulus</i>; XP_014746250.1. <i>Sturnus vulgaris</i>; XP_041261516.1.</p>	

Onychostruthus taczanowskii). **Verde:** Cisteínas conservadas; **Amarillo:** Aminoácidos conservados; **Morado:** Dominio.....

135

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Capítulo 2. Análisis Elemental y Morfológico de los Cascarones de Diferentes Especies	
Tabla 2-1. Cascarones de huevo de cinco ooespecies de dinosaurio. I. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; IV. <i>Prismatoolithus</i> ; V. Ootaxon no identificado.....	17
Tabla 2-2. Fotografías correspondientes a cascarones de huevo de especies actuales. El grosor se determinó con las imágenes de SEM de la sección transversal.....	17
Tabla 2-3. Posibles estándares obtenidos por EDS de acuerdo con la composición elemental presente en los cinco cascarones de dinosaurio.....	27
Tabla 2- 4. Concentración de masa (mg kg ⁻¹) de los elementos reportados en los cascarones de huevo de dinosaurio. ^a A. Superficie externa; B. Superficie interna; I. <i>Spheroolithus</i> muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. <i>Spheroolithus</i> muestra 2; IV. <i>Prismatoolithus</i> ; V. Ootaxon no identificado.....	29
Tabla 2-5. Energías de enlace de los estados electrónicos de los elementos presentes en el cascaron de huevo de <i>Spheroolithus</i> muestra 1 obtenido por XPS.....	31
ANEXO 2.3: Estados electrónicos de los elementos por XPS	
Tabla 2-6. Energías de enlace de los estados electrónicos de los elementos presentes en el cascaron de huevo del <i>Prismatoolithus</i> obtenido por XPS.....	43
Tabla 2-7. Compuestos determinados por la desconvolución de los estados electrónicos de los cascarones de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 y <i>Prismatoolithus</i> . E.E: Energía de enlace; SE: Superficie externa; SI: Superficie interna; M⁺: Metálico.....	46
Capítulo 3. Composición Molecular de Cascarones de Huevo de Aves, Reptiles y Dinosaurios	
Tabla 3-1. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de avestruz a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. Δ. FWHM.....	52
Tabla 3-2. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. A. Albita; C. Calcita; Q. Cuarzo; S. SiO ₂ ; Δ. FWHM; M. Estándar; CS. Calcio de las especies actuales.....	54
Tabla 3-3. Desplazamiento Raman observado en el cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1. θ. Calcita; ω. Albita; ε. Cuarzo; ρ. Anhidrita. ^a	57
Tabla 3-4. Desplazamiento Raman observado en el cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> . θ. Calcita; ω. Albita; ε. Cuarzo; ρ. Anhidrita; ψ. SiO ₂ . ^a	58

Tabla 3-5. Tamaño y concentración de cristalita presente en los cascarones de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 y <i>Prismatoolithus</i>	60
Tabla 3-6. Datos cristalográficos teóricos y experimentales de la calcita.....	61
Tabla 3-7. Tamaño y concentración de cristalita presente en los cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo.....	63
Tabla 3-8. Desconvolución del espectro de FT-IR y asignación de las vibraciones correspondientes a los aminoácidos de la cadena lateral (AA) así como de la estructura secundaria (ES) de las proteínas intraminerales presentes en la superficie externa (e) e interna (i) de los cascarones de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 1 y <i>Prismatoolithus</i> . ν_0 : Número de onda; st : estiramiento; bd : flexión; s : simétrico; as : asimétrico.....	66
ANEXO 3.1: Determinación de la fotoluminiscencia de los cascarones de huevo por FS	
Tabla 3-9. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de emú a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. Δ . FWHM.....	70
Tabla 3-10. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de cocodrilo a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. Δ . FWHM.....	71
Tabla 3-11. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. A. Albita; C. Calcita; Q. Cuarzo; S. SiO ₂ ; Δ . FWHM; M. Estándar; CS. Calcio de las especies actuales.....	72
Tabla 3-12. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2 a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. A. Albita; C. Calcita; Q. Cuarzo; S. SiO ₂ ; Δ . FWHM; M. Estándar; CS. Calcio de las especies actuales.....	73
Tabla 3-13. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del <i>Prismatoolithus</i> a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. A. Albita; C. Calcita; Q. Cuarzo; S. SiO ₂ ; Δ . FWHM; M. Estándar; CS. Calcio de las especies actuales.....	75
Tabla 3-14. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del ootaxón no identificado a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. A. Albita; C. Calcita; Q. Cuarzo; S. SiO ₂ ; Δ . FWHM; M. Estándar; CS. Calcio de las especies actuales.....	76
ANEXO 3.2: Análisis Molecular por Espectroscopia Raman	
Tabla 3-15. Desplazamiento Raman observado en el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ρ . Anhidrita; ψ . SiO ₂ ; τ . Hematita; π . Hidroxiapatita. ^a	78

Tabla 3-16. Desplazamientos Raman observados en el cascarón de huevo del <i>Spheroolithus</i> muestra 2. θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ψ . SiO ₂ . ^a	79
Tabla 3-17. Desplazamientos Raman observados en el cascarón de huevo del ootaxón no identificado. θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ρ . Anhidrita; ψ . SiO ₂ . ^a	80
ANEXO 3.3: Caracterización de cristalitas por XRD	
Tabla 3-18. Tamaño de cristalita y el porcentaje de cada uno de los minerales presentes en los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae, <i>Spheroolithus</i> muestra 2, y del ootaxón no identificado. ^a	81
ANEXO 3.4: Moléculas orgánicas caracterizadas por FT-IR	
Tabla 3-19. Desconvolución del espectro de FTIR y asignación de las vibraciones correspondientes a los aminoácidos de la cadena lateral (AA) así como de la estructura secundaria (ES) de las proteínas intraminerales presentes en la superficie externa (e) e interna (i) de los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae, <i>Spheroolithus</i> muestra 2 y ootaxon no identificado. ν_0 : Número de onda; st : estiramiento; bd : flexión; s : simétrico; as : asimétrico.....	83
Capítulo 4. Determinación de la Rugosidad y Área Superficial de los Cascarones de Huevo de Especies Ancestrales y Actuales	
Tabla 4-1. Área superficial y rugosidad media de los cascarones de huevo de dinosaurio, basado en imágenes de AFM.....	95
Tabla 4-2. Distribución de los poros presentes en cascarones de huevo de dinosaurio.....	98
ANEXO 4.1: Determinación de la rugosidad y el tamaño del poro mediante SEM y AFM	
Tabla 4-3. Dimensión fractal de las superficies de los cascarones de huevo dinosaurio usando imágenes binarias de SEM e imágenes de AFM.....	101
Capítulo 5. Relación de los Cascarones de Aves y Reptiles con Otras Especies	
Tabla 5-1. Fracciones colectadas de las inyecciones realizadas con Citratos 50 mM pH 3.6 con un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones se colectaron cada 1 mL. Fxn : Fracción; Vol : Volumen inicial de la fracción.....	116

LISTA DE ECUACIONES

	Pág.
Capítulo 3. Composición Molecular de Cascarones de Huevo de Aves, Reptiles y Dinosaurios	
Ecuación 3-1. Ecuación de Scherrer.....	60
Ecuación 3-2. Formula de Warren.....	60
Capítulo 4. Determinación de la Rugosidad y Área Superficial de los Cascarones de Huevo de Especies Ancestrales y Actuales	
Ecuación 4-1. Ecuación para la determinación de la dimensión fractal.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°	Grados
'	Minutos
''	Segundos
α	Alfa
β	Beta
ϵ	Épsilon
θ	Theta
λ	Lambda
π	Pi
ρ	Rho
τ	Tau
υ	Ípsilon
ω	Omega
2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
Å	Angstrom
°C	Grados centígrados
cm	Centímetro
eV	Electronvoltios
g	Gramo
hr	Hora
keV	Kilo electronvoltios
kg	Kilogramo
km	Kilometro
m	Metro
Ma	Millones de años
μ A	Microamperio
μ m	micrómetros
mm	milímetros
N	Norte
nm	nanómetros
O	Oeste
Rh	Rodio
V	Voltios
W	Vatios

Capítulo 1.

Información General

Elejalde-Cadena, N. R.; Cuéllar-Cruz, M.; Moreno, A. The role of silica and alkaline earth metals with biomolecules in the biomineralization processes: the eggshell's formation and the crystallization *in vivo* for x-ray crystallography. *Prog. Cryst. Growth. Charact. Mater.* **2020**, *66*, 100473.

1.1 INTRODUCCIÓN

La biomineralización es el proceso mediante el cual los organismos vivos son capaces de producir sólidos inorgánicos. Estos procesos frecuentemente son controlados por macromoléculas biológicas asociadas a la fase mineral.¹ Existen dos procesos de biomineralización: (1) la biomineralización mediada por matriz orgánica, conocida por ser un proceso altamente regulado por macromoléculas biológicas como proteínas, polisacáridos y lípidos,^{2,3} presentes en la formación de huesos, dientes, conchas de molusco y cascarón de huevo;⁴ (2) la biomineralización inducida biológicamente, donde los depósitos de mineralización en condiciones anormales y patológicas afecta vasos sanguíneos, músculos, matriz extracelular de los tejidos cartilagosos articulares y algunos órganos internos, lo que conduce a la morbilidad y/o mortalidad.⁵ Debido a que este proceso está biológicamente inducido; el tamaño, forma, estructura y organización de las estructuras se lleva a cabo de manera indefinida y heterogéneamente, como se observa en los cálculos renales y/o biliares.¹

En los organismos vivos, la biomineralización tiene importantes funciones biológicas como son: fuerza mecánica, soporte estructural, protección de tejidos blandos y protección contra depredadores.⁶ Esto se observa en animales marinos como moluscos y crustáceos; y en animales terrestres como aves y reptiles, que llevan a cabo la oviposición.^{1,7}

El huevo (producto de la oviposición) es una estructura ovalada de tamaño y dureza variable que, basado en su estructura, cumple la función de proteger al embrión contra agentes del medio exterior. También regula el intercambio de vapor de agua, de gases y equilibrio térmico necesarios para mantener un medio homeostático estable, lo que conlleva un buen desarrollo del embrión.^{8,9}

1.1.1 Formación del Cascarón

El huevo está compuesto por dos fases: una fase orgánica interna, constituida por azúcares, lípidos, y proteínas; y una fase inorgánica externa compuesta principalmente por carbonato de calcio que corresponde a la parte mineral del cascarón.¹⁰ El cascarón de huevo de las aves contiene 95% de carbonato de calcio en forma de calcita y 5% de una matriz orgánica.¹ Mientras que en algunos reptiles, el cascarón posee 43% de carbonato de calcio y 57% de matriz orgánica.³ La membrana, una de las partes que conforman el cascarón (Figura 1-1) y que se encuentra ubicada en la parte interna del mismo, es una superficie fibrosa compuesta por proteínas, lípidos y carbohidratos, responsables del proceso de mineralización.¹¹ Esto da paso a la formación de cristales de carbonato de calcio que crecen formando una capa de columnas en forma de conos. A partir de estas estructuras, se comienzan a formar los poros por donde respira el embrión.¹²

Una vez formados los conos mamilares, la palizada mineral empieza a tener forma de columna con cristales que crecen con una orientación preferencial [001] y [104], paralelas a la superficie,¹³⁻¹⁵ permitiendo la completa formación de los poros que controlan la dosificación de agua, gases e intercambio iónico, así como, la función de ser un reservorio de calcio que sirve para la formación del esqueleto del embrión,¹⁶ y finalmente, la cutícula que se encuentra en la superficie exterior presenta poros con orificios de un diámetro mayor al interno. La cutícula se deposita sobre toda la superficie del huevo para resguardarlo de cualquier contaminación microbiana después de la oviposición.¹⁷ Además, presenta pigmentos que le dan coloración a los cascarones como la protoporfirina, biliverdina y quelato de zinc de biliverdina. Estos pigmentos son secretados en el oviducto, produciendo la tinción del cascarón al momento de la oviposición.^{18,19}

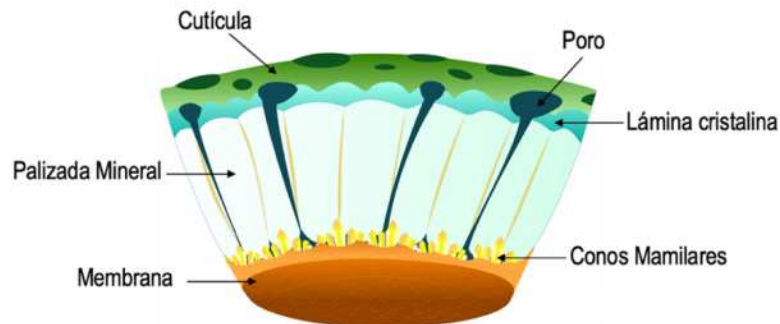


Figura 1-1. Ilustración de las partes que componen al cascarón

1.1.2 Especies en estudio

De las especies en estudio, el avestruz y el emú son aves corredoras (rátidas) del superorden Palaeognathae. Otra especie en estudio es el cocodrilo americano, considerada como uno de los cocodrilos más grandes de este grupo. Y finalmente, cinco muestras de cascarones de huevo de dinosaurio, extintos hace 65 millones de años y distribuidos por familias de acuerdo con la forma de sus huesos.

1.1.2.1 Avestruz

Nombre científico: *Struthio camelus*²⁰

Puesta: Nido comunal, hembra dominante pone de 5 a 11 huevos, las demás de 2 a 6 huevos cada una

Incubación: 42 a 48 días. La hembra se encarga de incubarlos durante el día, mientras que el macho lo realiza durante la noche

Distribución geográfica: África

Es un ave de cuello largo, con patas largas y alas atrofiadas, que están capacitadas para correr alcanzando una velocidad de más de 70 km/h. Pueden alcanzar una altura de 3 m y un peso de aproximadamente 180 kg. El macho está provisto de plumas suaves de color negro, mientras que la hembra es parduzca con alas y cola de color blanco grisáceo al igual que las crías. En la época de celo, el macho se reproduce con hasta cinco hembras. El nido consiste en un surco en el suelo con aproximadamente 3 m de diámetro. Los huevos del avestruz son los más grandes entre las aves. Presentan una morfología lisa y brillante de color blanco. Miden entre 14 y 16 cm de altura, y entre 11 y 13 cm de ancho, llegando a pesar 1.5 kg.

1.1.2.2 Emú

Nombre científico: *Dromaius novaehollandie*²¹

Puesta: 5 a 20 huevos

Incubación: 52 a 63 días. El macho es el encargado de la incubación

Distribución geográfica: Australia y Tasmania

Es la segunda ave más grande del mundo que, como los avestruces, corren alcanzando una velocidad de 50 km/hr. El macho y la hembra presentan coloración de tonos grisáceos con negro. Miden 1.75 m de alto y pesan aproximadamente 50 kg. Durante la época de celo, la hembra construye el nido en el suelo con hojas y hierbas. Los huevos son de un color verde oscuro que miden 13 cm de altura y pesan 500 g.

1.1.2.3 Cocodrilo americano

Nombre científico: *Crocodylus acutus*²²

Puesta: 30 a 70 huevos

Incubación: 80 a 92 días. Los huevos no son incubados, sino cubiertos con ramas y tierra, mientras que la madre siempre esta vigilando el nido a 2 m de distancia

Distribución geográfica: Centroamérica y Sudamérica

Es uno de los cocodrilos más grandes. Alcanza longitudes de hasta 7 m y llegan a pesar hasta media tonelada. En tierra, por su peso, suelen ser un poco lentos; pero en el agua alcanzan una velocidad de 32 km/h. Son de color verde oliva y el vientre es de color grisáceo a blanco. La hembra es la que se encarga de construir el nido cerca de cuencas de agua, escarbando en tierra o en una acumulación de material vegetal.

Los cocodrilos presentan la característica de incubar solo hembras o solo machos. Cuando la temperatura se encuentra por debajo de los 31°C todas las crías son hembras y suelen presentar tiempo de incubación cortos, pero si la temperatura es de 32°C o superior (no más de 35°C, ya que estas temperaturas son letales para las crías) son machos, y el tiempo de incubación es más largo. Sus huevos son de color blanco y alcanzan a medir entre 6 a 7 cm de altura, de 4 a 5 cm de grosor con un peso de 9 a 10 g.²³

1.1.2.4 Dinosaurios

De las especies de dinosaurios en estudio se encuentran los ornitópodos, dinosaurios herbívoros que vivieron entre el Jurásico inferior y el Cretácico superior (210-65 Ma). Entre estos se encuentran las familias Hadrosauridae (86-65 Ma) y Lambeosaurinae (76-65 Ma).²⁴ Por otro lado, están los terópodos, dinosaurios carnívoros que vivieron entre el Triásico superior y el Cretácico superior (231-65 Ma), siendo la de nuestro interés la familia Troodontidae (150-65 Ma),²⁵ por ser la especie más emblemática en México.

1.1.2.4.1 Familia Hadrosauridae

Los hadrosáuridos eran dinosaurios cuadrúpedos herbívoros de variados tamaños (pequeños desde 5 a 6 m de longitud y grandes alcanzando los 12 m) y pesos aproximados a los 7000 kg. Estos dinosaurios son denominados dinosaurios pico de pato por la similitud de su boca con las aves anátidas. Hoy en día, sus fósiles se encuentran distribuidos en Antártida, Asia, Europa, Norteamérica y Sudamérica.²⁶ Se caracterizan por poseer un hueso rostral aplanado y alargado otorgando la apariencia del pico propio de los patos y una cresta en la cabeza, aunque no todos poseían esa apariencia.²⁷

1.1.2.4.2 Familia Lambeosaurinae

Puesta: Una media de 24 huevos

Incubación: Los huevos no son incubados, sino cubiertos completamente con tierra y la madre siempre se encuentra alrededor del nido

Distribución geográfica: Asia, Europa y Norteamérica^{28,29}

Al igual que la familia Hadrosauridae, estos presentaban una cresta hueca sobre el cráneo similar a las que poseen algunas aves (Figura 1-2), y una altura de 2 m aproximadamente, con una longitud de 9 m, y un peso que variaba entre 1000 y 3000 Kg.^{30,31}



Figura 1-2. Recreación de un dinosaurio ornitópedo correspondiente a la familia Lambeosaurinae

1.1.2.4.3 Familia Troodontidae

Puesta: Una media de 16 huevos

Incubación: 45 a 65 días. Los huevos se cree que son incubados por la madre

Distribución geográfica: Asia, Europa y Norteamérica³²

Los troodóntidos eran depredadores bípedos conocidos como dinosaurios manirraptores, denominados así por la forma de sus manos rapaces y por poseer garras falciformes (Figura 1-3). Su tamaño suele ser de mediano a pequeño, con una longitud promedio de 2 m y un peso aproximado de 100 kg. Se consideran estos dinosaurios como corredores, por las extremidades inferiores largas y las garras en forma de hoz.³³



Figura 1-3. Recreación de un dinosaurio terópodo correspondiente a la familia Troodontidae

1.1.3 Estudios realizados en cascarones de huevo

1.1.3.1 Cascarones de huevos fosilizados

Desde el gran descubrimiento de huevos de dinosaurio en el Desierto de Gobi por la expedición central asiática organizada por el Museo Americano de Historia Natural cerca de 1920, los restos de huevos y cascarones fosilizados e incluso de nidos, han sido encontrados en todo el continente

asiático, principalmente del Cretácico superior.³⁴ En Norte América existe cerca de 40 localidades con huevos y/o cascarones fosilizados distribuidos entre Canadá, Estados Unidos y México.³⁵

La mayoría de los trabajos realizados de los cascarones de huevo están enfocados en su clasificación. La cual está basada en la identificación de la morfología general, forma del poro, grosor y principalmente, el arreglo cristalino, ya que una sección delgada del cascaron proporciona información útil como el tamaño del grano y orientación cristalográfica de cada grano.³⁶⁻³⁸ Pocos trabajos están enfocados en el análisis elemental e isotópico, los cuales fueron llevados a cabo con el propósito de encontrar información acerca de la posible temperatura corporal de algunos grupos de dinosaurio,³⁹ y para inferir condiciones paleoambientales,^{40,41} las que a veces están vinculadas a su extinción.⁴²

En México, hasta el momento solo existen dos localidades con registros de huevos y/o cascarones de dinosaurios. Uno se encuentra en la formación Cerro del Pueblo, al sur de Coahuila,⁴³ y el otro está ubicado en la formación El Gallo, Baja California.⁴⁴ Estos trabajos, como la mayoría, están enfocados en la clasificación de los cascarones. Sin embargo, no hay información acerca del análisis elemental de los cascarones fosilizados encontrados en México.

1.1.3.2 Cascarones de huevo de especies actuales

De las proteínas específicas del cascarón de especies actuales, la ovocalixina-25 y la ovocleidina-116, se han encontrado en la matriz orgánica del cascarón y en fluido uterino durante la etapa de crecimiento del huevo de gallina.^{45,46} Otra proteína aislada del huevo de gallina es la ovocleidina-17 (OC-17), la cual posee 142 aminoácidos, un peso de 17 kDa, y seis cisteínas, las cuales forman tres puentes disulfuro. Esta proteína fue la primera proteína intramineral caracterizada estructuralmente (Figura 4A), y se encuentra en la palizada mineral y los conos mamilares.⁴⁷⁻⁴⁹

De cascarones de huevo de otras especies se han encontrado proteínas homologas a la ovocleidina-17. Del ganso, se ha aislado la proteína ansocalcina (ANCA), la cual posee 132 aminoácidos y a diferencia de la OC-17, posee siete cisteínas y no ha sido caracterizada estructuralmente. De las especies de aves corredoras como el avestruz, emú y ñandú, se han aislado dos proteínas intraminerales, las cuales presentan del 40% al 70% de similitud con la secuencia de la OC-17. Del cascarón de avestruz, la estruthiocalcina-1 y -2 (SCA-1 y SCA-2), se han aislado con 132 aa y 142 aa, respectivamente. La SCA-1 se ha determinado estructuralmente (Figura 4B).⁵⁰

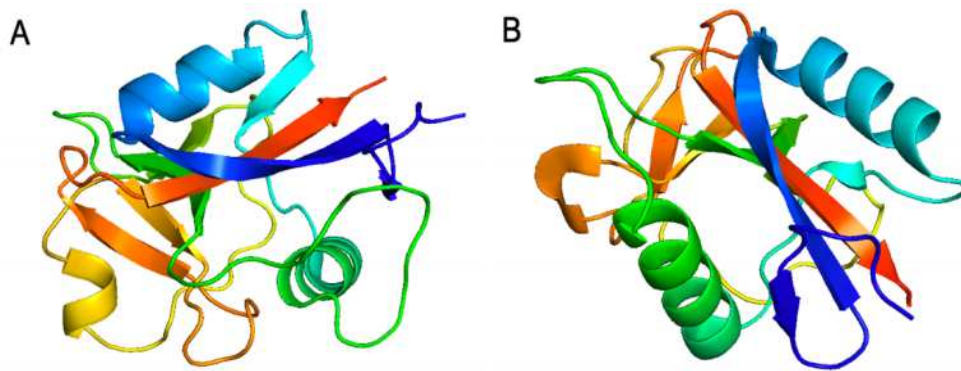


Figura 4. Estructura tridimensional de la ovocleidina-17 (OC-17, PDB: 1GZ2) (A) y de la estruthiocalcina-1 (SCA-1, PDB: 4UWW) (B) obtenidas a partir del cascarón de huevo de gallina y de avestruz, respectivamente

Del cascarón de huevo de emú y ñandú, se han aislado las proteínas dromaiocalcina-1 y -2 (DCA-1 y DCA-2), y rheacalcina-1 y -2 (RCA-1 y RCA-2), respectivamente.⁵¹ Recientemente, del cocodrilo, especie relacionada filogenéticamente a las aves, se han identificado dos proteínas de 7 kDa y 14 kDa denominadas crococalcina-1 y -2 (CCA-1 y CCA-2).⁵²

1.2 JUSTIFICACIÓN

En general, todos los procesos de biomineralización en la naturaleza, están asociados a un control estructural llevado a cabo por macromoléculas biológicas. Además, es poca la información estructural que se conoce acerca de las macromoléculas que componen y actúan en los seres vivos en estos procesos, ya que el nivel de organización estructural de los biominerales se jerarquiza a menudo en distintos órdenes estructurales para producir una estructura final muy compleja.

La importancia de los biominerales se aprecia en entidades biológicas orgánicas y sus componentes presentan estructuras que les confiere propiedades que hasta ahora no han sido reproducidas por el hombre. Por esta razón, la posibilidad de crear nuevos materiales a partir de los biominerales (biomimética), tiene un impacto importante en medicina y podría alcanzar otros campos de las ciencias biológicas y los materiales, ya que nos permitiría de manera eficaz, comprender los procesos de biomineralización y como imitarlos.

Para poder diseñar nuevos materiales es importante caracterizar los componentes macromoleculares, involucrados en los procesos de biomineralización. Uno de los procesos de mayor interés por su rapidez es la formación del cascarón de huevo en las gallinas, cuyo proceso de mineralización de carbonato de calcio ocurre en menos de 24 horas. En especies relacionadas filogenéticamente como lo son las aves del orden *Palaeognathae*, reptiles arcosaurios (dentro de

ellos tenemos a los cocodrilos) y los dinosaurios, la información que se tiene del proceso de biomineralización en la formación del cascarón de huevo es escasa o nula.

La mayor parte de los estudios realizados están enfocados a estudios inmunohistoquímicos sobre la formación del cascarón de huevo de gallina y de otras aves del orden *Neognathae*. No existe información que describa cómo es el mecanismo de biomineralización en el cascarón de huevo de emú y/o avestruz, y de otras especies de seres vivos emparentados filogenéticamente con bases estructurales vía rayos-x, microscopía de fuerza atómica (AFM) o electrónica de barrido (SEM). Por lo tanto, el análisis estructural y morfológico de cascarones de huevo de varias especies ancestrales y actuales contribuirán a entender el proceso de mineralización, ya que se están analizando cascarones fosilizados de especies que se extinguieron hace más de 70 millones de años, lo que confiere a obtener estructuras con un ordenamiento cristalino que otorga información de los procesos de preservación de estos, información que atribuye propiedades de interés a los materiales.

1.3 HIPÓTESIS

Las proteínas intraminerales encontradas en los diferentes cascarones de especies como aves, reptiles y dinosaurios, deben estar relacionadas con los procesos de nucleación, formación de cristales de carbonato de calcio y control estructural de la fase mineral. Por lo tanto, conocer la morfología de las estructuras formadas hace más de 70 millones de años y las obtenidas en especies actuales, permitirá proponer posibles mecanismos de biomineralización y los fundamentos químicos que expliquen su función biológica. Así como conocer la estructura tridimensional de algunas proteínas implicadas los procesos de biomineralización, permitirá definir su función biológica, al igual que los posibles genes implicados en estos procesos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 General

Realizar un estudio químico-estructural y bioquímico a cascarones de huevo de avestruz, emú, así como de cascarones de huevo de cocodrilo y las fases mineralizadas de cascarones de huevos de dinosaurios (de 100-70 Ma).

1.4.2 Específicos

1. Caracterizar el contenido elemental y molecular de cinco cascarones de huevo de dinosaurios del período Cretácico superior.
2. Caracterizar la morfología de los poros y la rugosidad de los cascarones de huevo de las especies ancestrales y actuales, citadas en el punto anterior.
3. Cristalizar las proteínas por métodos convencionales (gota colgante, sedente o batch) con el propósito de determinar la estructura 3D mediante el análisis de los datos de difracción de rayos X de las proteínas cristalizadas (si se obtiene cristales) del huevo de avestruz, emú, y de cocodrilo americano. Asimismo, comparar las proteínas que se obtendrán de los huevos de dinosaurio mineralizadas con antigüedad de 100-70 Ma; así como la caracterización de la estructura de los cascarones respectivos de cada especie de dinosaurios por diversas técnicas.

Capítulo 2.

Análisis Elemental y Morfológico de los Cascarones de Diferentes Especies

Elejalde-Cadena, N. R.; Cabrera-Hernández. J. S.; Hernández-Rivera, R.; Moreno, A. Searching for a clue to characterize a crystalline dinosaur's eggshell of Baja California, Mexico. *ACS Omega*. **2020**, *5*, 25936-25946.

2.1 INTRODUCCIÓN

Los dinosaurios son el grupo más enigmático e interesante que ha existido sobre la faz de la tierra. Vivieron en una variedad de ambientes que iba desde bosques hasta tierras áridas, incluyendo la costa alrededor de los océanos,^{1,2} hasta que enfrentaron un período de extinción a lo largo de la tierra, siendo los fósiles la única evidencia de su existencia. Entre estos fósiles se encuentran huesos, huellas, impresiones de piel, gastrolitos, coprolitos,³ nidos, huevos o cascarones de huevo.^{4,5}

A principios del siglo XX, se llevó a cabo el primer descubrimiento de huevos de dinosaurio en el desierto de Gobi por la expedición del Museo Americano de Historia Natural de Asia Central. A partir de ese evento, en alrededor del mundo, se han encontrado restos de cascarones de huevo, huevos y nidos en varios depósitos del Mesozoico, la mayoría de ellos del Cretácico Superior.^{6,7} Solo en América del Norte, existen al menos 40 localidades con fósiles de huevos y cascarones de huevo distribuidos entre Canadá, Estados Unidos y México.^{8,9}

La mayoría de los trabajos sobre la clasificación de los cascarones de huevo fosilizados se basan en sus diferentes características, como la morfología general, la forma de los poros y el grosor, pero principalmente, la disposición bioscristalina.¹⁰⁻¹² Además, algunos trabajos se centran en el análisis elemental e isotópico, con el propósito de encontrar información sobre la posible temperatura corporal de algunos de los grupos de dinosaurio,¹³ pero sobre todo, para inferir sus condiciones paleoambientales.^{14,15}

2.1.1 Ornamentación presente en los huevos

Los cascarones de huevo se dividen en dos grupos: suaves y calcáreas (flexibles y rígidas). Los cascarones suaves están compuestos por múltiples membranas fibrosas con ausencia de cristales de carbonato de calcio, lo que permite la absorción de agua y aumento de tamaño a medida que el embrión crece, como se observan en serpientes, lagartijas y monotremas.¹⁶ Los cascarones calcáreos flexibles, contienen una delgada membrana interna que permite el crecimiento de los cristales de carbonato de calcio (preferiblemente aragonita), como es el caso de las tortugas. Sin embargo, los rígidos presentan una capa cristalina gruesa de calcita que crece sobre una delgada membrana interna, lo que permite que el proceso de fosilización se lleve a cabo.¹⁷ Este tipo de cascarón es el más común y está presente en algunas tortugas terrestres, geckos, y arcosaurios (cocodrilos, dinosaurios y aves).¹⁸

Debido a la interacción entre la fase orgánica y mineral del cascarón, la organización estructural es favorecida, reconociéndose características estructurales en la superficie externa u ornamentaciones propias de cada grupo. La ornamentación consiste en la presencia de nodos, crestas o valles dispersados aleatoriamente o cumpliendo un patrón.^{7,19}

2.1.1.1 Tipos de huevos con cascarón calcáreo rígido

La clasificación de los huevos se determina por la forma y estructura de los cristales individuales de carbonato de calcio. Hasta la fecha, los tipos de huevos que se conocen son el *geckonoide* (geckos), *testudinoide* (tortugas), *crocodiloide* (cocodrilos), *esferulítico*, *prismático* y *ornitoide*, donde los tres últimos se conocen en aves y dinosaurios (Figura 2-1).^{6,7}

Los *esferulíticos*, presentan una fase mineral en forma tubular y ordenada, impidiendo ver los límites de cada fase, debido a que se presenta un proceso de fusión entre los cristales de cada una de las unidades y es común en huevos de dinosaurios como sauropodomorfos, ornitópodos y algunos terópodos. Para el caso de los *ornitoides*, presenta conos mamilares radiales o tabulares sobre la membrana orgánica. Además, presenta una estructura escamosa en la parte superior del cascarón, sobre la que crece una tercera capa con estructuras finamente ordenadas. Se observa en huevos de aves y dinosaurios oviraptorosaurios.^{20,21} Sin embargo, los *prismáticos*, presentan tres capas bien definidas. Presenta conos mamilares radial-tubular evitando la división de las unidades, por lo que se ve como una estructura homogénea, y es común en dinosaurios terópodos y troodontidos.^{22,23}

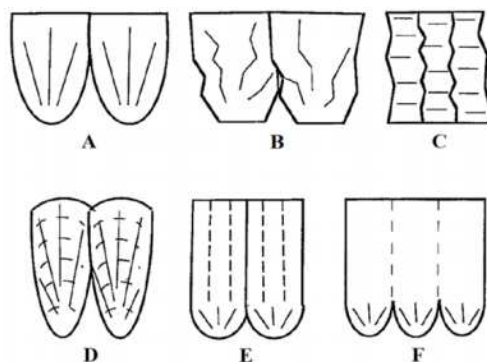


Figura 2-1. Ilustración de los cascarones de huevos de forma radial. **A.** *Testudinoide*; **B.** *Crocodiloide*; **C.** *Geckooide*; **D.** *Esferulíticos*; **E.** *Prismáticos*; **F.** *Ornitoides*⁶

2.1.2 Parataxonomía de huevos fosilizados

Los huevos, al igual que los de dinosaurio, siguen un sistema de clasificación denominado Veterovata (huevo viejo) utilizado para la identificación de huevos.²⁴ Esta clasificación se realizó

utilizando el arreglo cristalino de los cascarones, del cual se define la forma estructural y el sistema del poro, permitiendo así, la clasificación de los huevos fosilizados.¹⁹

La parataxonomía es el estudio de los huevos fosilizados, clasificándolos de acuerdo con su forma física y no por la especie que lo puso.⁷ Sigue unas reglas de escritura, donde el prefijo “oo” (huevo) se agrega para diferenciar las especies (ooespecies), géneros (oogéneros), y familias (oofamilias) de huevos; y el prefijo “-oolithus” (huevo de piedra), se utiliza en los géneros y familias, evitando así la confusión con la clasificación de los fósiles de vertebrados,⁶ siguiendo las reglas generales del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica.¹⁶

Las ooespecies se conocen por el tamaño y forma de huevo, aunque en especies como las aves y reptiles, el tamaño y grosor del cascarón de huevo varía dentro de la misma puesta. Dentro de las oofamilias, la ornamentación de la superficie externa varía al igual que el grosor del cascarón, pero la diagénesis por la que pasa los fósiles causa alteraciones en la estructura interna y externa del cascarón, por lo tanto, su grosor y ornamentación puede variar.¹⁶

2.1.3 Ubicación geográfica de la colecta de los cascarones de huevo de dinosaurio

Las muestras fueron colectadas en La Formación el Gallo en el pueblo El Rosario, Baja California. Los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae (II) fueron colectados a 3.4 Km del pueblo El Rosario (30°3'25"N 115°45'37"O) (Figura 2-2). Los cascarones de huevo *Prismatoolithus* (IV) y el ootaxon sin identificar (V) fueron colectados a 1.2 Km del punto II (30°3'50"N 115°46'12"O), mientras que los dos cascarones *Spheroolithus* (I y III) fueron colectados a 2.1 Km del punto II (30°3'58"N 115°46'45"O).



Figure 2-2. A. Mapa general de la localidad del sitio de excavación. B. Localidad precisa donde se colectaron los cascarones. I. *Spheroolithus* muestra 1; II. Familia Lambeosaurinae; III. *Spheroolithus* muestra 2; IV. *Prismatoolithus*; V. Ootaxon no identificado

2.2 METODOLOGÍA

Los cascarones fueron lavados con una solución de EDTA al 5% por 45 minutos con el fin de remover la membrana y las impurezas, así como conservar la morfología de las estructuras presentes en el cascarón. Luego, fueron lavados con agua Milli-Q y secados al ambiente. Posteriormente, los lados fueron identificados usando microscopio óptico SZH10 OLYMPUS y se colocaron sobre una cinta de carbón con el fin de identificar el lado externo e interno del cascarón. Una vez identificados los lados, se desarrolló la siguiente metodología.

2.2.1 Caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para estos análisis, se utilizó un microscopio SEM-TECAN VEGA 3 SB con un voltaje de 15keV usando electrones retro dispersados (BSE). Todas las muestras fueron cubiertas con oro por 30 segundos para mejorar la conductividad puestas sobre un barril de aluminio, adheridas con cinta de carbono y observadas por ambos lados y transversalmente. El grosor fue medido usando el software ImageJ de las imágenes tomadas transversalmente.

2.2.2 Mapeo usando microscopía electrónica de barrido de alta resolución (HRSEM) y espectroscopía de energía dispersiva (EDS)

El análisis por HRSEM y mapeo EDS se desarrollaron usando un microscopio JEOL JSM-7800F con magnificaciones variables a 15 keV. En el caso de EDS, el proceso se tomó con 2000 números de cuentas, y para el mapeo, el tiempo de proceso fue de 4 minutos. Las muestras se usaron sin cubrimiento de oro.

2.2.3 Caracterización elemental por fluorescencia de rayos-X (XRF)

Para esta técnica, se utilizó un tubo de rayos-X con un ánodo de Rh (30 keV de diferencia de potencial y 250 μ A de amperaje) localizado a un ángulo de 0° con respecto a la muestra. El tiempo de irradiación de cada muestra fue de 900 segundos. La detección de los rayos-X fue medida usando un detector SDD Ampek, ubicado a un ángulo de 45° con respecto a la muestra. La resolución del detector fue de 140 eV a 5.9 keV. Los datos obtenidos fueron analizados usando el software QXAS de la Agencia Internacional de Energía Atómica. La exactitud fue determinada usando métodos analíticos para material geogénicos publicado por Espinosa, et al.²⁵

2.2.4 Caracterización elemental por espectroscopia foto-electrónica de rayos-X (XPS)

El equipo K-Alpha Surface Analysis de Thermo fue usado para esta medición, con una línea de aluminio monocromática K-Alpha de 12 kV y 40 W de poder a un ángulo relativo de 30°. El reconocimiento general fue hecho usando un neutralizador que genera una nube de iones de argón de 3 keV de energía y 30 W de poder sobre la zona analizada. El espectro fue obtenido en dos condiciones: en una amplia exploración general (0-1350 V) con 1 eV/paso y 100 eV de energía escalonada, y en ventana pequeña con 0.1 eV/paso y 50 eV de energía escalonada.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los cascarones de huevos fosilizados de los dinosaurios que se encuentran en nidos en diferentes partes del mundo, son suficientes para demostrar su existencia. Sin embargo, se han encontrado algunos testimonios grabados en la superficie de las rocas, pero esta información es, la mayoría de las veces, difícil de decodificar y se encuentra escondida allí. Las muestras que se han estudiado en este trabajo fueron donadas por el Instituto de Geología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los cascarones de huevo de dinosaurio estaban perfectamente datados y clasificados según las técnicas paleontológicas.

2.3.1 Cascarones de huevos en estudio

2.3.1.1 Cascarones de dinosaurio

La tabla 2-1 muestra las fotografías ópticas de cinco tipos de cascarones de huevo de dinosaurio discutidas en este trabajo: **I.** *Spheroolithus* muestra 1; **II.** Familia Lambeosaurinae; **III.** *Spheroolithus* muestra 2; **IV.** *Prismatoolithus*; **V.** Ootaxon no identificado, las cuales presentan dimensiones de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm. Además, se pudo apreciar que los cascarones de huevo del Terópodo (V) presenta una coloración rojiza y una superficie lisa, mientras que los cascarones de huevo de los ornitópodos (I, II, y III) tienen colores opacos como grises y amarillo claro con superficies rugosas. Sin embargo, la coloración no es relevante para su caracterización. La asignación del lado se llevó a cabo observando la sección transversal de los cascarones donde se aprecia correctamente la curvatura de cada uno de ellos y el grosor de cada una de las muestras se obtuvo de las imágenes SEM de la sección transversal.

Tabla 2-1. Cascarones de huevo de cinco ooespecies de dinosaurio. I. *Spheroolithus* muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. *Spheroolithus* muestra 2; IV. *Prismatoolithus*; V. Ootaxon no identificado.

Tipo	I	II	III	IV	V
Superficie Externa					
Superficie Interna					
Grosor	611 μm	588 μm	1026 μm	317 μm	859 μm

De acuerdo con las imágenes de la tabla 1, el cascarón de huevo del ootaxon no identificado (V) es similar a los cascarones que corresponden a los ootaxa de los ornitópodos (I y III) en cuanto a coloración, rugosidad y grosor.

2.3.1.2 Cascarones de especies actuales

En la tabla 2-2, se puede observar la coloración y morfología interna y externa que presentan los cascarones de huevo avestruz, emú y cocodrilo. El cascarón de avestruz posee una coloración amarillo pálido con la superficie externa lisa y poco rugosa en comparación con la superficie interna. En el caso del cascarón de huevo de emú, el cual presenta una coloración azul verdosa en la superficie externa, permite apreciar la distribución de los poros (puntos blancos), similar a como se observan en la superficie interna del casarón de cocodrilo, el cual posee una coloración blanca con superficie poco rugosa y lisa.

Tabla 2-2. Fotografías correspondientes a los cascarones de huevo de especies actuales. El grosor se determinó con las imágenes de SEM de la sección transversal.

Especie	Avestruz	Emú	Cocodrilo
Superficie Externa			
Superficie Interna			
Grosor	908 μm	1190 μm	249 μm

2.3.2 Caracterización morfológica usando SEM

La microscopía electrónica de barrido es una técnica utilizada para la determinación de la topografía de un material. Esta interacción se da por los electrones provenientes del haz (no se usa haz de luz) y los átomos de la superficie. Los electrones pueden ser secundarios (SE, por sus siglas en inglés) o retro dispersados (BSE, por sus siglas en inglés), permitiendo una resolución de 1 a 20 nm.

2.3.2.1 Identificación de estructuras presentes en la superficie externa e interna

2.3.2.1.1 Estructuras en cascarones de huevo de dinosaurio

En la figura 2-3 se muestran las imágenes obtenidas por SEM de la superficie externa e interna, así como de la sección transversal de cada cascarón de huevo de dinosaurio. De la superficie externa e interna del cascarón *Spheroolithus* muestra 1 (Figura 2-3A y 2-4B), se observa una gran deposición de gránulos, los cuales forman grandes agregados, evitando la visibilidad de partículas más pequeñas debido a la fusión de las unidades adyacentes. La superficie interna de los cascarones correspondientes a los dinosaurios ornitópodos (Figura 2-3, tipo IB, IIB, IIIB) presentan unidades con estructuras fibrosas formadas gracias a la presencia de la membrana testácea (indicadas con flecha azul claro), mientras que el cascarón correspondiente al dinosaurio terópodo (Figura 2-3, tipo IVB) presenta estructuras granulares de diferentes formas y tamaños distintas a las observadas en el cascarón del ootaxon no identificado (Figura 2-3, tipo VB) que posee microagregados dispersados por toda la superficie dando un apariencia suave y fibrosa en algunas áreas del cascarón.

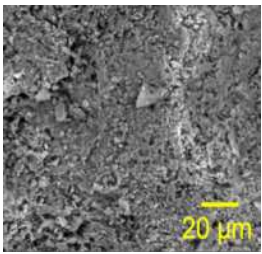
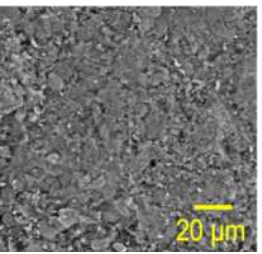
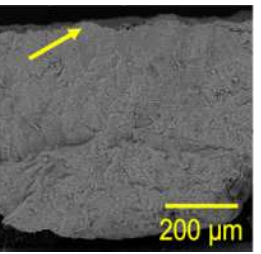
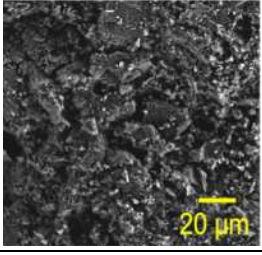
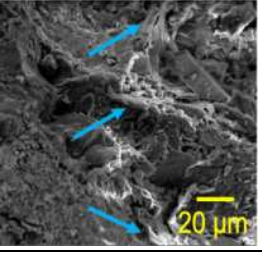
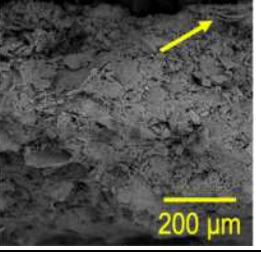
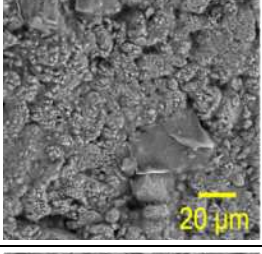
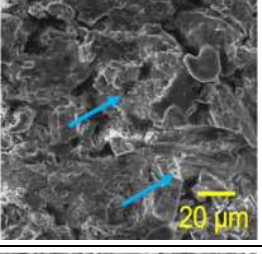
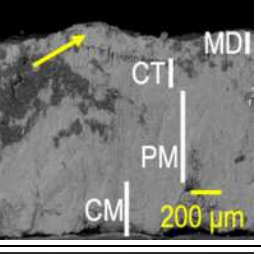
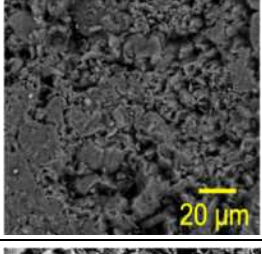
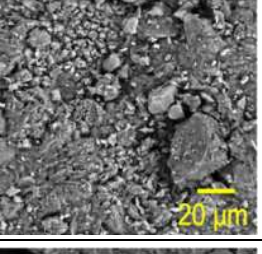
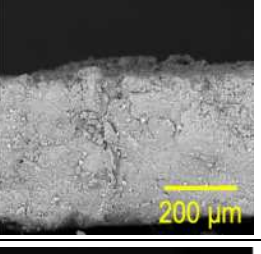
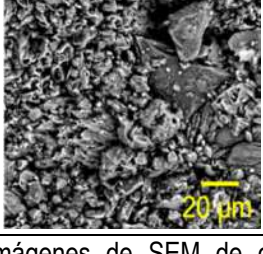
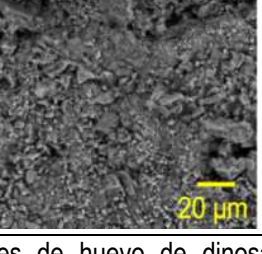
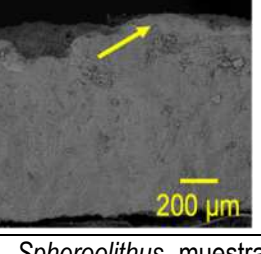
Tipo	Superficie Externa (A)	Superficie Interna (B)	Sección Transversal (C)
I			
II			
III			
IV			
V			

Figura 2-3. Imágenes de SEM de cascarones de huevo de dinosaurios. I. *Spheroolithus* muestra 1; II. Lambeosaurinae; III. *Spheroolithus* muestra 2; IV. *Prismooolithus*; V. Ootaxon no identificado; CT. Cutícula; MD. Mineral diagenético; PM. Palizada mineral; CM. Conos mamilares

La figura 1-1 de la página 3, muestra la composición y características del cascarón de huevo, siendo la más evidente los conos mamilares, la palizada mineral y la cutícula, siendo la parte más externa del cascarón. Algo similar se observó en el cascarón *Spheroolithus* muestra 2 (tipo III), donde fue posible apreciar con más claridad las partes que componen al cascarón, las cuales

presentan crecimiento policristalino, con conos mamilares y cutícula bien definida (Figura 2-3, tipo IIC). Además, se observó la formación de una fase mineral sobre la cutícula (MD), formada por los cambios diagenéticos llevados a cabo durante la fosilización.

Otra característica presente en los cascarones de huevo de dinosaurios son las diferentes formas de ornamentación como nodos, valles o crestas²⁶ distribuidos por toda la superficie externa del cascarón (indicadas por una flecha amarilla en la Figura 2-3C).⁷ El cascarón del ootaxon no identificado presenta nodos como los observados en los cascarones *Spheroolithus* (Figura 2-3, tipo IC y IIC) distribuidos a diferentes distancias, similares a los encontrados en el cascarón del ootaxon no identificado (Figura 2-3, tipo VC), añadiendo un poco de evidencia a la idea de que el cascarón podría pertenecer a un dinosaurio ornitópodo y que corresponda probablemente a la familia Hadrosauridae, ya que es la familia con más hallazgos en el territorio Mexicano. Mientras que en cascarones como los *Prismatoolithus*, presenta una apariencia liza y sin protuberancias en la superficie externa (Figura 2-3, tipo IV). Para el cascarón de la familia Lambeosaurinae (Figura 2-3, tipo IIC), fue imposible identificar alguna ornamentación debido a que presenta un desgaste en la superficie, sin embargo, una delgada lámina en algunas áreas de la superficie externa se observa, lo que probablemente corresponda a lo que sería la cutícula.

2.3.2.1.2 Estructuras en cascarones de huevo de especies actuales

En el caso de los cascarones correspondientes a especies actuales (Figura 2-4), se observó que las estructuras son únicas en ambas superficies para cada una de las especies. En el caso de la superficie externa del cascarón de huevo del avestruz, se observó que la cutícula presenta una rugosidad y fragmentación definida, muy diferente a la observada en la superficie externa del cascarón de huevo del emú, que corresponde al mismo orden de aves (Paleognathae), el cual presenta una cutícula lisa y fragmentación aleatoria. En cambio, en el caso del cascarón de huevo del cocodrilo, en la superficie externa se observan estructuras de pequeños tamaños inferiores a 5 μm , contrarias a las observadas en la superficie interna, las cuales presentan forma y tamaños variados, lo que provoca un aumento en la rugosidad de la superficie. Caso contrario se presenta en la superficie interna de los cascarones de huevo correspondientes a las aves, las cuales conservan las estructuras filamentosas, formadas gracias a la membrana testácea, similares a las que se observaron en los cascarones de dinosaurio, solo que, por estar expuestos a los cambios ambientales, se distingue el desgaste provocado durante la fosilización.

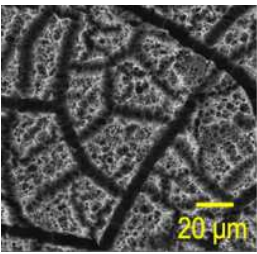
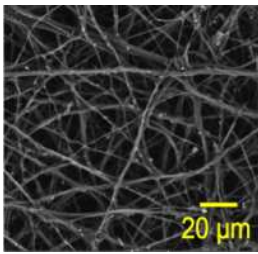
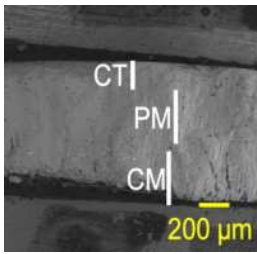
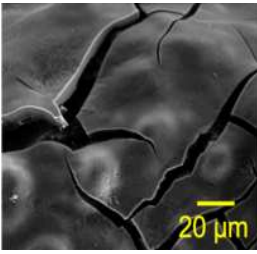
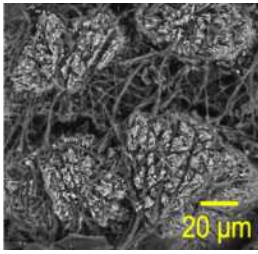
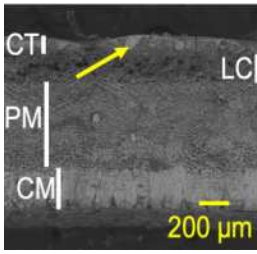
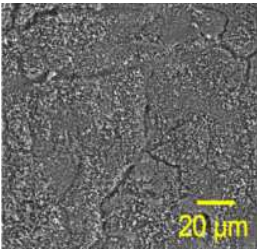
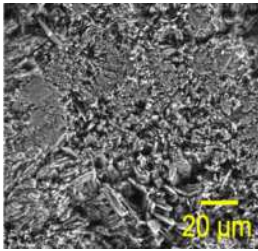
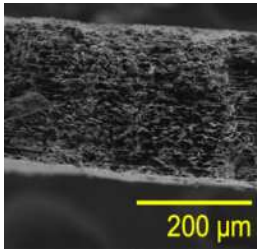
Especie	Superficie Externa (A)	Superficie Interna (B)	Sección Transversal (C)
Avestruz			
Emú			
Cocodrilo			

Figura 2-4. Imágenes de SEM de cascarones de huevo de especies actuales en estudio. **CT.** Cutícula; **LC.** Lámina cristalina; **PM.** Palizada mineral; **CM.** Conos mamilares

Para el caso de la sección transversal, en el cascarón de huevo de cocodrilo y de avestruz no se evidencia la presencia de ornamentaciones como las observadas en los cascarones de huevo de dinosaurio. Solo, en el cascarón de huevo de emú, se logró observar un nodo de tamaño pequeño, indicado con una línea amarilla. Además, las partes del cascarón como los conos mamilares, palizada mineral y cutícula se distinguen en los cascarones de huevo de las aves, con la diferencia de que, en el cascarón de huevo de emú, se logra observar la lámina cristalina formada debajo de la cutícula, la cual no es visible en todas las especies de aves, así como no se logra diferenciar las partes del cascarón de huevo en la muestra correspondiente al cocodrilo.

2.3.2.2 Identificación de estructuras presentes en la sección transversal

2.3.2.2.1 Estructuras en cascarones de huevo de dinosaurio

La morfología estructural observada en los cascarones varía dependiendo del área de análisis. El cascarón *Spheroolithus* muestra 1 (tipo I) está compuesto por capas de diferentes morfologías no facetadas (Figura 2-5, tipo IA), y estructuras regulares con tamaños que varían entre 0.5 a 5 μm (Figura 2-5, tipo IB). La primer capa del cascarón esta conectada con la membrana testácea

que cumple la función de ser base para llevar a cabo el proceso de cristalización y formación de los conos mamilares, la cual crece epitaxialmente y con una apariencia cilíndrica (Figura 2-5, tipo IC) dando paso a la formación de la palizada mineral compuesta principalmente por carbonato de calcio (CaCO_3), responsable de la dureza y forma del cascarón.²⁷⁻²⁹ Además, fue posible observar la cutícula formada por una manta de cristales de calcita organizados en paralelo (Figura 2-5, tipo ID).

El cascarón de la familia Lambeosaurinae (Figura 2-5, tipo IIA), presenta estructuras diferentes facetadas bien definidas con tamaños superiores a $5\ \mu\text{m}$, y algunas entre 20 a $50\ \mu\text{m}$. Esto provoca el incremento en la rugosidad de la muestra fácilmente detectable bajo el microscopio óptico, que evita la observación de las capas del cascarón. Sin embargo, los conos mamilares son cortos y separados entre ellos (Figura 2-5, tipo IIC), observándose estructuras en forma tubular en la última capa del cascarón (Figura 2-5, tipo IIID), similares a las observadas en el cascarón de huevo tipo I, correspondiente a *Spheroolithus* muestra 1 (Figura 2-5, tipo ID). Mientras que, los conos mamilares del *Prismatoolithus* (Figura 2-5, tipo IVC) están formando clústeres con estructuras yuxtapuestas amplias que tienen una terminación redondeada y en forma de columna en la cutícula (Figura 2-5, tipo IVD), con estructuras de tamaños que oscila entre 0.5 a $10\ \mu\text{m}$ (Figura 2-5, tipo IVB). Pero, al observar el cascarón del ootaxon sin identificar, este refleja una alta similitud con las estructuras de los cascarones de huevo de los ornitópodos en términos de apariencia cristalina y tamaño (Figura 2-5, tipo V). Por lo tanto, fue factible distinguir un crecimiento policristalino semejante al del cascarón *Spheroolithus* muestra 2 (Figura 2-5, tipo IIIB), con conos mamilares delgados y estructuras terminales esféricas (Figura 2-5, tipo VC) formando pequeñas columnas localizadas en la última capa del cascarón (Figura 2-5, tipo VD).

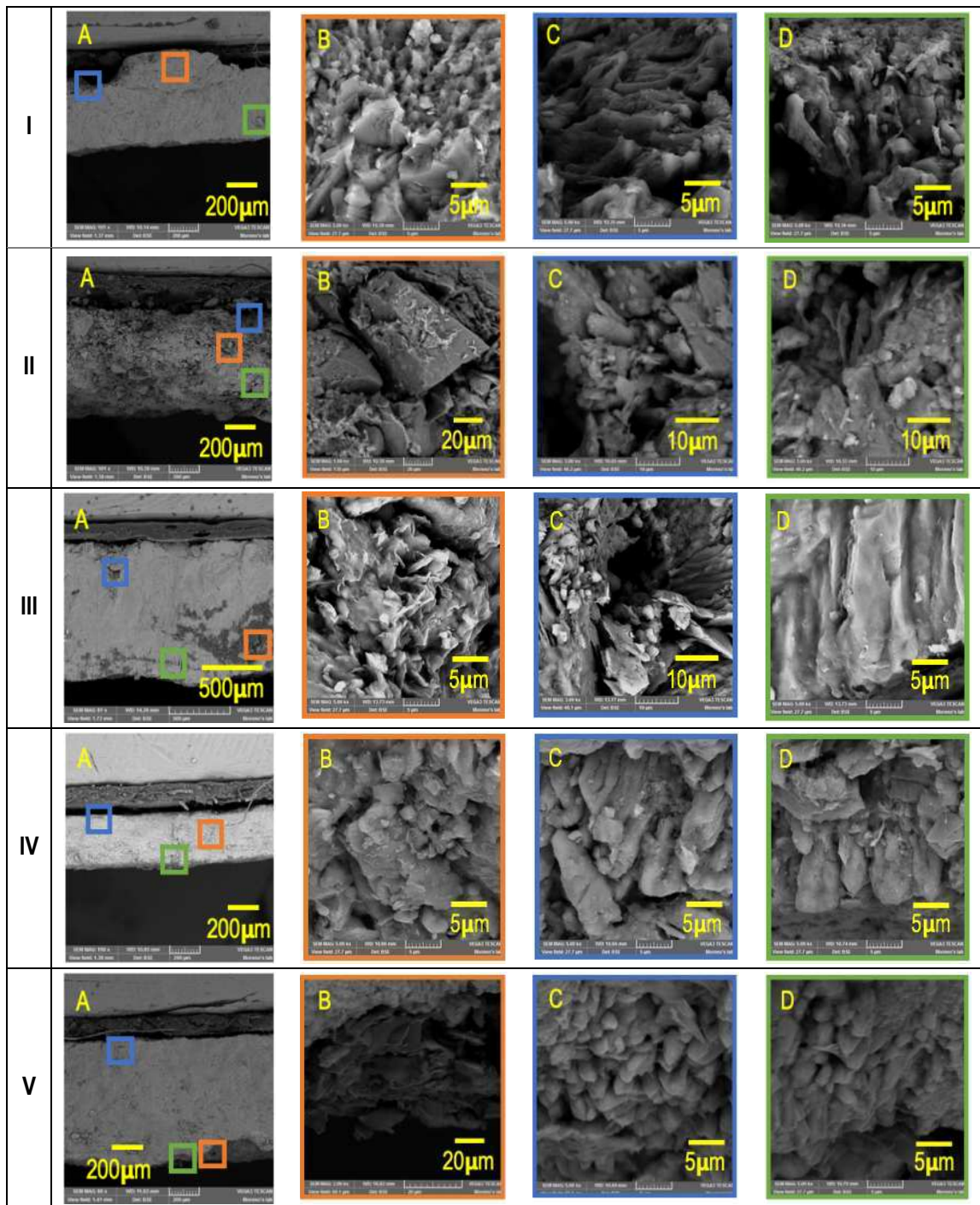


Figura 2-5. Imágenes de SEM de la sección transversal de cinco cascarones de huevo de dinosaurios. **A.** Sección transversal; **B.** Estructuras observadas en la palizada mineral; **C.** Conos mamilares; **D.** Estructuras presentes en la cutícula; **I.** *Spheroolithus* muestra 1; **II.** Familia Lambeosaurinae; **III.** *Spheroolithus* muestra 2; **IV.** *Prismaoolithus*; **V.** Ootaxon no identificado. La superficie externa se encuentra en la parte inferior de las imágenes de la sección transversal

2.3.2.2.2 Estructuras en cascarones de huevo de especies actuales

Al observar los cascarones de huevo de especies actuales, se pudo ver que los conos mamilares de los cascarones de huevo de avestruz y emú (Figura 2-6, AV-C y EM-C), presentan una morfología conservada. Mientras que en el cascarón de huevo de cocodrilo, los conos mamilares no son diferenciables (Figura 2-6, CC-C), al igual que las estructuras de la cutícula y de la palizada mineral, las cuales se observan como placas de calcita apiladas con fisuras horizontales intermitentes (Figura 2-6, CC-B,D). Además, se puede intuir que el cascarón de huevo de emú, presenta una mayor porosidad por la distribución de las estructuras cristalinas presentes en la palizada mineral y cutícula (Figura 2-6, EM-B,D), las cuales se observan que poseen estructuras reticulares de menor tamaño en comparación con las estructuras observadas en el cascarón de huevo de avestruz (Figura 2-6, AV-B,D).

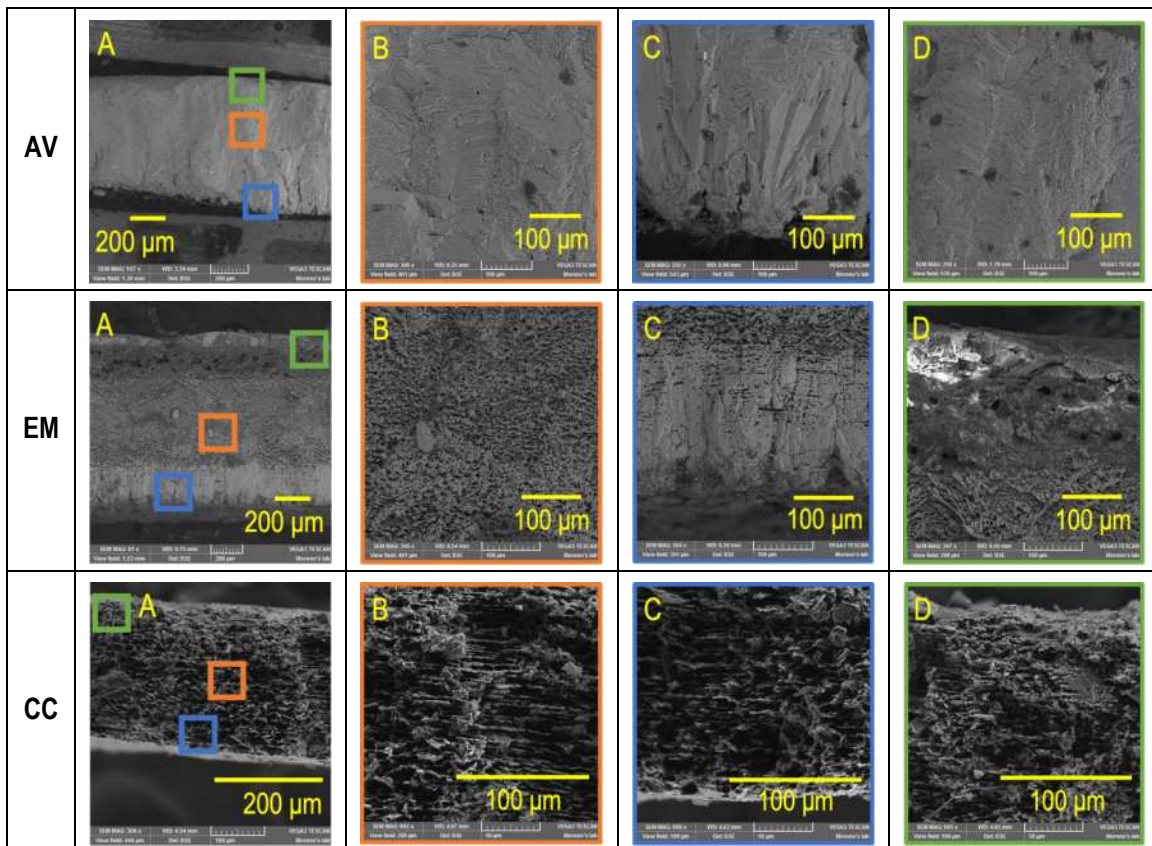


Figura 2-6. Imágenes de SEM de la sección transversal de cascarones de huevo de especies actuales. **A.** Sección transversal; **B.** Estructuras observadas en la palizada mineral; **C.** Conos mamilares; **D.** Estructuras presentes en la cutícula; **AV.** Avestruz; **EM.** Emú; **CC.** Cocodrilo. La superficie externa se encuentra en la parte superior de las imágenes de la sección transversal

2.3.3 Análisis de la distribución elemental mediante EDS

El análisis por EDS consiste en la determinación de los elementos químicos presentes en una muestra, no de manera superficial sino interna, ya que se utiliza rayos X lo que permite una mayor resolución de aproximadamente 1 μm . Por lo tanto, el objetivo es determinar la composición elemental de cada lado de los cascarones de las especies ancestrales como los dinosaurios y de especies actuales como avestruz, emú y cocodrilo, con el fin de determinar los posibles elementos que se hayan infiltrado en los cascarones de dinosaurio durante la fosilización.

2.3.3.1. Análisis elemental de cascarones de huevo de dinosaurios

El análisis por EDS fue llevado a cabo en la zona enmarcada con línea blanca en ambos lados de los cascarones bajo estudio (Figura 2-7 y Anexo 2.1). Aquí, la presencia de calcio (Ca), oxígeno (O), carbono (C) son principalmente observados, siendo los componentes del carbonato de calcio presente en el cascarón de huevo, al igual que el silicio (Si), producto de la silicificación. Además, son los componentes de la wollastonita³⁰ siendo uno de los estándares de los posibles compuestos presentes en las muestras (Tabla 2-3). La wollastonita es un mineral común que es obtenido en la reacción de carbonato de calcio (CaCO_3) con óxido de silicio (SiO_2) presente en el cascarón de huevo. Esta síntesis se lleva a cabo en el suelo a temperaturas y presiones altas durante un metamorfismo progresivo.³¹ Además, elementos como hierro (Fe), potasio (K), sodio (Na) y aluminio (Al), están presentes en pequeñas cantidades, como se observa en el recuadro de la Figura 2-8A y 2-8B, que, al reaccionar con el óxido de silicio, forman la albita,³²⁻³⁴ otro mineral que se encuentra como estándar de los compuestos presentes en las muestras. La presencia de elementos tales como magnesio (Mg), fósforo (P) y manganeso (Mn), nos indica que materiales sedimentarios como los minerales arcillosos fueron infiltrados dentro de los cascarones de huevo. Por lo tanto, esto es una evidencia de que los cascarones de dinosaurio estuvieron bajos cambios diagenéticos durante la fosilización, implicando un cambio en la composición elemental debido a inclusiones o difusión de átomos o moléculas presentes en el medio ambiente.

De la composición elemental obtenida, el contenido de calcio (Ca) es inversamente proporcional al contenido de silicio en ambos lados de los cascarones, siendo mayor en la superficie externa que en la interna. Esta disminución en el contenido del calcio (Ca) es probablemente un indicativo de que otros elementos se hayan infiltrado mediante procesos de difusión, reemplazamiento o recristalización llevados a cabo durante la fosilización.³⁵

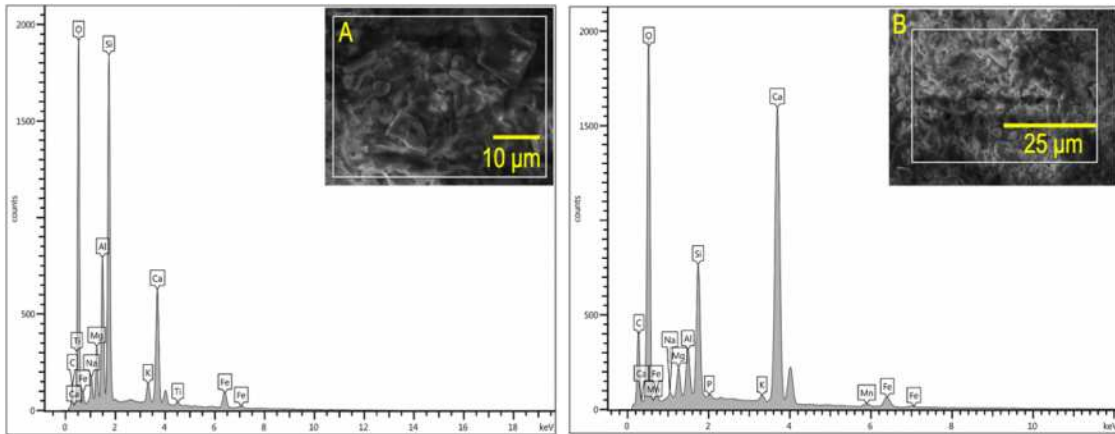


Figura 2-7. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

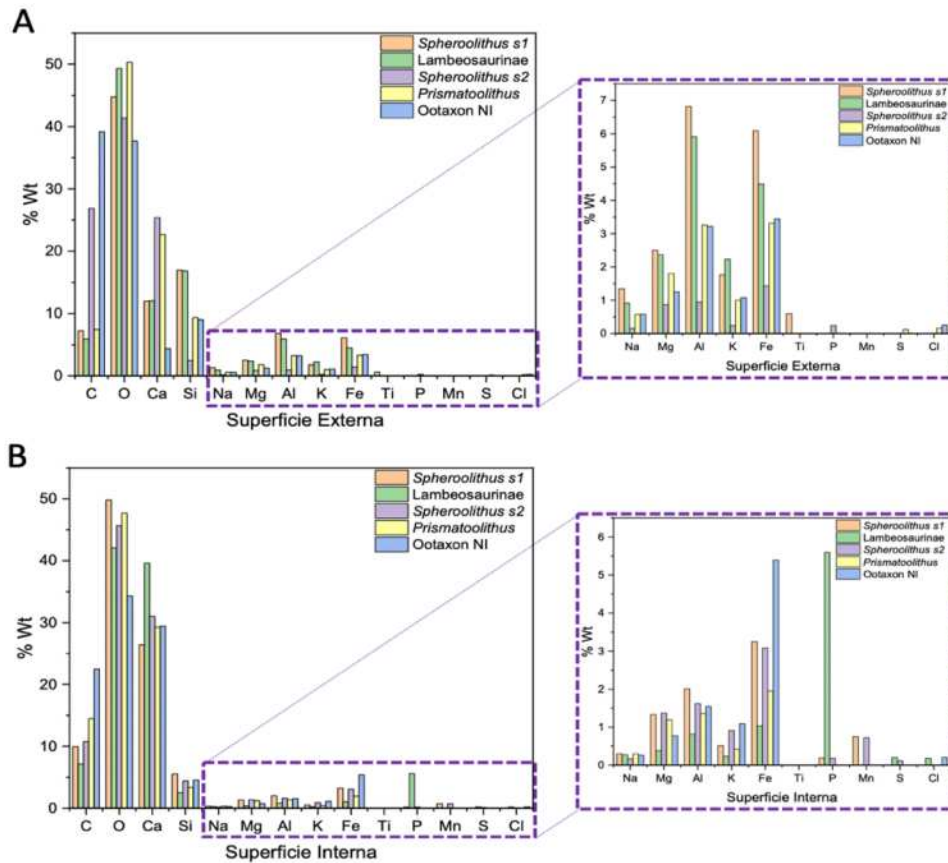


Figura 2-8. Composición elemental en porcentaje de peso molecular de los cinco cascarones de huevo de dinosaurio. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **Naranja:** *Spheroolithus* muestra 1; **Verde:** Familia Lambeosaurinae; **Amarillo:** *Spheroolithus* muestra 2; **Morado:** *Prismatoolithus*; **Azul:** Ootaxon no identificado. El recuadro muestra una ampliación del área donde el porcentaje de los elementos presentes es muy bajo

Tabla 2-3. Posibles estándares obtenidos por EDS de acuerdo con la composición elemental presente en los cinco cascarones de huevo de dinosaurio

Elemento	Estándar	Elemento	Estándar	Elemento	Estándar	Elemento	Estándar
C	C Vit	Si	SiO ₂	Al	Al ₂ O ₃	P	GaP
O	SiO ₂	Na	Albita	K	KBr	Mn	Mn
Ca	Wollastonita	Mg	MgO	Fe	Fe	Ti	Ti

2.3.3.2 Análisis elemental de cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo

Con el fin de comparar los resultados de los cascarones de dinosaurios, se tomaron los EDS de los cascarones de especies actuales como avestruz, emú, y cocodrilo (Figura 2-9), y los resultados indicaron que estaban compuestos de calcio (Ca), carbono (C), y oxígeno (O), los principales componentes del carbonato de calcio (CaCO₃), el cual está en forma de calcita. En el caso del cocodrilo (Figura 2-9C), también se identificó la presencia de sodio (Na), la cual probablemente corresponda a impurezas presentes en el medio durante el crecimiento embrionario.

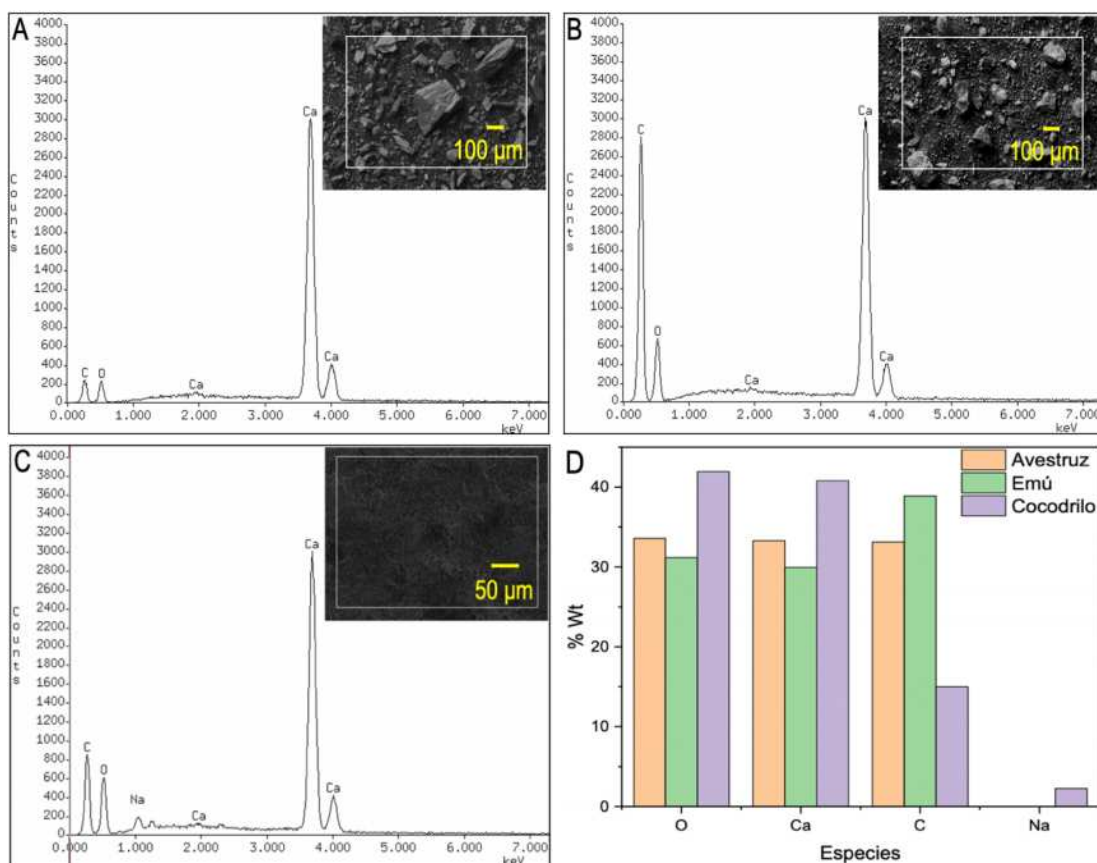


Figura 2-9. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en los cascarones de huevo pulverizados de avestruz (A), emú (B), y cocodrilo (C) y del porcentaje en masa de los elementos identificados (D). **Naranja:** Avestruz; **Verde:** Emú; **Morado:** Cocodrilo

2.3.4 Mapeo por EDS de los cascarones de huevo de dinosaurio

De acuerdo con los resultados obtenidos del EDS de los cascarones de dinosaurio, se realizó el mapeo por EDS con el fin de determinar la distribución elemental de cada una de las muestras. El área estudiada se encuentra enmarcada con línea blanca (Figura 2-10A, 2-10B y Anexo 2.2), permitió observar que el carbono (C), potasio (K), hierro (Fe), manganeso (Mn), fósforo (P), azufre (S) y cloro (Cl), en el caso del anexo 2, están distribuidos por toda la muestra en comparación con los otros elementos. Oxígeno (O), sodio (Na), aluminio (Al), silicio (Si), y magnesio (Mg) se encuentran principalmente en áreas donde el calcio (Ca) está presente en menor concentración debido a la ubicación espacial de los átomos dentro de las estructuras formadas en los cascarones. Además, en la Figura 2-10A se observa la presencia de una estructura de gran tamaño enmarcada en amarillo, en donde el oxígeno (O), sodio (Na), aluminio (Al), y silicio (Si), son los elementos más característicos, así como se observa en la estructura de la Figura 2-20 del anexo 2.2.

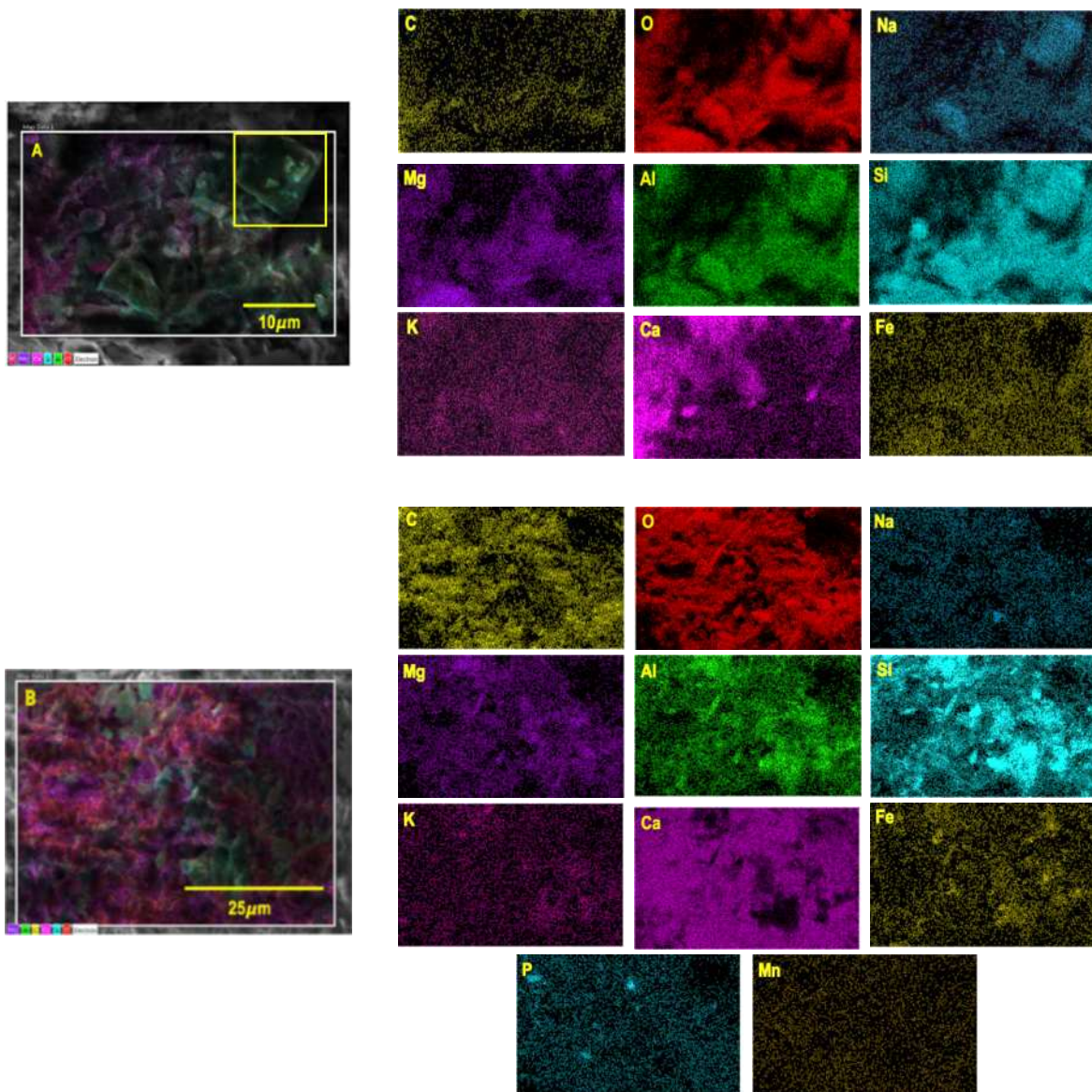


Figura 2-10. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

2.3.5 Análisis elemental por XRF de cascarones de huevo de dinosaurio

La fluorescencia de rayos X (XRF, por sus siglas en inglés), es una técnica utilizada para la determinación elemental de una muestra mediante el uso de rayos X, permitiendo una resolución de entre 10 a 100 μm. Debido a la información obtenida por SEM-EDS, se decidió utilizar XRF con el fin de determinar con más precisión la composición elemental de cada uno de los cascarones, y así, confirmar si la presencia de metales pesados, los cuales se pudieron haber insertado por difusión. De acuerdo con la información obtenida en la tabla 2-4, el calcio (Ca) es el principal componente en los cascarones, por lo que su alta concentración es adecuada por el

tipo de muestras. Además, silicio (Si) y fósforo (P) están ligeramente en exceso en comparación con aluminio (Al), potasio (K), o hierro (Fe), elementos que se encuentran naturalmente en la tierra.³⁶ Sin embargo, la presencia de sodio (Na), magnesio (Mg), y cloro (Cl) fueron detectados, pero con valores que se consideraban no confiables. La presencia de metales como cromo (Cr), cobre (Cu), zinc (Zn), y estroncio (Sr), los cuales no se observaron por EDS, fueron detectados. Esto provee información acerca de los niveles electrónicos de energía más altos, por la profundidad de donde la señal proviene la cual es mayor en comparación con EDS, permitiendo la determinación de estos elementos en baja concentración.

Tabla 2-4. Concentración de masa (mg kg⁻¹) de los elementos reportados en los cascarones de huevo de dinosaurio.^a **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **I.** *Spheroolithus* muestra 1; **II.** Lambeosaurinae; **III.** *Spheroolithus* muestra 2; **IV.** *Prismatoolithus*; **V.** Ootaxon no identificado

Muestra	Al	Si	P	S	K	Ca	Cr	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr
IA		1700 (140)	650 (90)	2040 (260)	970 (160)	37000 (3900)	31 (5)	66 (8)	274 (16)		9 (3)	34 (6)
IB	850 (140)	4800 (230)	800 (110)	2180 (280)	820 (140)	56600 (5900)	23 (4)	260 (16)	602 (23)	120 (65)	38 (7)	56 (9)
IIA	14600 (1600)	6600 (1200)	1450 (190)	1460 (190)	6100 (920)	176000 (18000)		570 (24)	4920 (70)	310 (160)	100 (13)	358 (50)
IIB	2200 (290)	13500 (410)	720 (100)	2740 (340)	910 (160)	41300 (4300)		156 (12)	590 (23)	210 (110)	29 (6)	76 (12)
IIIA	2300 (300)	12200 (380)	680 (94)	1650 (210)	2100 (330)	104000 (11000)		110 (10)	820 (27)	770 (380)		146 (22)
IIIB	1800 (240)	13600 (400)	850 (120)	2000 (250)	1970 (310)	109000 (11000)		252 (15)	1190 (33)	78 (44)		158 (23)
IVA	500 (100)	1470 (130)	360 (57)	2110 (270)	190 (45)	25400 (2700)	10 (3)	125 (11)	233 (14)		40 (7)	20 (4)
IVB		2600 (170)	700 (97)	1940 (250)	550 (100)	30300 (3200)	15 (3)	99 (9)	179 (13)	140 (73)	16 (4)	38 (7)
VA	650 (120)	5200 (240)	1320 (170)	2470 (310)	710 (120)	35800 (3800)		440 (21)	264 (15)		31 (6)	14 (3)
VB	1940 (260)	8700 (320)	790 (110)	2520 (310)	950 (160)	43600 (4600)	14 (3)	440 (21)	490 (21)		19 (5)	25 (5)

Los valores están dados en mg Kg⁻¹. ^a Los valores entre paréntesis, corresponden a la desviación estándar.

2.3.6 Estados electrónicos de los elementos determinados mediante XPS de los cascarones de huevo de dinosaurio

Esta espectroscopía electrónica permite la excitación electrónica de los niveles más internos de los átomos, que mediante el uso de un haz de rayos-x, provoca la emisión de fotoelectrones que

proporciona información para determinar la composición elemental, química, y los estados electrónicos de cada elemento presente en la superficie a una profundidad de 1 a 10 nm.³⁷

Debido a que metales como cromo (Cr), cobre (Cu), zinc (Zn), y estroncio (Sr) fueron encontrados en el análisis por XRF, pero no fueron detectados por EDS, se decidió corroborar si estos elementos se encontraban dentro de los cascarones o solo a nivel superficial. Pero, basados en eso, es probable que los átomos de los metales estén rodeados por los principales elementos del cascarón (Ca, C, O) ya que tienen un potencial de unión mucho mayor en la superficie, causando un aumento en la reactividad en comparación con los átomos en masa.

En consecuencia, los principales elementos presentes en las superficies del cascarón *Spheroolithus* muestra 1 del dinosaurio ornitópodo (Figura 2-11) son calcio (Ca), oxígeno (O), carbón (C), silicio (Si), aluminio (Al), hierro (Fe) y magnesio (Mg). Un caso similar es observado en el cascarón *Prismatoolithus* del dinosaurio terópodo (Figura 2-21 del anexo 2.3), a excepción del hierro que está presente solo en la superficie externa del cascarón, probablemente a que la señal es causada por los electrones que se dispersan elásticamente antes de salir de la superficie de la muestra, lo que provoca una reducción en la energía cinética de los electrones y, por lo tanto, una disminución en la intensidad de los picos.

Tabla 2-5. Energías de enlace de los estados electrónicos de los elementos presentes en el cascaron de huevo de *Spheroolithus* muestra 1 obtenido por XPS

Superficie Externa		Superficie Interna	
Estado Electrónico	Energía de Enlace (eV)	Estado Electrónico	Energía de Enlace (eV)
O1s	531.85	O1s	531.08
C1s	285.05	C1s	284.19
Si2p	102.78	Si2p	101.85
Ca2p	347.2	Ca2p	346.5
Al2p	74.38	Al2p	73.04
Fe2p	712.56	Fe2p	711.63
Mg1s	1303.52		

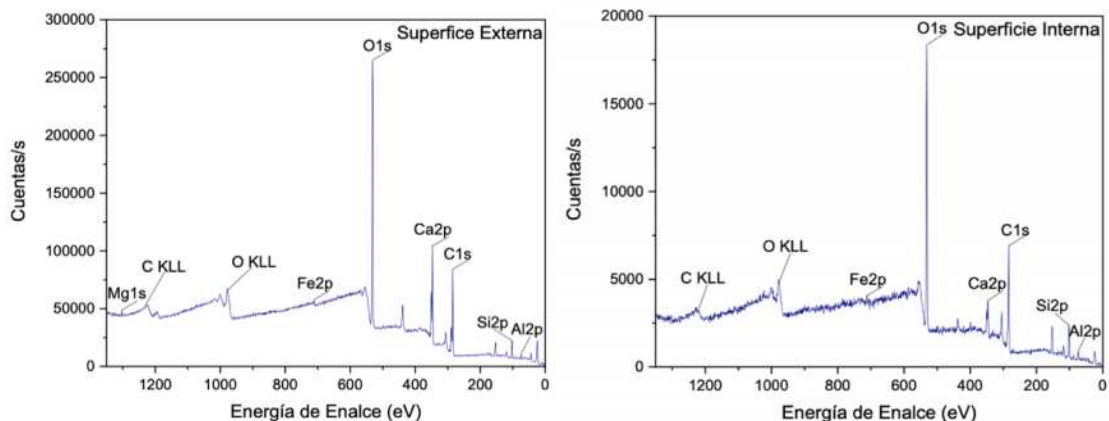


Figura 2-11. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 de la superficie externa e interna. Los estados electrónicos de algunos elementos presentes en el cascarón corresponden con los observados por EDS y XRF

De acuerdo a los espectros obtenidos de los cascarones del ornitópodo (Figura 2-11) y terópodo (Figura 2-21 del anexo 2.3) las energías de enlace observadas corresponden a aluminio (Al 2p, ≈ 74 eV), silicio (Si 2p, ≈ 102 eV), carbono (C 1s, ≈ 285 eV), calcio (Ca 2p, ≈ 347 eV), oxígeno (O 1s, ≈ 532 eV), hierro (Fe 2p, ≈ 712 eV), sodio (Na 1s, ≈ 1072 eV), y magnesio (Mg 1s, ≈ 1303 eV). Las intensidades correspondientes al oxígeno y carbono son las más sobresalientes (a excepción del calcio para la superficie externa para ambos cascarones), debido a la formación de compuestos orgánicos y a la capa de mineral diagenético (principalmente carbonato de calcio) formados durante el proceso de fosilización.

Con el fin de determinar los enlaces químicos y los compuestos presentes en la superficie de cada una de las muestras, se realizó la desconvolución de cada uno de los estados electrónicos (Figura 2-12 y Figura 2-22, 2-23 y 2-24 del anexo 2.3), determinando los grupos funcionales presentes en los cascarones *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus* (Tabla 2-5 del anexo 2.3). Para el caso del aluminio (Al 2p) y silicio (Si 2p), se determinaron cuatro curvas. Los picos a 76.74 eV y 74.09 eV están relacionados a óxido de aluminio (Al_2O_3) e hidróxido de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), mientras que el pico a 75.19 eV corresponde a aluminosilicatos (Al_2SiO_3) y aluminio metálico con una energía de enlace de 72.58 eV, mientras que las curvas en 104.52, 103.09, 102.07 y 100.64 eV, corresponden a compuestos de silicio como dióxido de silicio (SiO_2) y silicio con spin 3/2 y 1/2 ($2p_{3/2}$ y $2p_{1/2}$). También, se determinó las curvas para elementos no metálicos como el carbono (C 1s) asociados a compuestos acetilados (O-C-O) a 286.09 eV, grupos de carbono tipo alcano no oxidados (C-C) a 284.37 eV y carboxílicos (C=O) a 289.23 eV, y a compuestos con hibridación sp^3 y sp^2 a 285.14 y 284.03 eV, respectivamente. Además, carbonatos unidos a metales fueron observados a 290.21 eV, los cuales están probablemente asociados a carbonato de calcio o de sodio (CaCO_3 , Na_2CO_3); y como el oxígeno (O 1s), reforzando los resultados obtenidos del

carbono, donde las curvas a 532.91 eV corresponde al grupo funcional C-O ya sea de alcoholes o éteres y a 530.82 y 529.50 eV a óxidos metálicos.^{38,39}

Las señales correspondientes a metales alcalinos y alcalinoterreos como el sodio (Na 1s) para el caso del cascarón *Prismatoolithus* (Figura 2-23 y 2-24 del anexo 2.3), calcio (Ca 2p) y magnesio (Mg 1s) se encontraron en forma de óxidos (CaO a 346.63 eV, MgO a 1304.12 eV), hidróxidos (Mg(OH)₂ a 1302.04 eV, NaOH a 1073.26 eV), aluminosilicatos (Na[AlSi₃O₈] a 1072.18 eV, composición química de la Albita), fosfatos (Mg(H₂PO₄)₂ a 1306.44 eV, Na₃PO₄ a 1069.79 eV), bicarbonatos (NaHCO₃ a 1071.06 eV), carbonatos (CaCO₃ a 347.08 eV y 348.61 eV, MgCO₃ a 1305.19 eV) cloruros (CaCl₂ a 347.85 eV), sulfatos (CaSO₄ a 347.44 eV), y magnesio metálico a 1302.96 eV. Y finalmente, el hierro (Fe 2p), único metal de transición se identificó principalmente como óxido de hierro (III) (Fe₂O₃), magnetita (Fe₃O₄), óxido de hierro (II) (FeO) e hidróxido de hierro (III) (FeOOH) a 710.97, 713.39, 709.99 y 712.16 eV, respectivamente.^{39,40}

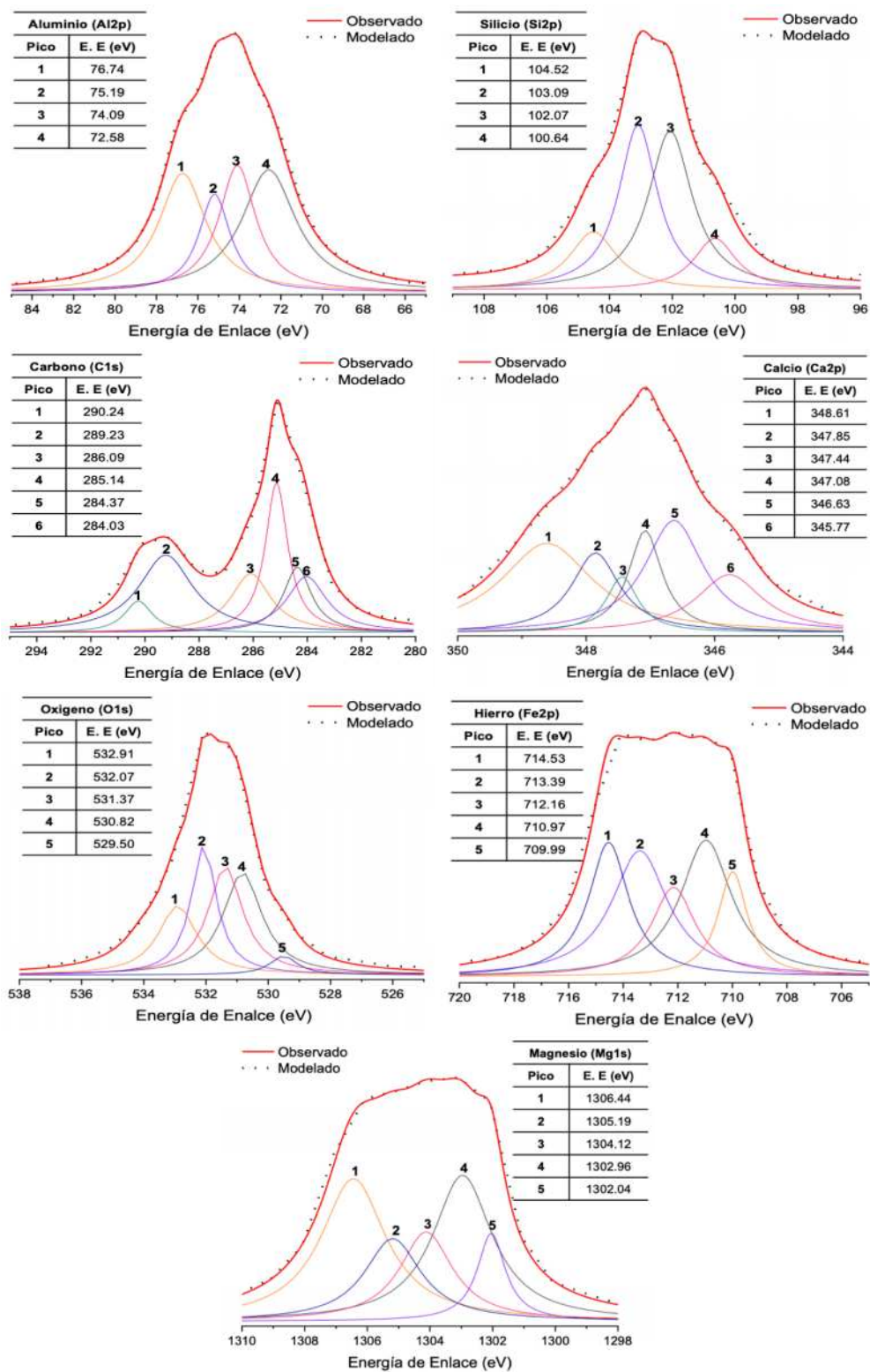


Figura 2-12. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie externa del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

2.4 CONCLUSIONES

Las muestras fueron ópticamente observadas determinando que el cascarón del ootaxon sin identificar presentaba una alta similitud con los cascarones *Spheroolithus* (muestra 1 y 2) de los dinosaurios ornitópodos, al igual que el cascarón de la familia Lambeosaurinae en términos de textura, rugosidad y grosor. Usando técnicas como SEM, se pudo observar que los cascarones presentaban estructuras con diferentes morfologías y tamaños que variaban entre 0.5 y 50 μm . Además, fue posible identificar la ornamentación donde el cascarón del ootaxon no identificado presentaba nodos en la cutícula, característica propia de los cascarones de los dinosaurios ornitópodos. También presentó igualdad en las estructuras de los conos mamilares, siendo cilíndricas y alargadas como las observadas en los cascarones *Spheroolithus*.

Por otro lado, los cascarones de huevos de dinosaurio están compuestos principalmente por calcio (Ca), carbono (C), silicio (Si), y oxígeno (O). Otros elementos como sodio (Na), potasio (K), aluminio (Al), y hierro (Fe), también están presentes en moderadas concentraciones, pero solo a nivel superficial, mientras que trazas de metales como cromo (Cr), cobre (Cu), zinc (Zn), y estroncio (Sr), fueron determinadas internamente. Esta variación en la composición de los cascarones, los cuales solo están compuestos de carbonato de calcio (CaCO_3), y corroborado por XPS, es un indicativo que los cascarones estuvieron sometidos a cambios diagenéticos, a procesos de reemplazamiento y cristalización durante la fosilización.

2.5 ANEXOS

ANEXO 2.1

Análisis elemental de los cascarones de huevo de dinosaurio por EDS

Estudios por medio de análisis por energía dispersiva de rayos-X (EDS) en un microscopio electrónico de barrido fueron llevados a cabo con el fin de determinar la composición elemental de los cascarones de huevo. Las zonas analizadas están marcadas en blanco en las imágenes de SEM, y se llevaron a cabo también en ambas superficies del cascarón de huevo, las cuales indican los elementos presentes en las superficies.

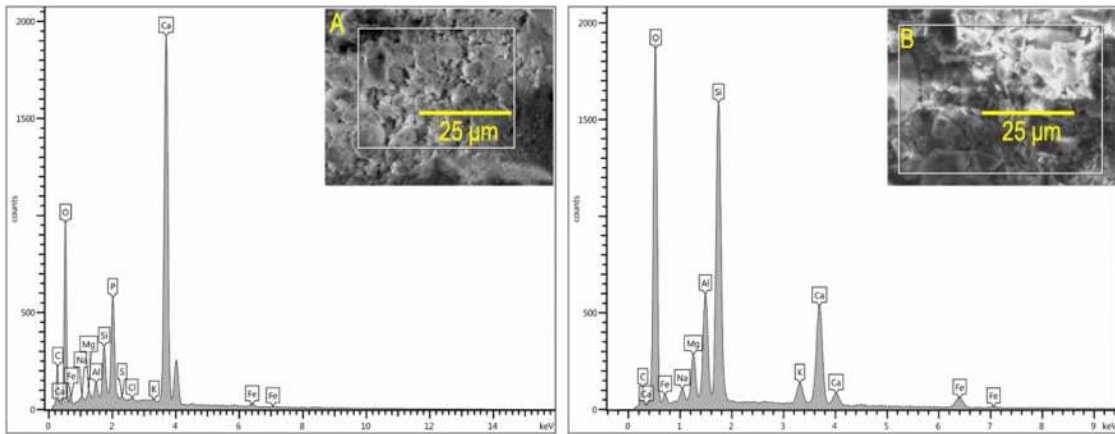


Figura 2-13. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

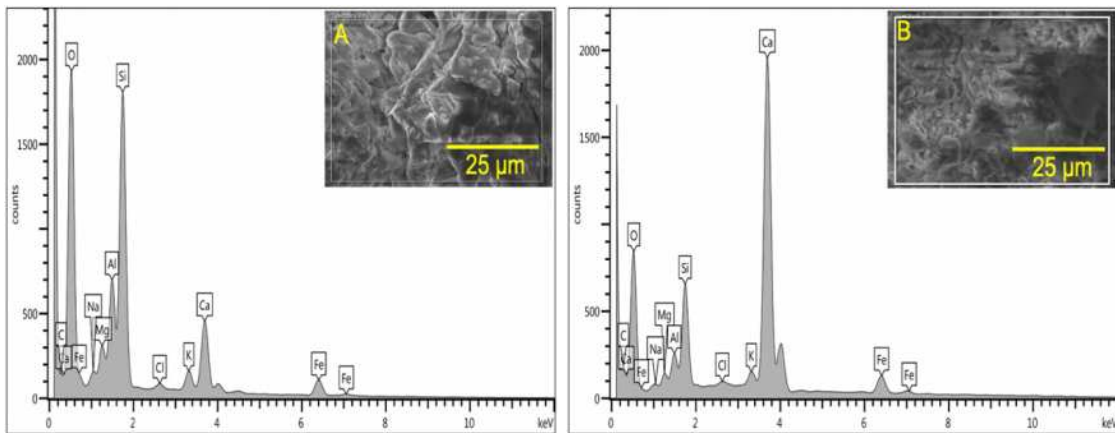


Figura 2-14. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

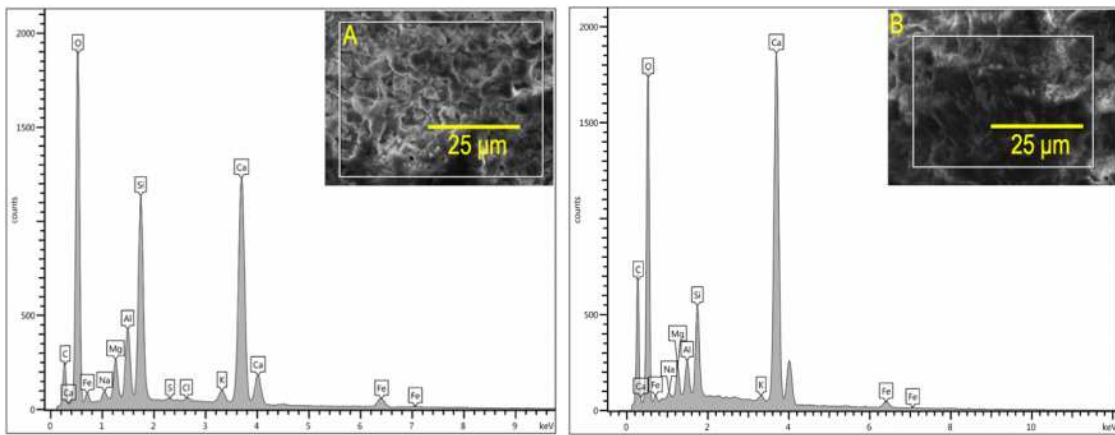


Figura 2-15. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del *Prismatoolithus*. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

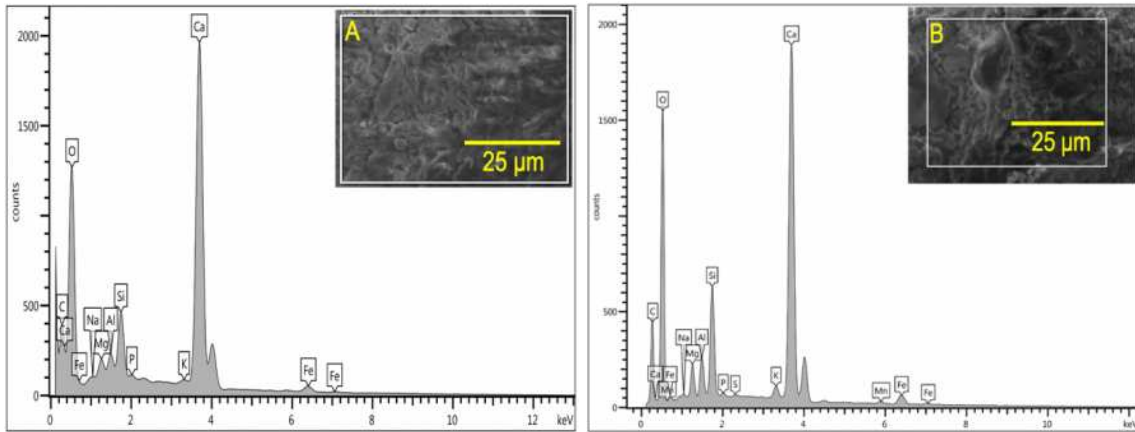


Figura 2-16. Imágenes de SEM-EDS del área delineada en blanco correspondiente al análisis realizado en el cascarón de huevo del ootaxon no identificado. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

ANEXO 2.2

Análisis del mapeo realizado por EDS en cascarones de huevo de dinosaurio

El mapeo fue desarrollado en las zonas marcadas en blanco donde la distribución elemental de ambas superficies de los casarones de huevo se determinó, los cuales están representados por colores.

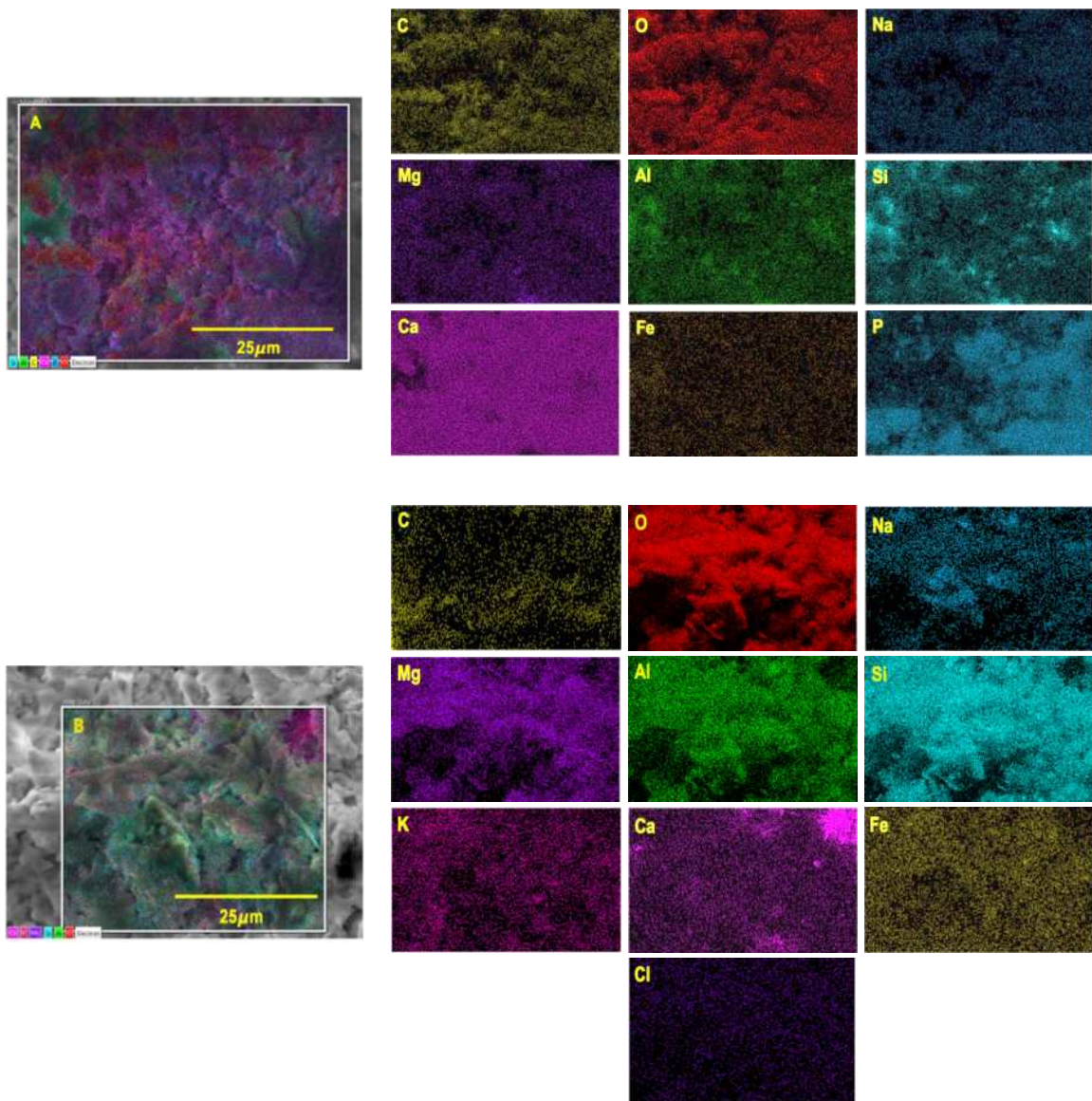


Figura 2-17. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

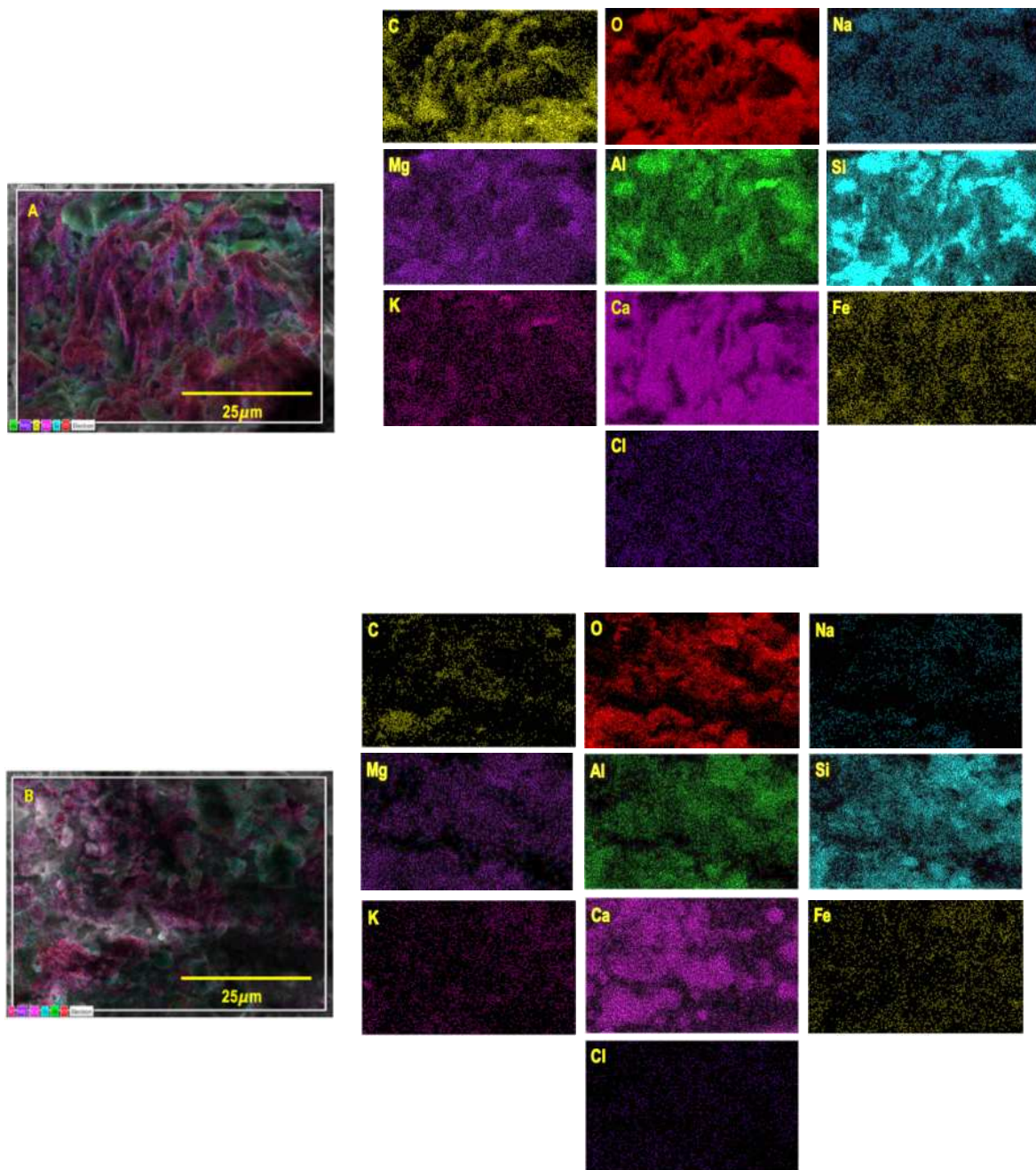


Figura 2-18. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

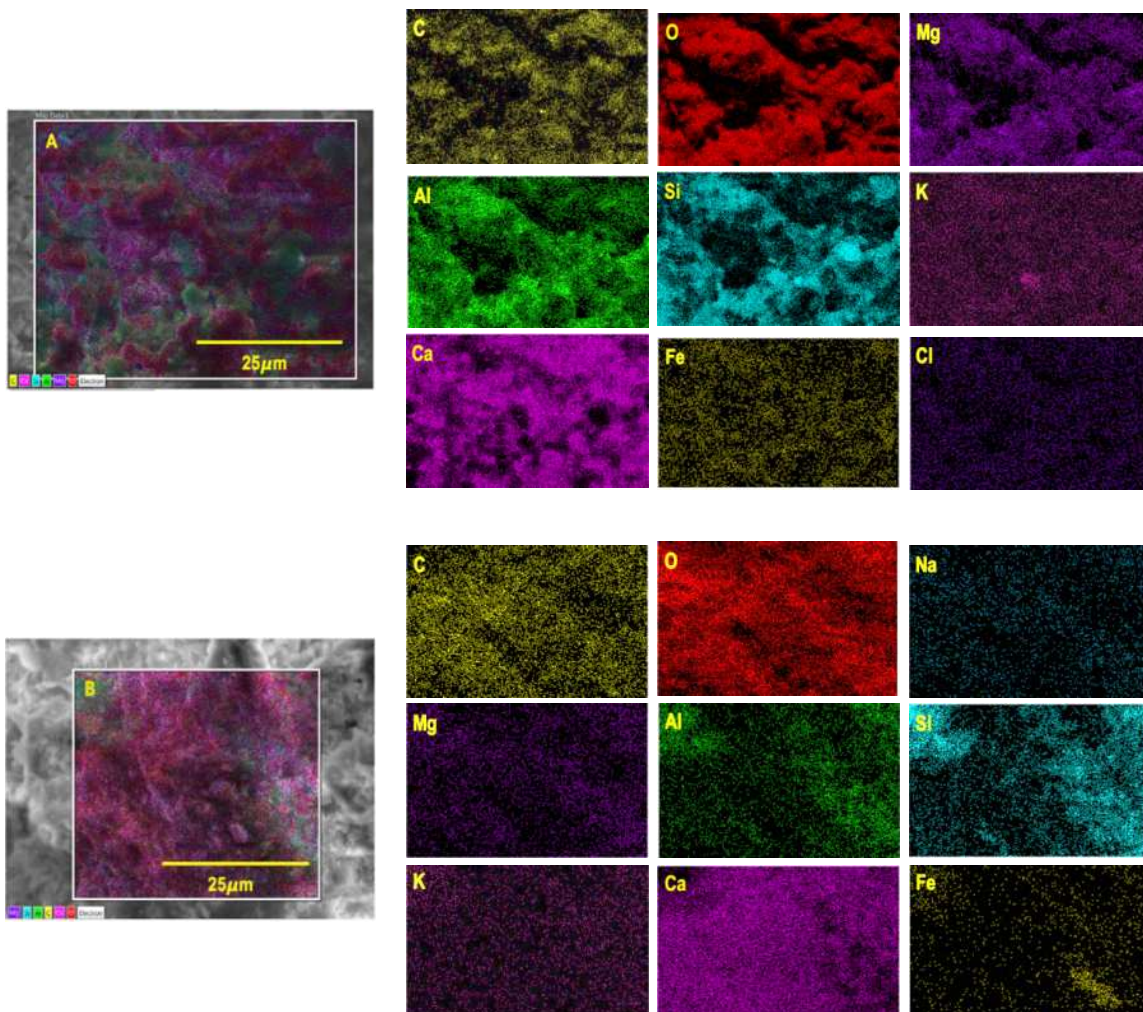


Figura 2-19. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del *Pristatoolithus*. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

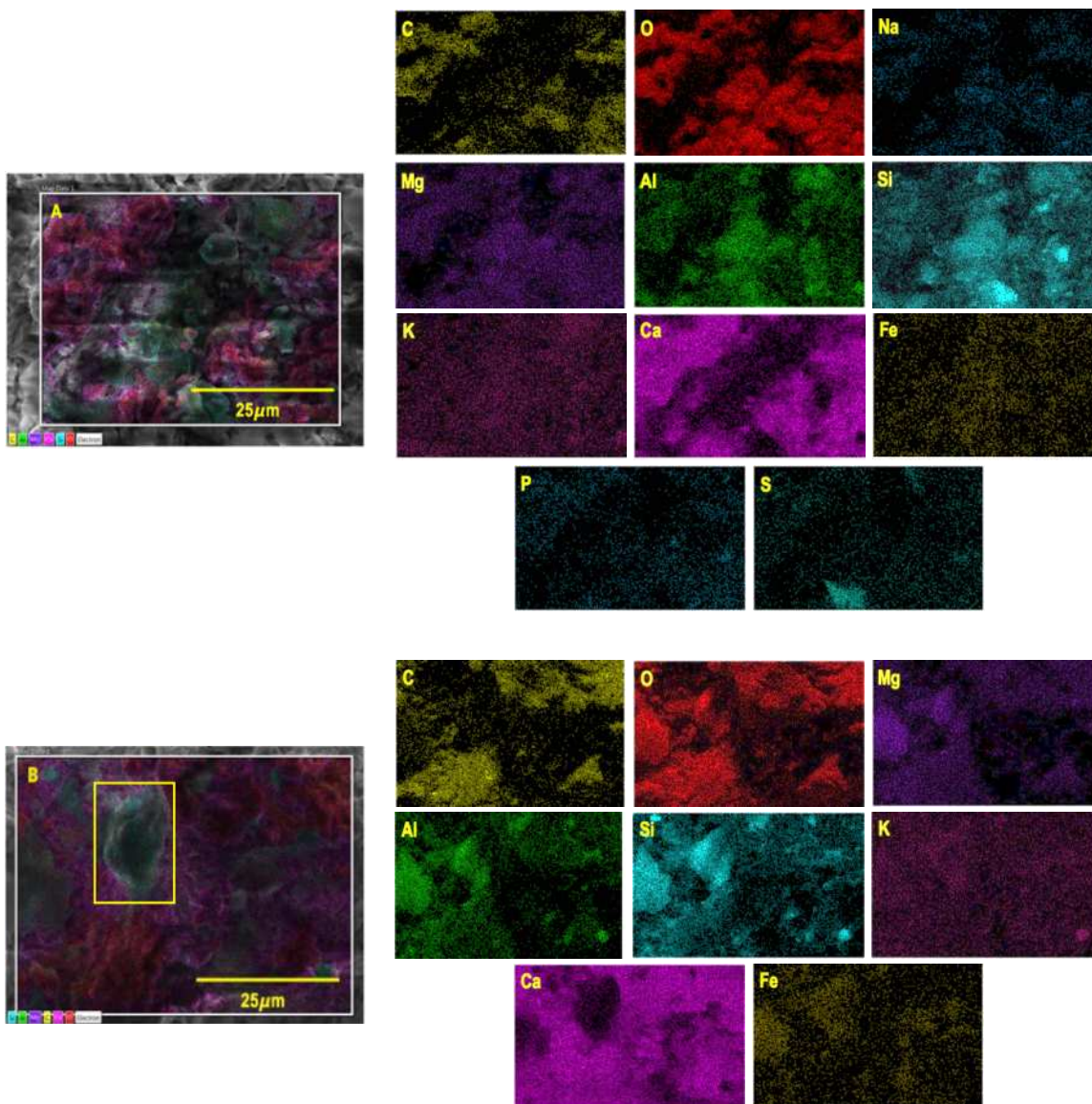


Figura 2-20. Imágenes de la distribución elemental obtenida por EDS (en color) de las superficies del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

ANEXO 2.3

Estados electrónicos de los elementos por XPS

Las energías de enlace fueron determinados para cada estado electrónico de los elementos enlistados en la Tabla 5 y Tabla 6 para los cascarones de huevo de *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus*.

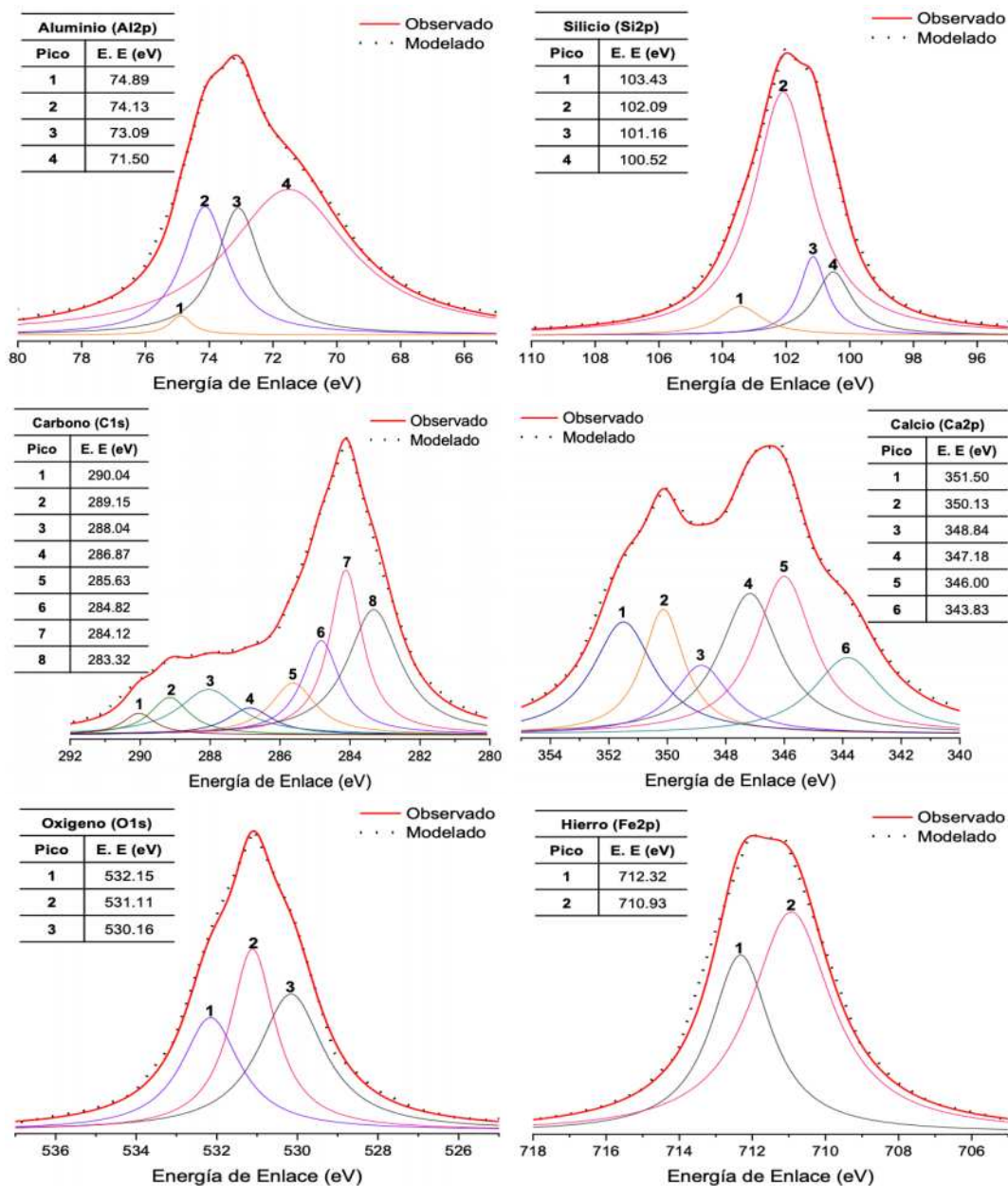


Figura 2-21. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie interna del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 2-6. Energías de enlace de los estados electrónicos de los elementos presentes en el cascaron de huevo del *Prismatoolithus* obtenido por XPS

Superficie Externa		Superficie Interna	
Estado Electrónico	Energía de Enlace (eV)	Estado Electrónico	Energía de Enlace (eV)
O1s	531.98	O1s	532.07
C1s	285.1	C1s	285.2
Si2p	102.86	Si2p	102.97
Ca2p	347.26	Ca2p	347.32
Al2p	74.23	Al2p	74.82
Na1s	1072.21	Na1s	1072.14
Mg1s	1304.09	Mg1s	1303.52

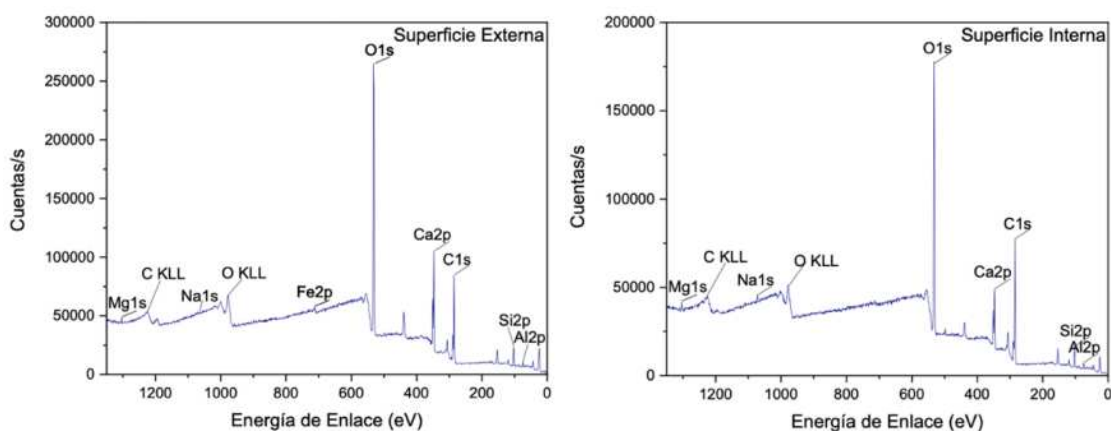


Figura 2-22. Espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X del cascarón de huevo del *Prismatoolithus* de la superficie externa e interna. Los estados electrónicos de algunos elementos presentes en el cascarón corresponden con los observados por EDS y XRF

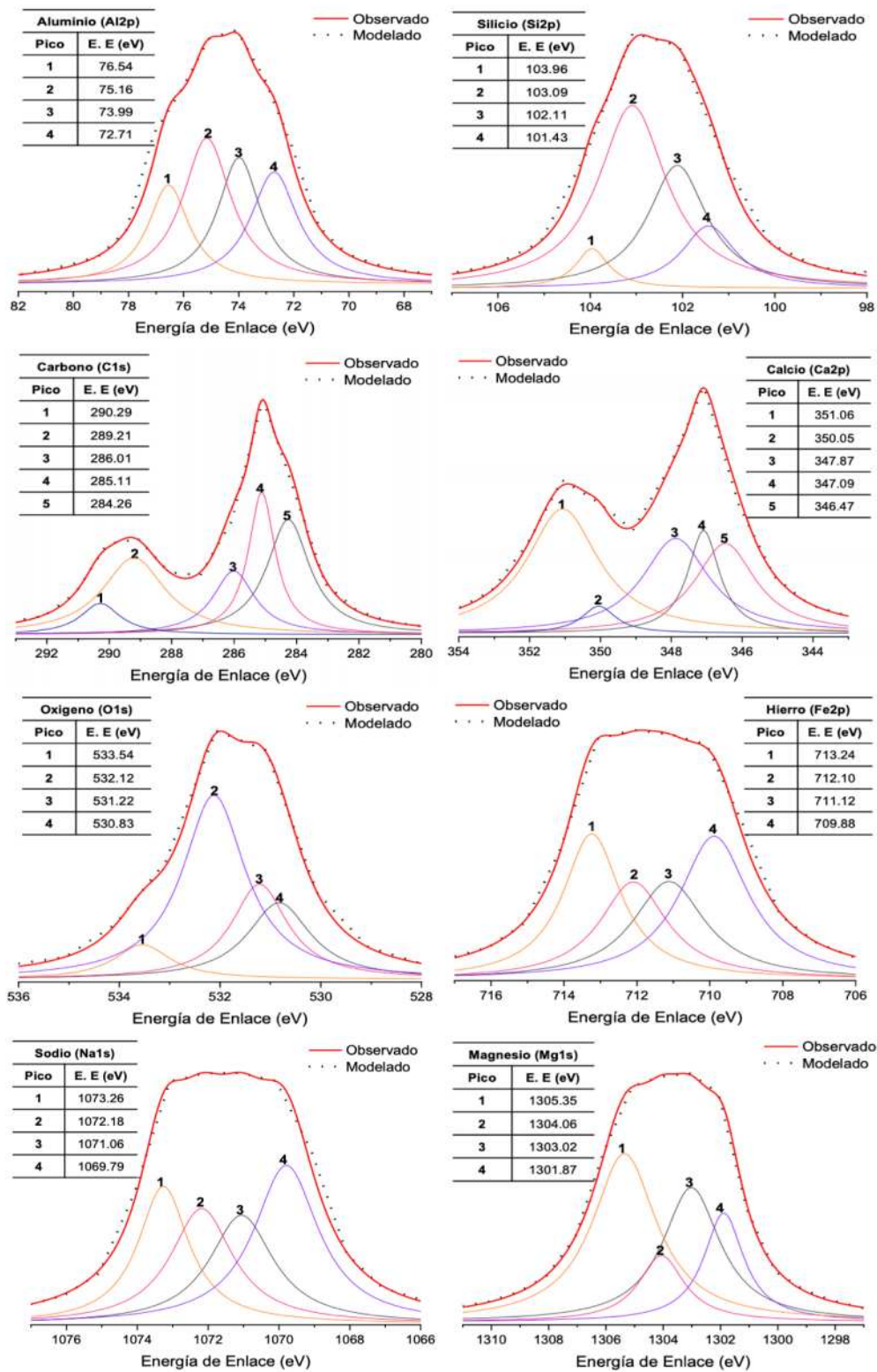


Figura 2-23. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie externa del cascarón de huevo del *Prismatoolithus*. E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

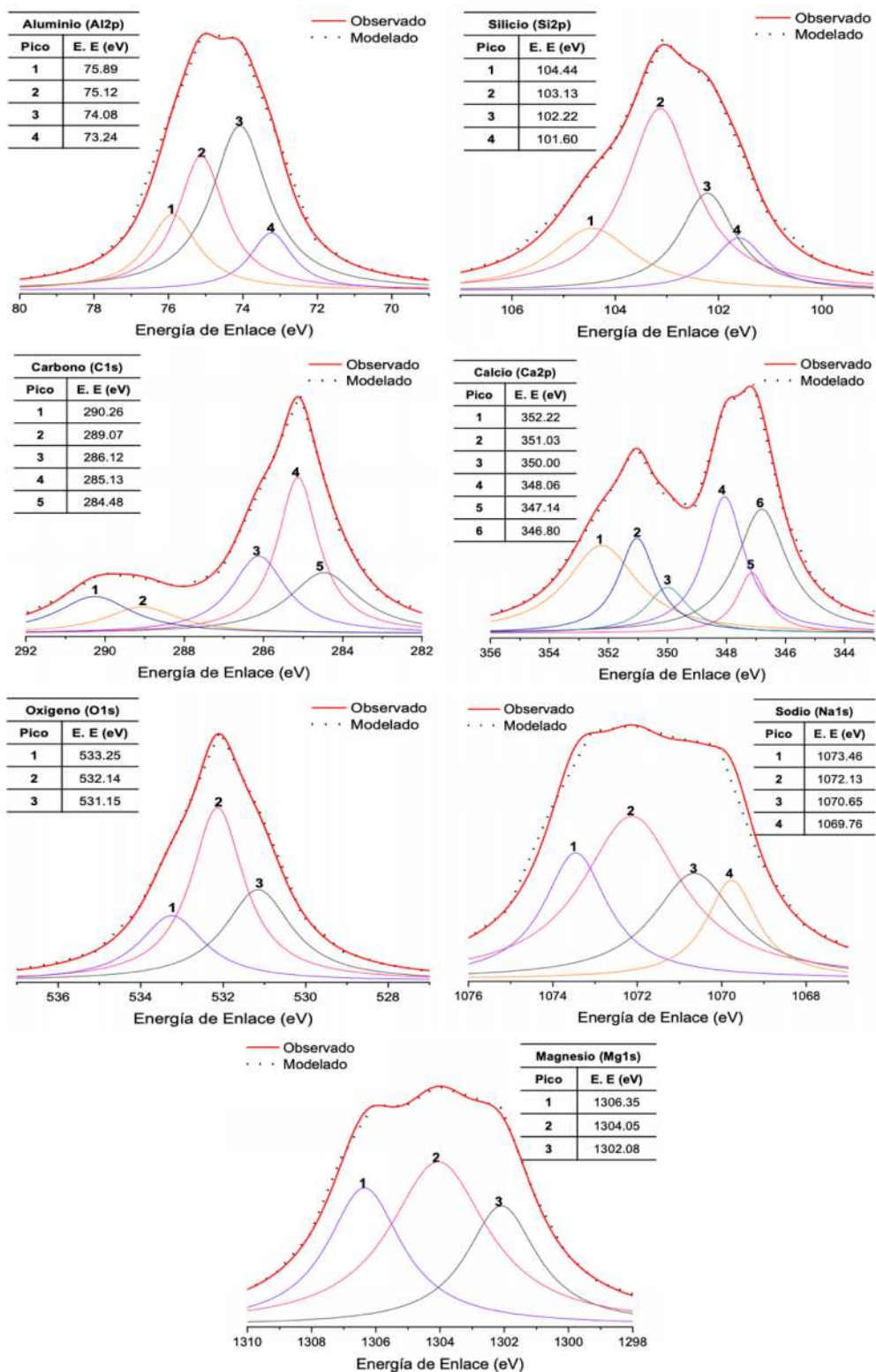


Figura 2-24. Desconvolución de los picos de los estados electrónicos de la superficie interna del cascarón de huevo del *Prismatoolithus*. E.E: Energía de enlace. Las tablas indican las energías de enlace de cada compuesto. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 2-7. Compuestos determinados por la desconvolución de los estados electrónicos de los cascarones de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus*. **E.E:** Energía de enlace; **SE:** Superficie externa; **SI:** Superficie interna; **M⁺:** Metálico

Aluminio (Al 2p)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
72.58	71.50	Al metálico	72.71	73.24	Al metálico
74.09	73.09	Al(OH) ₃	73.99	74.08	Al(OH) ₃
75.19	74.13	Al ₂ SiO ₃	75.16	75.12	Al ₂ SiO ₃
76.74	74.89	Al ₂ O ₃	76.54	75.89	Al ₂ O ₃
Silicio (Si 2p)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
100.64	100.52	Si elemental	101.43	101.60	Si elemental
102.07	101.16	Si 2p _{1/2}	102.11	102.22	Si 2p _{1/2}
103.09	102.09	Si 2p _{3/2}	103.09	103.13	Si 2p _{3/2}
104.52	103.43	SiO ₂	103.96	104.44	SiO ₂
Carbono (C 1s)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
284.03	283.32	C sp ²	284.26	284.48	C-C
284.37	284.12	C-C	285.11	285.13	C sp ³
285.14	284.82	C sp ³	286.01	286.12	C-O-C
286.09	285.63	C-O-C	289.21	289.07	C=O
--	286.87	C-O	290.29	290.26	Carbonatos M ⁺
--	288.04	O-C=O	--	--	--
289.23	289.15	C=O	--	--	--
290.24	290.04	Carbonatos M ⁺	--	--	--
Calcio (Ca 2p)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
345.77	343.83	Ca neutro	346.47	346.80	Ca neutro
346.63	346.00	CaO	--	347.14	CaO
347.08	347.18	Ca 2p _{3/2}	347.09	348.06	Ca 2p _{3/2}
347.44	--	CaSO ₄	347.87	350.00	CaCl ₂
347.85	348.84	CaCl ₂	350.05	351.03	Ca 2p _{1/2}
348.61	350.13	Ca 2p _{1/2}	351.06	352.22	Mg KLL
--	351.50	Mg KLL	--	--	--
Oxígeno (O 1s)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
529.50	--	Óxidos M ⁺	530.83	--	Óxidos M ⁺

530.82	530.16	Óxidos M ⁺	531.22	531.15	Carbonatos M ⁺
531.37	531.11	Carbonatos M ⁺	532.12	532.14	C=O
532.07	532.15	C=O	533.54	533.25	C-O
532.91	--	C-O	--	--	--
Hierro (Fe 2p)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
709.99	--	FeO	709.88	--	FeO
710.97	710.93	Fe ₂ O ₃	711.12	--	Fe ₂ O ₃
712.16	712.32	FeOOH	712.10	--	FeOOH
713.39	--	Fe ₃ O ₄	713.24	--	Fe ₃ O ₄
Sodio (Na 1s)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
--	--	--	1069.79	1069.76	Na ₃ PO ₄
--	--	--	1071.06	1070.65	NaHCO ₃
--	--	--	1072.18	1072.13	Na[AlSi ₃ O ₈]
--	--	--	1073.26	1073.46	NaOH
Magnesio (Mg 1s)					
<i>Spheroolithus</i> muestra 1			<i>Prismatoolithus</i>		
E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto	E. E (eV) - SE	E. E (eV) - SI	Compuesto
1302.04	--	Mg(OH) ₂	1301.87	1302.08	Mg(OH) ₂
1302.96	--	Mg metálico	1303.02	--	Mg metálico
1304.12	--	MgO	1304.06	1304.05	MgO
1305.19	--	MgCO ₃	1305.35	1306.35	MgCO ₃
1306.44	--	Mg(H ₂ PO ₄) ₂	--	--	--

Capítulo 3.

Composición Molecular de Cascarones de Huevo de Aves, Reptiles y Dinosaurios

.....

Elejalde-Cadena, N. R.; Estevez-Espinoza, J. O.; Torres-Costa, V.; Ynsa, M. D.; García-López, G.; Moreno, A. Molecular analysis and examination of posible intramineral proteins of dinosaur eggshells collected in El Rosario, Baja California. *ACS Earth & Space Chemistry*. **2021**, *5*, 1552-1563.

3.1 INTRODUCCIÓN

Caracterizaciones recientes de fósiles de dinosaurios han permitido un avance en la clasificación e identificación de especies que una vez existieron sobre la faz de la tierra hace más de 70 millones de años. Varias especies han sido colectadas en diferentes localidades de México, donde el primer reporte de un hueso de dinosaurio del Cretácico superior fue en 1926 por Janensch.¹ Desde este hallazgo, el interés por descubrir otras especies incremento gradualmente.

Análisis geoquímicos de materiales fosilizados como dientes, huesos y cascarones, se han desarrollado con el fin de determinar las condiciones paleoambientes y los cambios diagenéticos llevados a cabo con el pasar de los años. De huesos fosilizados de dinosaurios colectados en la Formación Morrison en Utah, se ha caracterizado cristales de francolita $(Ca, Mg, Sr, Na)_{10}(PO_4, SO_4, CO_3)Fe_{2-3}$ de tamaño que oscila entre 10-40 nm de ancho, con una elongación en la dirección del eje c. Este alargamiento es observado en cristales que crecieron en las grietas del material durante los procesos diagenéticos, formando estructuras de hasta 250 nm de ancho.²

De los huesos y dientes de dinosaurio, estudios isotópicos y análisis microRaman, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR), fluorescencia de rayos-X (XRF) y difracción de rayos-X (XRD) de la composición química y mineralógica, así como de tamaño de cristalita, han sido desarrollados con el objetivo de identificar los procesos de fosilización y/o precipitación causados por mecanismos biológicos, alteraciones diagenéticas y térmicas, y cambios de la composición química, observados a través de la formación de minerales como apatita, hematita, calcita, cuarzo, entre otros, y su relación con moléculas orgánicas presentes en las muestras.³⁻⁶

Por otro lado, en cascarones de huevo de dinosaurio de Saurópodos, el análisis molecular por FT-IR, XRD and Raman, indican que los cascarones están compuestos únicamente por calcita,⁷ y por carbono ya sea en forma de grafito o amorfa, pero también por compuestos de carbohidratos y sulfatos como la hidroxiapatita,⁸ como lo evidencia cascarones de arcosaurios del Cretácico Tardío colectados en Corea del Sur.^{9,10} Además, otros estudios realizados a cascarones de huevos de otras épocas han demostrado que los cambios diagenéticos no solo afecta a la composición, sino también a la estructura mineralizada, las cuales se evidencian con cráteres formados por reabsorción en las bases de las unidades cristalinas.¹¹

Estos descubrimientos llevan a estudiar la evolución, microambientes, compartimientos, patologías y variación anatómica que podrían haber tenido los dinosaurios. Desafortunadamente, hay pocos informes de hallazgos relacionados con huevos y no hay información sobre estudios de análisis molecular de cascarones de huevo de dinosaurios de las familias Terópodo y

Hadrosauridae colectados en México. Por tanto, el objetivo de este capítulo es mostrar la composición mineral de cascarnes de huevo de diferentes especies de dinosaurios correspondientes al Cretácico Tardío como de las ooespecies *Spheroolithus* muestra 1 y 2, Lambeosaurinae, *Prismatoolithus*, y un ootaxon no identificado, utilizando diferentes técnicas como microRaman, espectroscopia de fluorescencia (FS), y difracción de rayos X (XRD).

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 Identificación de minerales mediante espectroscopia de fotoluminiscencia (FS)

La fluorescencia se determinó mediante un espectrofotómetro CARY Eclipse Fluorescence usando longitudes de onda de excitación de 250 nm y 370 nm con una medición de emisión de 400 a 600 nm. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

3.2.2 Identificación mineralógica mediante espectroscopia Raman (microRaman)

La identificación de los minerales fue realizada utilizando un microscopio Thermo Scientific Micro-Raman usando un láser de longitud de onda de λ : 532 nm, con mediciones entre 3000 a 50 cm^{-1} a una amplificación de 50x. Las mediciones se realizaron en tres zonas diferentes con una potencia de trabajo de 0.1 a 9 mW debido a la fluorescencia intrínseca observada en las muestras.

3.2.3 Caracterización de minerales por difracción de rayos-X (XRD)

La difracción de rayos-X se realizó utilizando un PANanalytical X-ray empyrean diffractometer con una radiación de Cu-K α ($\lambda = 1.5406\text{\AA}$) a 45 KV y 35 mA, con un tamaño y tiempo de paso de 0.0167 μm y 80 segundos. La configuración de ángulo bajo de Bragg-Brentano fue usada con un ángulo de incidencia de 0.5 grados. La identificación de fases se llevó a cabo usando Match Software, luego, el refinamiento Rietveld se desarrolló con Topas Software.

3.2.4 Determinación de las moléculas orgánicas por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)

Las medidas de FTIR se desarrollaron en reflectancia usando oro como referencia con un espectrómetro Cary 630 FTIR Agilent Technologies adjunto a un microscopio SurveyIR Infrared RedWave Technology (USA) con un tamaño de spot de 2 mm. Cada medición se desarrolló con un promedio de 64 escaneos y una resolución de 4 cm^{-1} .

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Determinación de la fluorescencia de moléculas presentes en los cascarones de huevo mediante FS

El proceso de fotoluminiscencia ocurre cuando la luz de suficiente energía incide en un material, donde se absorben los fotones y se genera excitaciones electrónicas. Eventualmente, estas excitaciones se relajan y los electrones salidos regresan al estado fundamental, y cuando ocurre la relajación radiativa, los fotones emitidos se conocen como fotoluminiscencia. Las técnicas de luminiscencia se han utilizado para caracterizar minerales y materiales a diferentes escalas (macro, micro y nano), porque es una técnica simple y no destructiva. Se conoce que una amplia variedad de minerales tiene propiedades luminiscentes, causadas principalmente por dopaje y defectos en la red. Por esta razón, se decidió analizar la fotoluminiscencia para cada una de las muestras en estudio, donde las funciones lorentzianas se ajustaron para identificar las líneas de emisión de los principales minerales presentes en las superficies de cada uno de los cascarones.

3.3.1.1 Fotoluminiscencia en cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo

Se tomaron los datos de fluorescencia de los cascarones de avestruz, emú y cocodrilo (Figura 3-1, Figuras 3-13 y 3-14 del anexo 3.1), y se identificaron las señales correspondientes a la calcita presente en las muestras (Tabla 3-1, Tablas 3-10 y 3-11 del anexo 3.1). Todos los espectros a 250 nm de energía de excitación fueron tomados en un rango de 400 a 520 nm, debido a una saturación del detector provocando un corte en la intensidad de la señal. En estos espectros, las intensidades fueron bajas y oscilan entre 150 y 600 nm, mientras que en los espectros tomados a una energía de excitación de 370nm, entre un rango de 400 a 600 nm, las señales presentaron un comportamiento similar solo que a intensidades mayores que oscilan entre 300 y 1000 nm, lo que permitió la identificación de las señales que no se pudieron observar en los espectros a 250 nm de energía de excitación.

Tabla 3-1. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de avestruz a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. Δ . FWHM

Superficie Externa				Superficie Interna			
λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)		λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)	
λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ
404	15	400	19	404	10	400	19
423	7	422	5	423	7	422	5
443	8	438	6	442	5	461	19
460	4	461	23	460	4	486	8
466	11	504	7	468	7	504	6
488	14	518	7	481	5	519	7
516	10	528	6	490	3	528	5
555	9	542	4	--	--	542	4
573	9	566	34	--	--	573	38
582	4	--	--	--	--	--	--
600	13	--	--	--	--	--	--

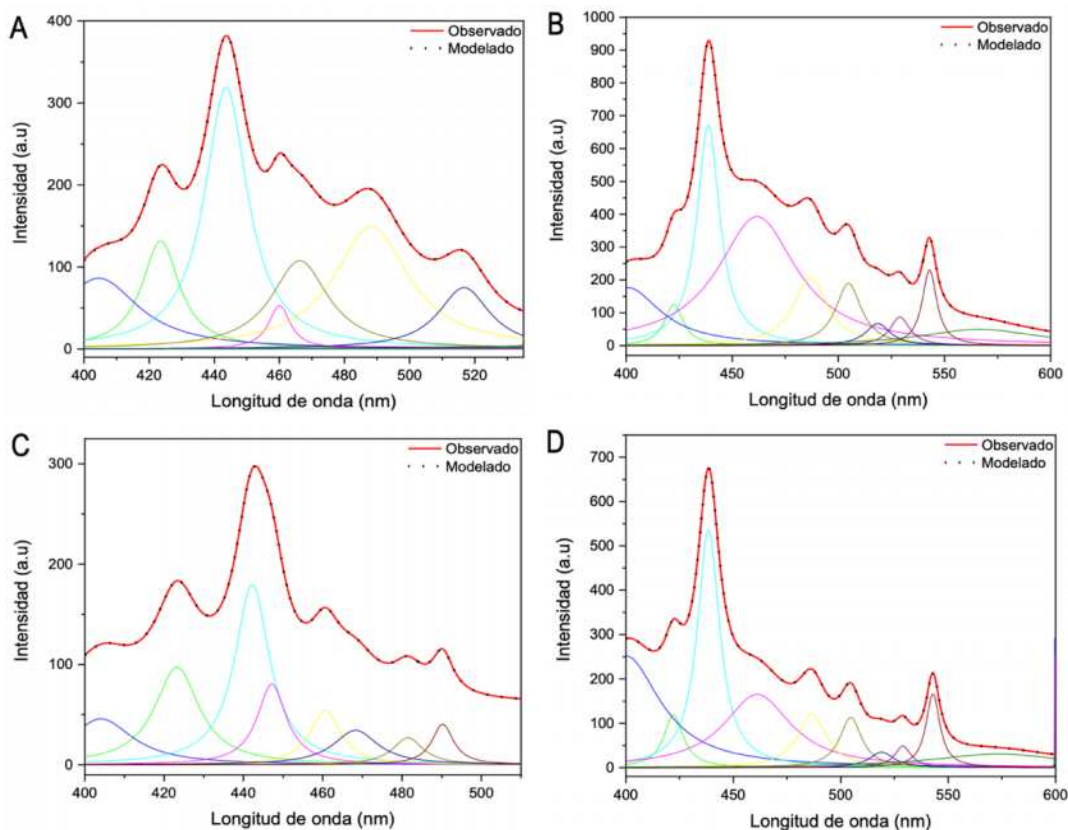


Figura 3-1. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de avestruz en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

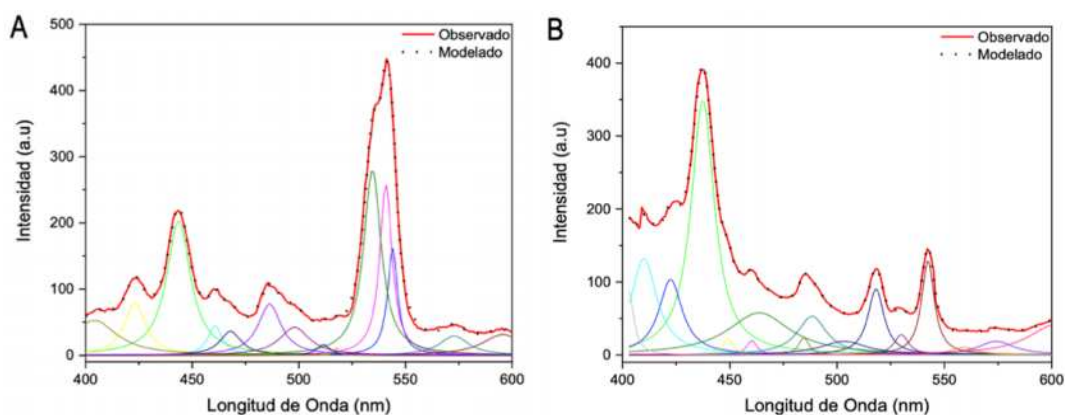
3.3.1.2 Fotoluminiscencia en cascarones de huevo de dinosaurio

Para la determinación de la fotoluminiscencia se consideraron dos longitudes de onda de 250 nm y 370 nm, respectivamente (Tabla 3-2 y Tablas 3-12, 3-13 y 3-14 del anexo 3.1). Las líneas de emisiones encontradas corresponden principalmente a calcita, albita y cuarzo (Figura 3-2 y Figuras 3-15, 3-16 y 3-17 del anexo 3.1). Los datos experimentales fueron comparados con los reportados por Ritcher, et al., y McRae, et al.,^{12,13} donde se obtuvieron datos similares, lo que permitió la identificación del cuarzo (SiO₂) amorfo. Del espectro de fluorescencia tomado a 250 nm de energía de excitación, las intensidades de algunos picos son mayores en comparación con el espectro tomado a 370 nm de energía de excitación, lo que permite la identificación de más señales. Además, se obtuvieron señales que no se identificaron, por lo tanto, se compararon los datos obtenidos con los correspondientes a los cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo, con el fin de identificar las señales restantes, características de la calcita.

Una vez identificado las señales de calcita (Tabla 3-2 y Tablas 3-12, 3-13 y 3-14 del anexo 3.1, [CS-negrilla]) a partir de la fotoluminiscencia de los cascarones de huevo de las especies actuales, quedaron pocos picos sin identificar, debido a la interacción de los compuestos presentes en la muestra con metales, provocando un desplazamiento batocrómico (hacia el rojo) o hipsocrómico (hacia el azul) de las señales, así como la disminución de la intensidad de la fotoluminiscencia. Las señales no identificadas se encuentran a longitudes de onda de 410 nm, 499 nm, 532 nm, 534 nm, 536 nm, 539 nm, y 589 nm, respectivamente.

Tabla 3-2. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. **A.** Albita; **C.** Calcita; **Q.** Cuarzo; **S.** SiO₂; Δ . FWHM; **M.** Estándar; **CS.** Calcio de las especies actuales

Superficie Externa						Superficie Interna					
λ : 250 nm (EE)			λ : 370 nm (EE)			λ : 250 nm (EE)			λ : 370 nm (EE)		
λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
404	13	CS	403	3	CS	405	10	CS	401	16	CS
423	6	CS	410	7	--	423	6	CS	422	5	CS
444	7	Q	422	7	CS	443	7	Q	438	6	Q
461	4	CS	437	7	Q	460	5	CS	448	5	Q
468	6	S	449	3	Q	468	7	S	460	5	CS
486	6	A	460	3	CS	486	5	A	470	7	S
499	8	--	464	18	CS	495	10	CS	486	7	A
511	4	Q	484	3	A	511	5	Q	504	6	CS
517	1	C	488	8	CS	518	2	C	518	6	C
534	5	--	503	13	CS	532	4	--	529	5	CS
541	4	C	518	4	C	536	4	--	543	4	C
544	3	C	530	4	CS	542	4	C	568	15	S
573	8	C	542	3	C	572	8	C	598	19	A
596	11	A	557	7	CS	596	11	A	--	--	--
--	--	--	574	10	C	--	--	--	--	--	--



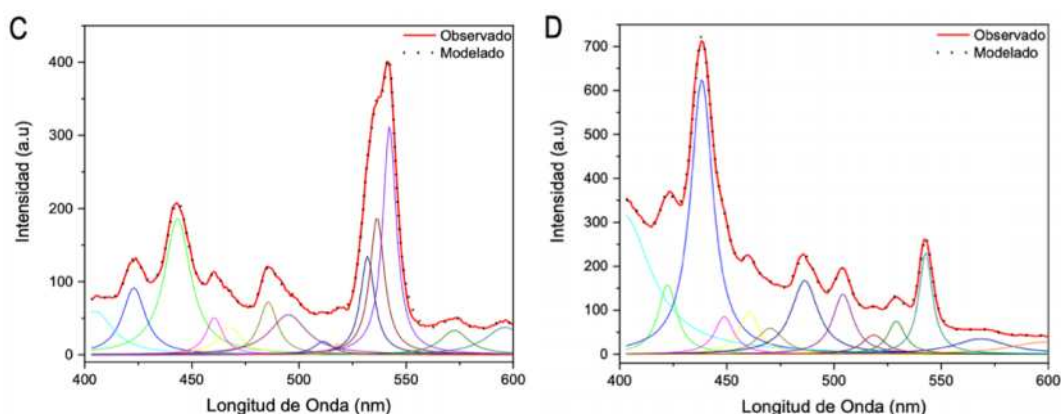


Figura 3-2. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

3.3.2 Identificación molecular en cascarones de huevo de dinosaurio mediante microRaman

La espectroscopia Raman es una técnica no destructiva utilizada para realizar análisis químico proporcionando información acerca de la estructura química, fase y polimorfismo, cristalinidad e interacciones moleculares, mediante la interacción de la luz con los enlaces químicos de los compuestos presentes en la muestra.

La formación de las diferentes estructuras en las superficies internas y externas de los cinco cascarones de huevo de dinosaurio fueron confirmadas por microRaman. Tres diferentes zonas han sido analizadas y denotadas como Bz (zona negra), Rz (zona roja), y Wz (zona blanca) (ver Figura 3-3). La tabla 3-3 muestra los cuatro componentes moleculares que se observaron en la primera muestra correspondiente a la del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1, siendo calcita, cuarzo, albita, dióxido de silicio y anhidrita (Figura 3-4). Otros minerales fueron observados en el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae, como lo es un compuesto fosfatado identificado como hidroxapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) y un óxido de hierro como la hematita (Fe_2O_3) (Figura 3-20 del anexo 3.2).

Los picos a 155 cm^{-1} , 281 cm^{-1} , 712 cm^{-1} , y 1088 cm^{-1} , corresponden a la calcita (CaCO_3). Los picos localizados a 155 cm^{-1} y 281 cm^{-1} están relacionados con la estructura reticular, y los picos en 712 cm^{-1} ($\nu_4\text{-CO}_3$) y 1088 cm^{-1} ($\nu_2\text{-CO}_3$) corresponde al modo de flexión asimétrico y simétrico del grupo CO_3 .^{14,15}

Los cristales de albita ($\text{NaAlSi}_3\text{O}_8$) presentan señales Raman a 171 cm^{-1} y 833 cm^{-1} , asociados con efectos de jaula y modos de deformación tetraédrica. La señal en 480 cm^{-1} se debe a la

expansión de la coordinación del grupo Na y al estiramiento del Na-O_c(O). Algo similar sucede con la señal en 507 cm⁻¹, relacionada con la compresión de los cuatro miembros del anillo tetraédrico y del estiramiento del O-Na-O. Mientras que la señal en 581 cm⁻¹ está asociada con la deformación tetraédrica y del estiramiento del grupo O-Na-O, y la señal en 656 cm⁻¹ es característica de la vibración del anillo tetraédrico de la albita. Otro pico es observado a 297 cm⁻¹ el cual está asociado a la rotación, expansión y contracción del anillo tetraédrico.^{14,16}

El pico del cuarzo en 126 cm⁻¹ es atribuido a los modos reticulares de estiramiento simétrico; 218 cm⁻¹ y 387 cm⁻¹ son generados por modos simétricos; 406 cm⁻¹ y 603 cm⁻¹ están relacionados con vibraciones de enlace de Si-O-Si; 512 cm⁻¹ y 454 cm⁻¹ corresponden a las vibraciones de flexión del enlace de oxígeno del grupo Si-O, y finalmente, la señal a 353 cm⁻¹, está relacionada con la vibración de la celda.^{14,16} Además, señales características de aluminosilicatos fueron observadas. Los picos a 224 cm⁻¹ y 245 cm⁻¹ están atribuidos a silicato de sodio y aluminosilicatos; 410 cm⁻¹ es una vibración fundamental del SiO₂ seco; 555 cm⁻¹ indica una vibración de flexión y estiramiento del grupo Si-O-Si; 581 cm⁻¹ es gracias a los movimientos de balanceo del grupo Si-O⁰ en unidades SiO₂ (Q⁴) completamente polimerizadas; 595 cm⁻¹ es característico de los defectos de bandas y de las redes de silicato.^{14,17}

Las señales a 231 cm⁻¹, 676 cm⁻¹, y 1028 cm⁻¹ están atribuidos a una mezcla de sulfatos de calcio de la anhidrita (CaSO₄) con silicato de sodio, características de las vibraciones de estrés simétricas del grupo SO₄.^{14,15,18} Otros compuestos fueron identificados como hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃(OH)) con señales en 568 cm⁻¹ y 885 cm⁻¹ propias del modo de flexión del grupo PO₄.^{14,19} El pico Raman en 685 cm⁻¹ presente en el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae es posible que corresponda a una señal característica de la hematita (Fe₂O₃), pero es necesario la identificación de otras señales de este mineral para confirmar su presencia.¹⁵ Los desplazamientos Raman de las tres zonas de estudio de los otros cascarones de huevo de dinosaurio se pueden observar en el anexo 3.2.

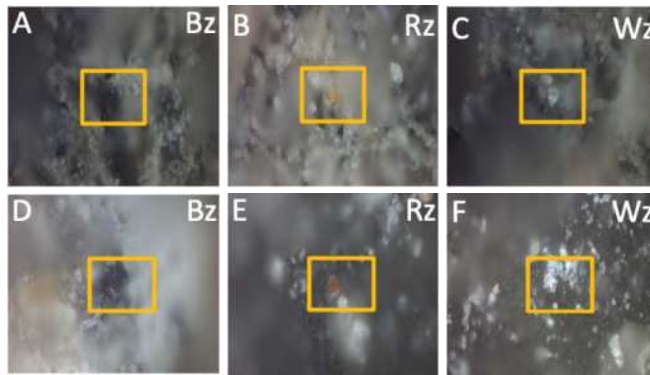


Figura 3-3. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **A-C.** Superficie externa; **D-F.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca

Tabla 3-3. Desplazamiento Raman observado en el cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ρ . Anhidrita.^a

External surface		Inner surface			
θ	ω	θ	ω	ϵ	ρ
155	470	155	833	512	1028
281	--	281	--	--	--
712	--	712	--	--	--
1088	--	1088	--	--	--

^a El desplazamiento está dado en cm^{-1}

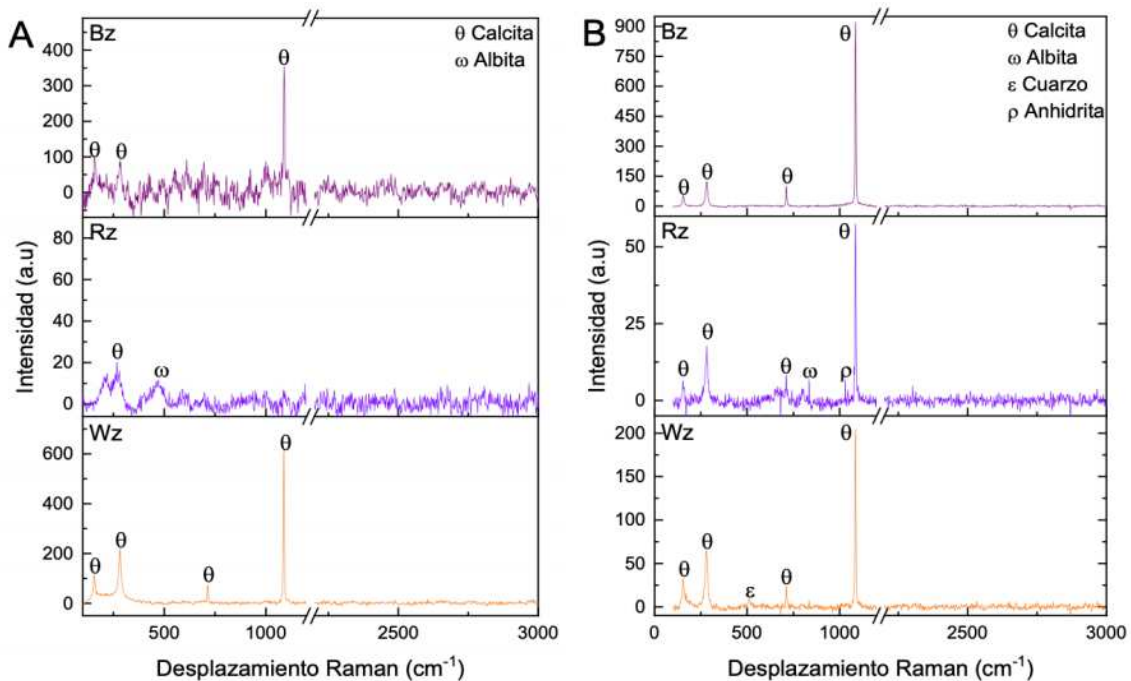


Figura 3-4. Espectros Raman del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 en las tres zonas correspondientes. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca; θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ρ . Anhidrita

Al observar los picos de los minerales obtenidos en los cascarones de huevo del *Spheroolithus muestra 1* (Figura 3-4), estos presentan una mayor intensidad y definición en comparación con los observados en el cascarón de huevo del *Prismatoolithus* (Figura 3-6). Un caso similar ocurre en las intensidades de las señales Raman de las otras muestras en estudio (anexo 3.2). Esta variación en los picos Raman se debe a varios factores como el tamaño de la red cristalina de los minerales presentes en la muestra, es decir, cuanto mayor es el tamaño de los cristalitos, mayor es la intensidad de los picos; impurezas que provocan alteraciones en la dimensión de la celda debido a sustituciones iónicas, así como la baja homogeneidad cristalina y los límites de grano. Estos factores inducen el desplazamiento y disminución de la intensidad de los picos.^{3,20}

Además, las muestras emitieron fluorescencia durante la recopilación de datos, lo que provocó que la intensidad de la señal descendiera drásticamente. Por esta razón, los espectros Raman muestran una ruptura entre 1200-2000 cm^{-1} con el fin de minimizar la interferencia causada por la fluorescencia que presentan los minerales determinados al variar la potencia de trabajo. Por esta razón, se utilizó otra longitud de onda de excitación en el infrarrojo cercano, dando resultados desfavorables debido a un aumento en la señal de fluorescencia generada, proporcionando mejores resultados en la longitud de onda de excitación de 532 nm.

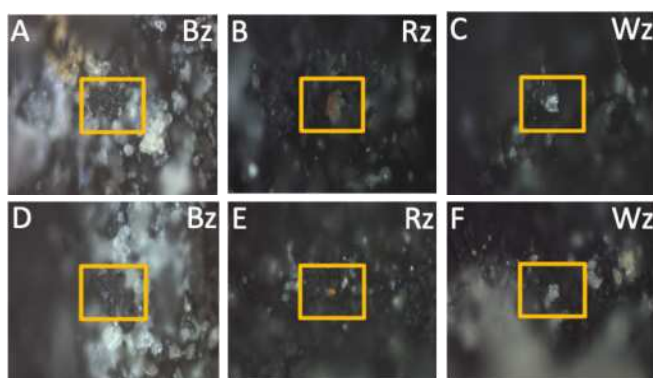


Figura 3-5. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del *Prismatoolithus*. **A-C.** Superficie externa; **D-F.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca

Tabla 3-4. Desplazamiento Raman observado en el cascarón de huevo del *Prismatoolithus*. θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ρ . Anhidrita; ψ . SiO_2 .^a

External surface					Inner surface	
θ	ω	ϵ	ψ	ρ	θ	ϵ
155	833	126	595	231	155	218
281	--	406	--	676	281	406
1088	--	--	--	1028	712	454
--	--	--	--	--	1088	--

^a El desplazamiento está dado en cm^{-1}

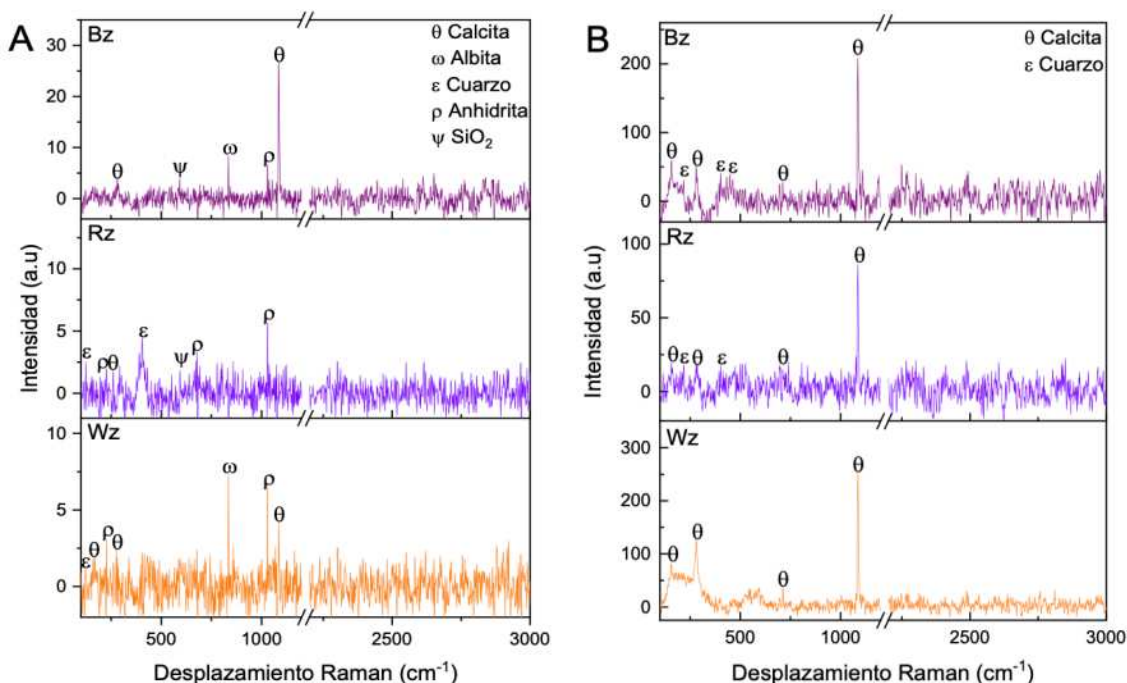


Figura 3-6. Espectros Raman del cascarón de huevo del *Prismatoolithus* en las tres zonas correspondientes. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca; **θ.** Calcita; **ω.** Albite; **ε.** Cuarzo; **ρ.** Anhidrita; **ψ.** SiO₂

3.3.3 Determinación de las fases usando XRD

La difracción de rayos-X es una técnica utilizada para determinar la estructura atómica y molecular, mediante la irradiación de la muestra con rayos-X incidentes, lo que permite la medición de intensidades y ángulos de dispersión de los rayos-X dispersados. Esta técnica permite obtener datos más ciertos de la composición molecular y el tipo de cristalita presente en las muestras.

De acuerdo con los resultados anteriores, se identificó que los cascarones de especies actuales como avestruz, emú y cocodrilo contienen únicamente calcita (CaCO₃), mientras que los cascarones correspondientes a los dinosaurios presenta una composición de calcita (CaCO₃) albite (NaAlSi₃O₈), cuarzo (SiO₂), anhidrita (CaSO₄), hidroxiapatita (Ca₅(PO₄)₃(OH)) y hematita (Fe₂O₃), y para corroborar los resultados, la difracción de rayos-X fue llevada a cabo en todos los cascarones de huevo de dinosaurio, identificando las fases de los minerales determinados, así como el tamaño de cristalita y el porcentaje de concentración. Todos los difractogramas se tomaron desde 2θ = 20, ya que debajo de este ángulo no se conserva ningún plano característico de algún mineral de interés.

El tamaño de cristalita fue determinado usando la ecuación de Scherrer (Ecuación 3-1), donde t es el grosor del cristal en Å, λ corresponde la longitud de onda del rayos-x, θ al ángulo de Bragg y B el ancho del pico usando la fórmula de Warren (Ecuación 3-2), donde B_M es el ancho del pico a la altura promedio del pico en radianes y B_S es el ancho del pico del material estandar.²¹

$$t = \frac{0.9 \lambda}{B \cos \theta_B} \quad (1)$$

$$B^2 = B_M^2 - B_S^2 \quad (2)$$

3.3.3.1 Difracción de rayos-X en cascarones de huevo dinosaurio

En los difractogramas obtenidos a partir de los cascarones de dinosaurios (Figura 3-7 y anexo 3.3), se observó la presencia de compuestos amorfos que provocan una distorsión en la señal, formando una Gaussiana de baja intensidad, así como la presencia de compuestos no cristalinos como metales: hierro (Fe), aluminio (Al), u óxido de silicio (SiO₂), elementos determinados en los cascarones, y que están presentes naturalmente en la tierra.²²

La calcita es el mineral que se encuentra en mayor proporción y en pequeños cristales, seguido de la albita en términos de tamaño de cristalita y se encuentra en baja proporción. Caso contrario se observa en el cuarzo, el cual se encuentra al igual que la albita, en baja proporción pero presenta cristalitas de gran tamaño (Tabla 3-5 y anexo 3.3). Para el caso de la anhidrita, de compuestos fosfatado y óxidos de hierro, no se logró observar fase característica de estos minerales.

Tabla 3-5. Tamaño y concentración de cristalita presente en los cascarones de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus*

Oogénero	Cristalita	Superficie externa		Superficie interna	
		Tamaño (Å)	Concentración (%)	Tamaño (Å)	Concentración (%)
<i>Spheroolithus</i> muestra 1	Calcita	248.2	1.90	611.1	2.21
<i>Prismatoolithus</i>	Calcita	226.9	0.94	496.3	2.44
	Albita	--	--	611.1	1.11

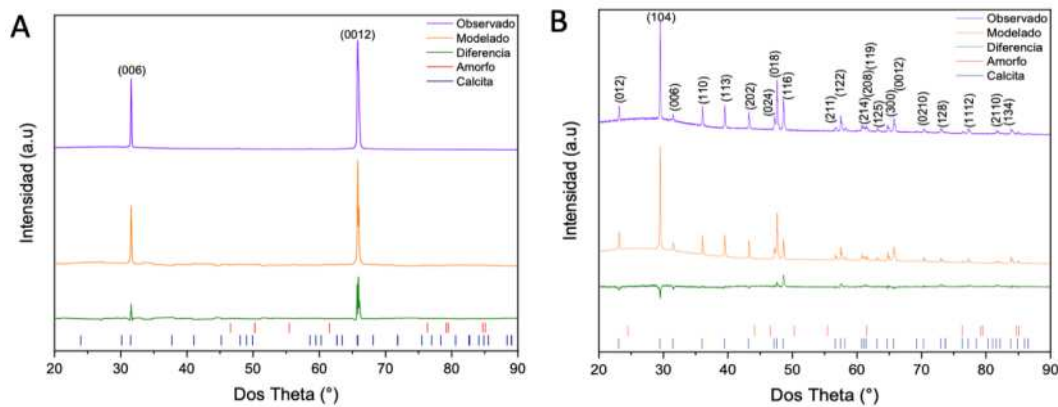


Figura 3-7. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

Al observar los cromatogramas de los cascarones de huevo de dinosaurio bajo estudio (anexo 3.3), los planos cristalográficos obtenidos corresponden a los planos cristalográficos de la calcita principalmente (tabla 3-6),²³ con un grupo espacial R-3c, y parámetros de celda unitaria (hexagonal): $a = b = 4.986 \text{ \AA}$, $c = 17.049 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ para todas las muestras, así como los planos d_{hkl} correspondientes al cuarzo [d_{100} , d_{101} , d_{200} , d_{202} , y d_{211}] con un grupo espacial $P3_221$ asignados a una celda unitaria hexagonal con $a = b = 4.914 \text{ \AA}$, $c = 5.394 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. Todo lo contrario, sucede con la albita, donde tres planos [d_{030} , d_{220} , y d_{040}] fueron determinados con un sistema cristalino triclinico (P-1) y parámetros de celda de $a = 8.139 \text{ \AA}$, $b = 12.798 \text{ \AA}$, $c = 7.136 \text{ \AA}$, $\alpha = 44.2^\circ$, $\beta = 116.6^\circ$, $\gamma = 87.7^\circ$. Los planos [d_{20-2} , d_{2-20} , y d_{1010}] no fueron identificados. Para el caso del cascarón de huevo de *Prismatoolithus* (Figura 3-8), se observa cristalitas de albita, pero únicamente en la superficie interna con un tamaño de cristalita mayor que el de la calcita (Tabla 3-5), lo que permitió la caracterización de la fase correspondiente a este mineral.

Tabla 3-6. Datos cristalográficos teóricos y experimentales de la calcita

2θ	hkl	2θ	hkl	2θ	hkl	2θ	hkl	2θ	hkl	2θ	hkl
23.1	(0 1 2)	39.5	(1 1 3)	48.6	(1 1 6)	61.1	(2 0 8)	65.7	(0 0 12)	77.3	(1 1 12)
29.5	(1 0 4)	43.2	(2 0 2)	56.7	(2 1 1)	61.5	(1 1 9)	69.3	(2 1 7)	81.6	(2 1 10)
31.5	(0 0 6)	47.2	(0 2 4)	57.5	(1 2 2)	63.1	(1 2 5)	70.3	(0 2 10)	83.9	(1 3 4)
36.0	(1 1 0)	47.6	(0 1 8)	60.7	(2 1 4)	64.7	(3 0 0)	73.0	(1 2 8)		

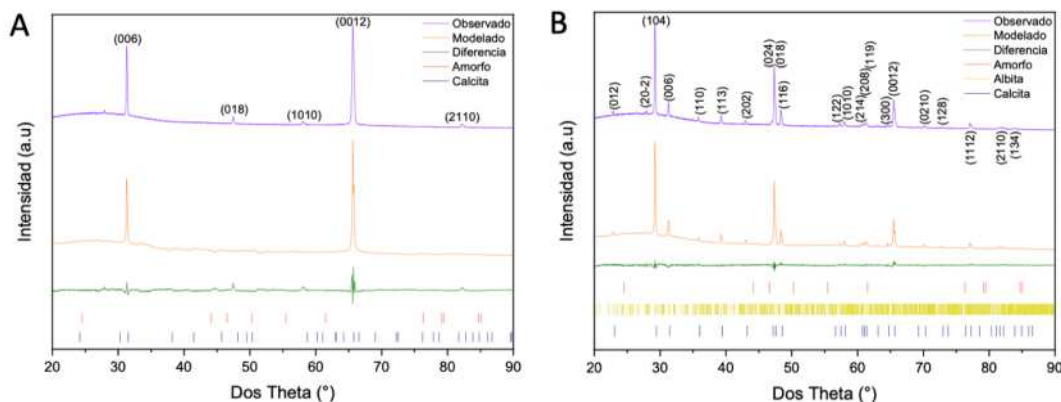


Figura 3-8. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del *Pristatoolithus*. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

A partir de los difractogramas obtenidos, fue posible ajustar todas las fases con su orientación adecuada. Los cristales de la parte interna, donde comienza el proceso de cristalización y formación del cascarón de huevo, se realiza con crecimiento policristalino con orientación no fija. Por tanto, la calcita presentó una orientación preferencial en la cara externa del cascarón de huevo en los planos $[d_{006}, d_{0012}, d_{018}, d_{1010}, d_{2110}, \text{ y } d_{104}]$, indicando que el crecimiento cristalino de la empalizada mineral se realiza de manera ordenada. Los planos d_{018} y d_{104} son característicos de la formación de cristales gemelos romboédricos de calcita,^{24,25} mientras que las orientaciones preferenciales no identificadas como cristales gemelos, probablemente se deba a los cambios diagenéticos que han sufrido los cascarones de huevo a lo largo de los años, así como la presencia de biomacromoléculas como las proteínas intraminerales responsables del proceso de formación del cascarón de huevo.

3.3.3.2 Difracción de rayos-X en cascarones de huevo avestruz, emú y cocodrilo

Los difractogramas obtenidos a partir de los cascarones de especies actuales como avestruz (Figura 3-9), emú (Figura 3-10) y cocodrilo (Figura 3-11), no se observa la presencia de compuestos amorfos como se observa en los difractogramas de los cascarones de dinosaurio (curva gaussiana) debido a la presencia de metales o compuestos amorfos. Además, la orientación preferencial es observada en la superficie externa del cascarón de huevo de las tres especies (avestruz, emú y cocodrilo), lo cual, está acorde de acuerdo con el crecimiento cristalino de las fases del cascarón, ya que, en la fase interna, al ser el sitio de nucleación, el crecimiento de los cristales con diferentes orientaciones es favorecido, así como el crecimiento arreglado de la última fase del cascarón, que corresponde a la palizada mineral. Asimismo, del estudio realizado en el capítulo 2, se evidenció que los cascarones de las especies actuales solo estaban formados por calcita (CaCO_3), lo que se confirmó con la difracción de rayos-X, obteniendo un

tamaño de cristalita entre 467.1 a 567.3 Å para la superficie externa y entre 441.1 a 467.1 Å para superficie interna (Tabla 3-7). No obstante, el bajo porcentaje de calcita es un indicativo que hay presencia de cristales amorfos provenientes de la calcita.

Tabla 3-7. Tamaño y concentración de cristalita presente en los cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo

Especie	Cristalita	Superficie externa		Superficie interna	
		Tamaño (Å)	Concentración (%)	Tamaño (Å)	Concentración (%)
Avestruz	Calcita	441.1	5.37	467.1	100
Emú	Calcita	567.3	10.45	467.2	13.49
Cocodrilo	Calcita	441.1	3.06	567.3	6.09

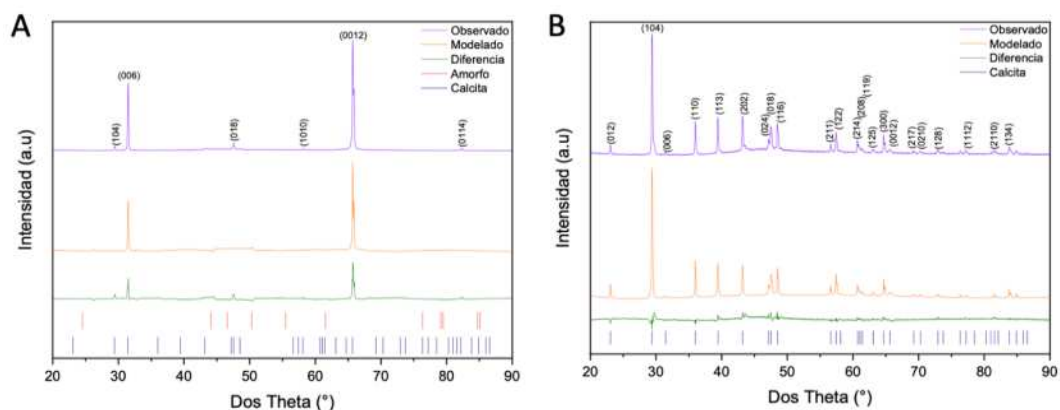


Figura 3-9. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de avestruz. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

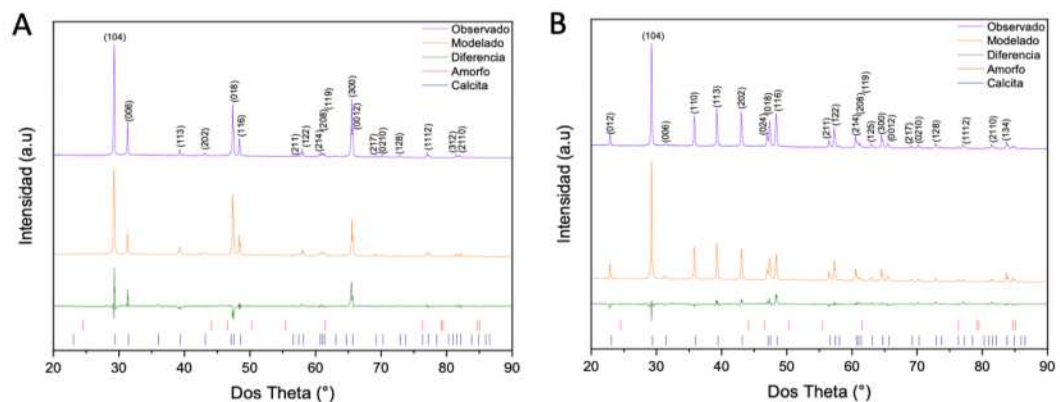


Figura 3-10. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de emú. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

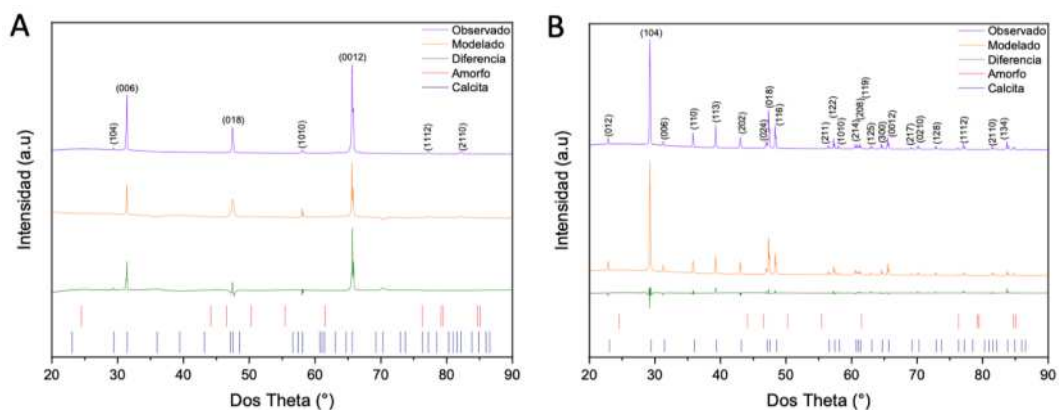


Figura 3-11. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de cocodrilo. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

3.3.4 Caracterización de moléculas orgánicas utilizando FT-IR

Una vez identificados los minerales presentes en las muestras fosilizadas y considerando que la biomineralización está mediada por biomacromoléculas, se realizó FT-IR con el propósito de obtener información sobre la estructura primaria y secundaria de las posibles proteínas presentes en los cascarones de huevo de dinosaurio.

Las proteínas tienen principalmente un grupo de péptidos en su estructura química, que pueden identificarse con sus propias vibraciones divididas en nueve grupos de amidas: A, B, y del I-VII. La banda de amida A se observa con un número de onda de $\sim 3500-3200\text{ cm}^{-1}$ y se caracteriza por presentar vibraciones de enlaces de hidrógeno con longitudes de 2.69 to 2.85 Å, mientras que la amida B ($\sim 3200-3100\text{ cm}^{-1}$) por vibraciones del estiramiento (st) del NH. De las amidas I-VII, las más características son las amidas I-III, que dan información sobre las vibraciones de los aminoácidos y el tipo de estructura secundaria presente en las proteínas. La amida I ($\sim 1730-1580\text{ cm}^{-1}$) se destaca por tener una alta absorción y se centra en las vibraciones de los grupos $-C=O$ y $-C-N$ de la cadena principal. La amida II ($\sim 1580-1450\text{ cm}^{-1}$) es típica de vibraciones de flexión (bd) en el plano del grupo $-NH$ y de las vibraciones de estiramiento de los grupos $-CN$ y $-CC$, mientras que la amida III ($\sim 1450-1200\text{ cm}^{-1}$) depende principalmente de los enlaces de hidrógeno, siendo el grupo más complejo para su identificación. Los grupos de amida IV-VII son incluso más complejos que la amida III con números de onda de $\sim 767-625\text{ cm}^{-1}$, $\sim 800-640\text{ cm}^{-1}$, $\sim 606-537\text{ cm}^{-1}$, y $\sim 200\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, y proporcionan información sobre la torsión de la cadena principal y sobre las vibraciones de flexión de los grupos $-OCN$, $-NH$, y $-C=O$ fuera del plano.^{26,27} Las partes de la estructura secundaria se pueden observar con bandas anchas con un número de onda de $\sim 1637-1629\text{ cm}^{-1}$, y $\sim 1696-1685\text{ cm}^{-1}$ para hojas- β ; $\sim 1652\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1548\text{ cm}^{-1}$ para α -hélices; y los giros presentan números de onda cercanos a $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$.^{28,29}

De acuerdo con dicha información, las muestras fueron analizadas por ambas superficies en las zonas correspondientes a amida I ($\sim 1730\text{-}1580\text{ cm}^{-1}$), II ($\sim 1580\text{-}1450\text{ cm}^{-1}$) y III ($\sim 1450\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$), con el fin de obtener información acerca de la posible presencia de proteínas intraminerales presentes dentro de las estructuras mineralizadas de los cascarones de huevos fosilizados. Estos resultados son importantes ya que nos pueden brindar información acerca de las proteínas ancestrales, que, hasta la fecha, no han sido identificadas y/o caracterizadas. Por lo tanto, los datos de la Tabla 3-8 y los espectros de la Figura 3-12 corresponden a los cascarones de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus* (los datos de las otras especies se encuentran en el anexo 3.4). Los aminoácidos que se identificaron fueron el ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), arginina (Arg), lisina (Lys), asparagina (Asn), glutamina (Gln), tirosina (Tyr), histidina (His), y fenilalanina (Phe), así como los giros, hojas- β , α -hélices, y las señales de desorden estructural.^{30,31}

Tabla 3-8. Desconvolución del espectro de FT-IR y asignación de las vibraciones correspondientes a los aminoácidos de la cadena lateral (AA) así como de la estructura secundaria (ES) de las proteínas intraminerales presentes en la superficie externa (e) e interna (i) de los cascarones de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus*. ν_0 : Número de onda; **st**: estiramiento; **bd**: flexión; **s**: simétrico; **as**: asimétrico

AA/ES	<i>Spheroolithus</i> muestra 1		<i>Prismatoolithus</i>		Tipo de Vibración
	$\nu_{0(e)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(i)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(e)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(i)}$ (cm ⁻¹)	
Asp	1574	1574	1568	1570	-COO ⁻ st as
	1716	1714	1717	--	-COOH st
Glu	1560	1569	1559	1560	-COO ⁻ st as
	--	--	--	1713	-COOH st
Arg	1674	--	--	--	-CN ₃ H ₅ ⁺ st as
	1633	--	1633	1633	-CN ₃ H ₅ ⁺ st s
Lys	--	1631	--	1626	-NH ₃ ⁺ bd as
	1530	1526	1525	1526	-NH ₃ ⁺ bd s
	1515	1514	--	1514	-NH ₃ ⁺ bd s
Asn	1682	1681	1683	1679	-C=O st
	--	--	1619	1622	-NH ₂ bd
Gln	--	--	1672	1671	-C=O st
	--	--	--	1613	-NH ₂ bd
Tyr	1522	1520	1517	1521	Anillo-OH
	1605	--	1601	1601	Anillo-O ⁻
	1498	1498	1498	1497	Anillo-O ⁻
His	--	--	--	--	Anillo
Phe	1489	1490	1489	1489	Anillo
Giros	--	1693	1696	1694	--
	--	1668	--	--	--
	1663	1661	1664	1665	--
α -hélice	1701	1705	1702	1703	--
	1652	1652	1651	1657	--
	--	--	--	1648	--
Hojas- β	--	--	--	1684	--
Desorden	--	1644	1643	1641	--

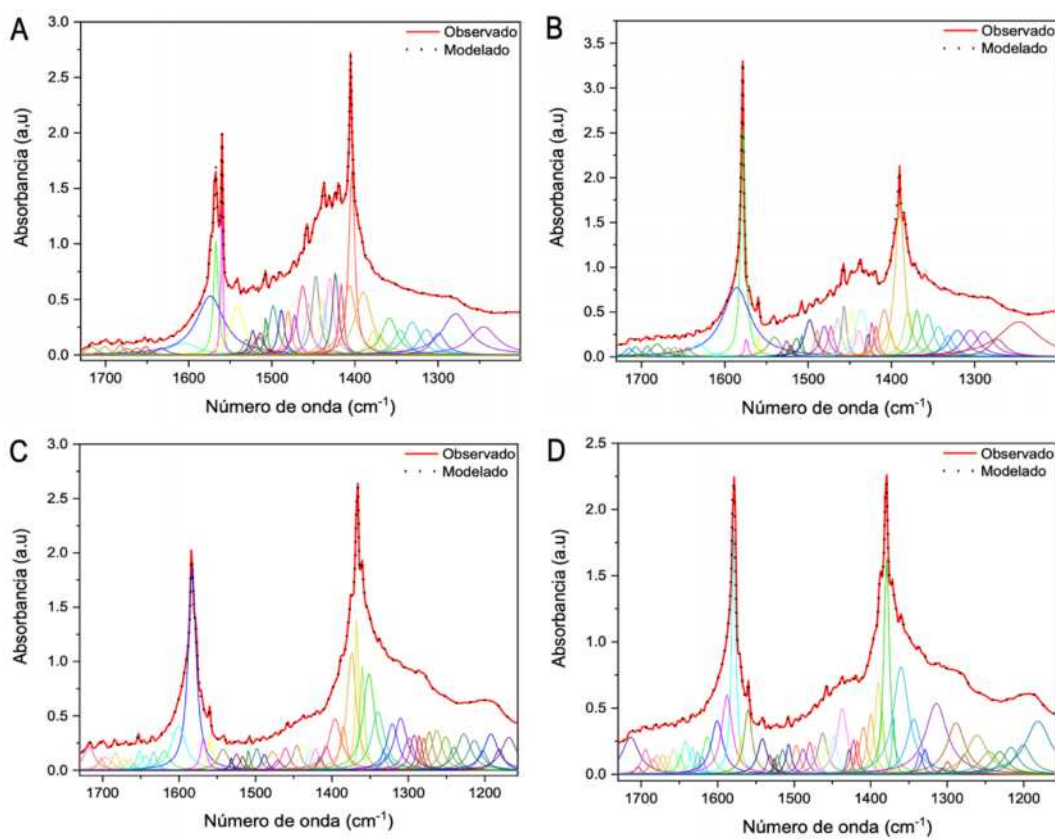


Figura 3-12. Espectros de FT-IR de los cascarones de huevo del *Spheroolithus muestra 1* (A, B) y *Pristatoolithus* (C, D) de ambas superficies. A, B. Superficie externa; B, D. Superficie interna. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

De la Asp fue posible identificar la vibración de estiramiento asimétrica del $-\text{COO}^-$ a $1575\text{-}1568\text{ cm}^{-1}$ en todas las muestras, así como el Glu a $1564\text{-}1557\text{ cm}^{-1}$, pero la vibración de estiramiento simétrico del $-\text{COO}^-$ en $1721\text{-}1714\text{ cm}^{-1}$ para Asp, no se observaron en el cascarón de huevo del *Spheroolithus muestra 2*, ni en el ootaxon no identificado (Figura 3-28 del Anexo 3.4). Un caso similar ocurrió con Glu con la vibración de estiramiento simétrico del $-\text{COO}^-$ a $1713\text{-}1709\text{ cm}^{-1}$ la cual no se identificó en el cascarón de huevo del *Spheroolithus muestra 1* (Figura 3-12). En el caso de la Arg, dos vibraciones fueron identificados a $1614\text{-}1673\text{ cm}^{-1}$ para vibraciones de estiramiento asimétrico del grupo $-\text{CN}_3\text{H}_5^+$, excepto en el cascarón de huevo del *Pristatoolithus*, *Spheroolithus muestra 2* y en el ootaxon no identificado, y a $1638\text{-}1633\text{ cm}^{-1}$ para vibraciones de estiramiento simétricas del grupo $-\text{CN}_3\text{H}_5^+$, observada en todas las muestras. Otro aminoácido identificado en todas las muestras sin excepción fue la Lys, con vibraciones en $1631\text{-}1626\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a flexiones asimétricas del $-\text{NH}_3^+$, y a $1530\text{-}1525\text{ cm}^{-1}$ y $1515\text{-}1512\text{ cm}^{-1}$ para la vibración de flexión simétrica del grupo amino. Finalmente, Asn y Gln con similitud estructural, presentan vibraciones de estiramiento simétricas del grupo $-\text{C}=\text{O}$ a $1683\text{-}1679\text{ cm}^{-1}$ y a $1672\text{-}1668\text{ cm}^{-1}$, respectivamente, y vibraciones de flexión simétrica a $1622\text{-}1618\text{ cm}^{-1}$ para Asn y 1613-

1609 cm^{-1} para Gln, donde el cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 fue la única muestra en donde las bandas correspondientes a estos dos aminoácidos no fueron observadas.

En el caso de los aminoácidos aromáticos como Tyr, presenta dos vibraciones correspondientes al anillo-OH en 1522-1517 cm^{-1} presente en todas las muestras, y vibraciones propias del anillo-O- a 1605-1601 cm^{-1} y 1498-1496 cm^{-1} , visibles en todos los cascarones de huevo excepto en el cascarón de la familia Lambeosaurinae. Otros aminoácidos con vibraciones en el anillo aromático son la Phe y His, con vibraciones a 1493-1488 cm^{-1} y 1594-1591 cm^{-1} , respectivamente, siendo el último no identificado en los cascarones de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 y *Prismatoolithus* (Figura 3-12).

De los componentes de la estructura secundaria, los giros presentan tres bandas características las cuales corresponden a no helicoidales, no helicoidales con Gly en posición 3, y hélices 3_{10} , pero no son identificados individualmente. Independiente del tipo de los giros, se observa una banda en el número de onda a 1696-1690 cm^{-1} , 1668 cm^{-1} (no visible en el cascarón de huevo de del *Prismatoolithus* y *Spheroolithus* muestra 2), y en 1665-1661 cm^{-1} . Así como los giros, las α -hélices se pueden observar en tres bandas localizadas a 1705-1700 cm^{-1} , 1657-1651 cm^{-1} , y 1648 cm^{-1} , la cual no se identificó en las muestras de cascaron de huevo del *Spheroolithus* muestra 1 y de la familia Lambeosaurinae. Las hojas- β y las señales de estructura desordenada fueron observadas en 1685-1684 cm^{-1} y 1646-1641 cm^{-1} , respectivamente, donde las hojas- β fueron identificadas en los cascarones de huevo del *Prismatoolithus* y en el ootaxon no identificado, mientras que las señales ocasionadas por el desorden estructural no fue posible identificarse en el cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2.

3.4 CONCLUSIONES

De los cascarones de huevo del *Spheroolithus* muestra 1, Lambeosaurinae, *Prismatoolithus*, *Spheroolithus* muestra 2, y del ootaxon no identificado, la composición química fue determinada por microRaman identificando minerales como calcita, cuarzo, dióxido de silicio, albita, anhidrita, hematita, e hidroxiapatita, usando diferentes potencias de trabajo debido a las líneas de fluorescencia emitidas por los cascarones de huevo, la cual se confirma por la fotoluminiscencia a temperatura ambiente. La calcita, el principal factor de la fluorescencia, es encontrado en una mayor proporción comparada con los otros minerales, que mediante la difracción de rayos-X y el refinamiento Rietveld, los planos cristalográficos fueron identificados, al igual que el tamaño de cristalita. Junto con la calcita, el cuarzo es otro mineral que fue caracterizado, así como las impurezas de dióxido de silicio, los cuales fueron observados en la espectroscopia de fluorescencia y en la difracción de rayos-X mediante las curvas gaussianas observadas en los

cromatogramas, debido a las impurezas de los cristales amorfos y metales absorbidos durante los procesos de fosilización. En contraste a la calcita y cuarzo, la albita es un tercer mineral identificado en las muestras estudiadas, presentando una baja intensidad en las señales obtenidas de microRaman y emisión de fotoluminiscencia. Además, pocos datos cristalográficos fueron detectados debido a la baja proporción comparada con los otros minerales. El análisis obtenido de FT-IR permitieron la identificación de bandas correspondientes a nueve aminoácidos (Asp, Glu, Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, His, y Phe), y los componentes de la estructura secundaria presente en las proteínas (giros, α -hélices, y hojas- β).

Debemos señalar que este resultado es un aporte a la identificación de proteínas ancestrales, las cuales aún no han sido caracterizadas, y que la investigación para obtener la estructura tridimensional debe continuar, ya que proporcionará información sobre la evolución y la relación estructural con proteínas aisladas y caracterizadas de especies filogenéticamente relacionadas con los dinosaurios. Estos resultados son de gran importancia ya que no existen estudios en México sobre la composición de los cascarones de huevo de dinosaurios, ni sobre las proteínas intraminerales presentes en los cascarones de huevos fosilizados. En este caso, se espera que el análisis realizado sobre estas muestras paleontológicas ayude a completar el enigma de investigación de los posibles compuestos absorbidos o difundidos en las muestras debido a los cambios diagenéticos, así como dar información sobre el comportamiento de los dinosaurios y los paleoambientes en el que se encontraban al momento de la deposición de los huevos.

3.5 ANEXOS

ANEXO 3.1

Determinación de la fotoluminiscencia de los cascarones de huevo por FS

Las energías de emisión fueron determinadas por FS usando funciones Lorentzianas de la superficie externa e interna de los cascarones.

Tabla 3-9. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de emú a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. Δ . FWHM

Superficie Externa				Superficie Interna			
λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)		λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)	
λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ
404	12	400	18	402	14	400	20
423	7	422	5	423	7	422	5
441	6	438	6	442	5	438	6
446	5	461	16	446	5	460	14
460	2	486	7	460	4	472	5
464	14	504	6	467	8	486	9
487	8	519	6	485	11	504	6
506	10	528	4	490	2	519	7
520	7	542	3	506	7	528	4
--	--	574	39	--	--	542	4
--	--	--	--	--	--	575	31

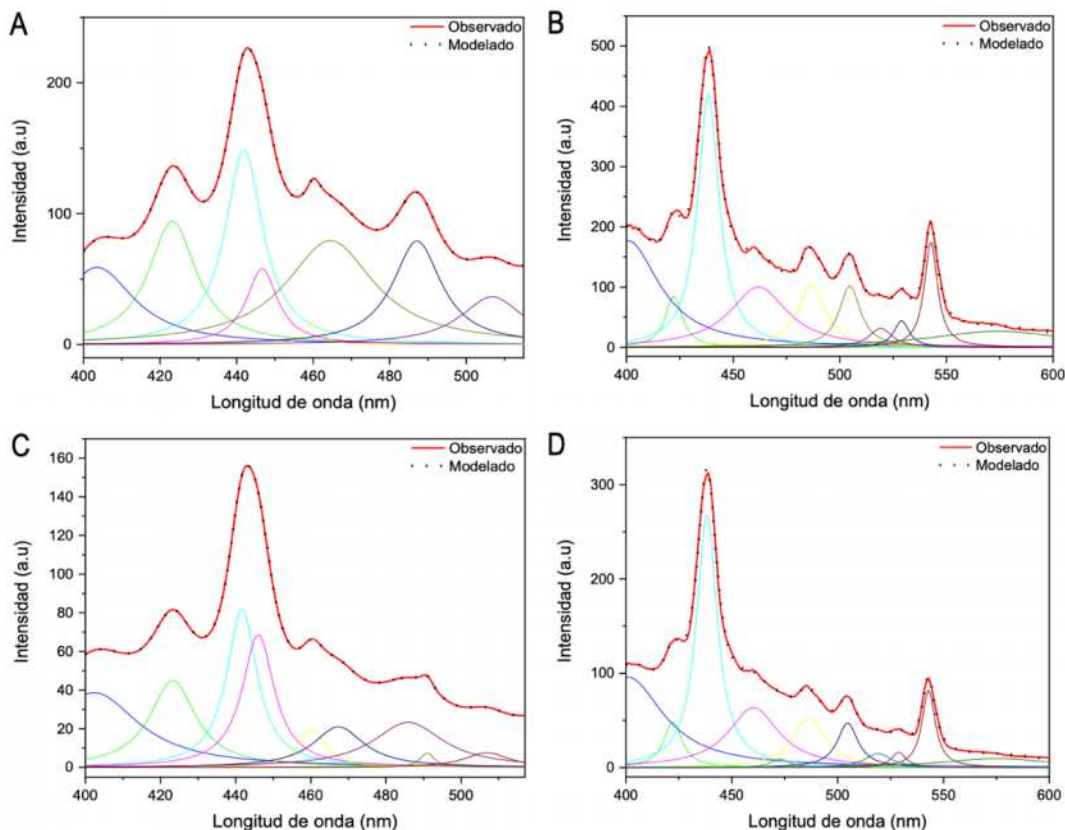


Figura 3-13. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de emú en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 3-10. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de cocodrilo a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. Δ . FWHM

Superficie Externa				Superficie Interna			
λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)		λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)	
λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ	λ (nm)	Δ
402	15	400	17	403	13	400	16
423	8	422	6	423	7	422	5
441	6	438	13	441	5	438	6
446	7	444	9	446	5	460	9
460	4	460	5	460	4	472	6
469	11	469	9	467	8	486	8
485	4	486	9	485	10	504	5
492	8	504	6	491	2	519	6
508	6	518	6	507	9	528	4
--	--	528	4	519	5	543	4
--	--	543	4	--	--	578	27
--	--	577	27	--	--	--	--

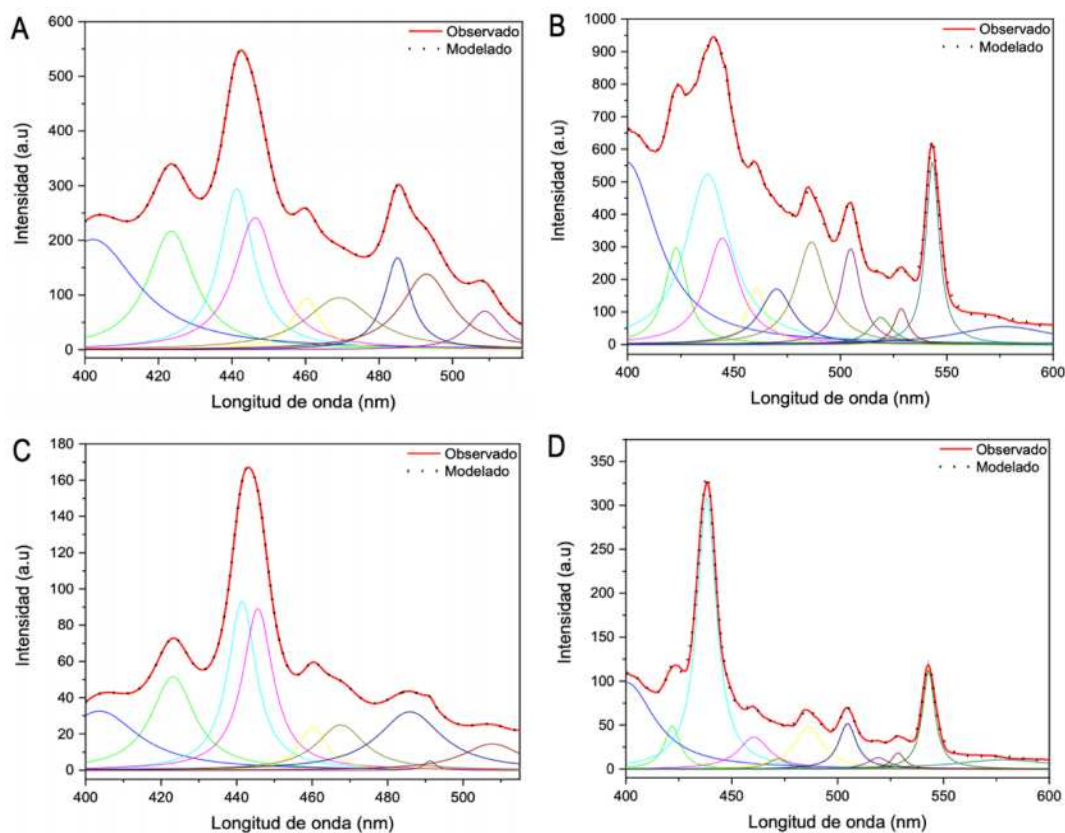
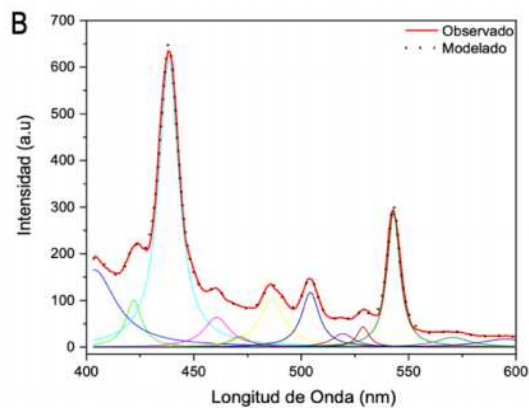
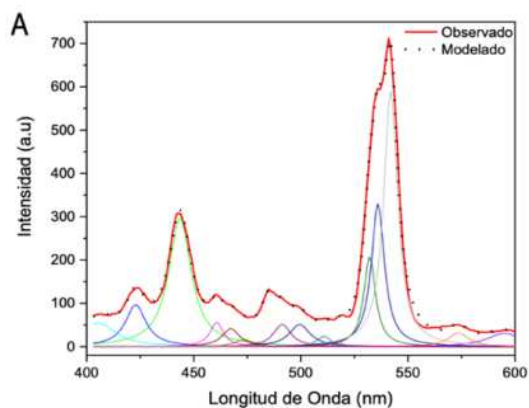


Figura 3-14. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de cocodrilo en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 3-11. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. **A.** Albita; **C.** Calcita; **Q.** Cuarzo; **S.** SiO₂; **Δ.** FWHM; **M.** Estándar; **CS.** Calcio de las especies actuales

Superficie Externa						Superficie Interna					
λ: 250 nm (EE)			λ: 370 nm (EE)			λ: 250 nm (EE)			λ: 370 nm (EE)		
λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
405	10	CS	403	12	CS	406	10	CS	403	12	CS
423	6	CS	422	4	CS	423	6	CS	422	4	CS
443	6	Q	438	6	Q	443	6	Q	438	6	Q
461	4	CS	461	7	CS	461	4	CS	461	6	CS
467	5	S	486	7	A	468	7	S	471	5	S
473	5	CS	504	5	CS	485	4	A	486	7	A
485	4	A	519	6	C	492	5	CS	504	5	CS
491	5	CS	529	3	CS	499	6	--	519	5	C
499	6	--	543	3	C	510	3	Q	528	3	CS
511	4	Q	570	10	CS	517	1	C	543	3	C
517	1	C	595	14	S	534	4	--	579	23	C
532	3	--	--	--	--	540	3	C	--	--	--
536	4	--	--	--	--	543	3	C	--	--	--
542	4	C	--	--	--	573	6	C	--	--	--
574	6	C	--	--	--	595	10	A	--	--	--
595	10	A	--	--	--	--	--	--	--	--	--



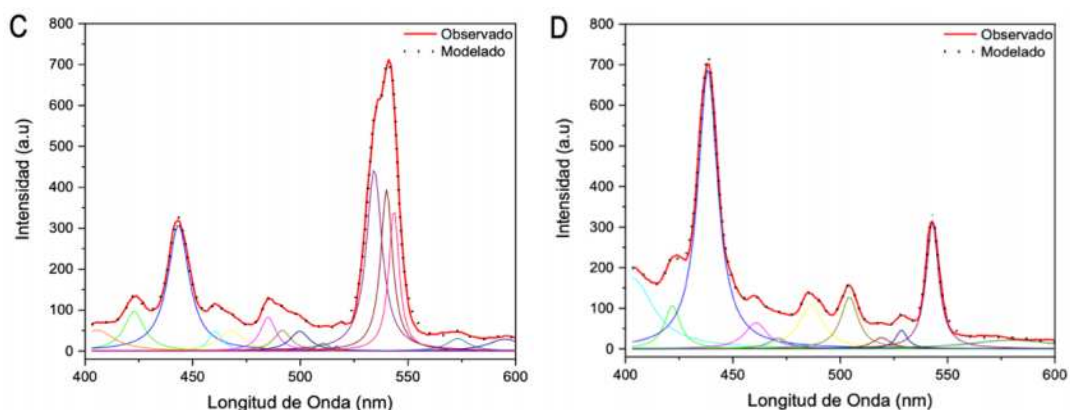


Figura 3-15. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 3-12. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2 a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. **A.** Albita; **C.** Calcita; **Q.** Cuarzo; **S.** SiO₂; Δ . FWHM; **M.** Estándar; **CS.** Calcio de las especies actuales

Superficie Externa						Superficie Interna					
$\lambda: 250$ nm (EE)			$\lambda: 370$ nm (EE)			$\lambda: 250$ nm (EE)			$\lambda: 370$ nm (EE)		
λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
405	10	CS	401	14	CS	405	10	CS	403	12	CS
423	6	CS	421	5	CS	423	6	CS	422	5	CS
443	6	Q	425	2	CS	443	6	Q	438	6	Q
461	3	CS	437	6	Q	461	4	CS	450	1	Q
468	8	S	450	2	Q	468	6	S	460	5	CS
485	4	A	460	5	CS	486	6	A	471	9	S
491	5	CS	470	7	CS	499	7	--	485	5	A
499	6	--	486	7	A	510	4	Q	491	3	CS
511	4	Q	518	4	C	517	1	C	504	5	CS
518	2	C	499	13	--	534	4	--	519	5	C
532	3	--	530	3	CS	540	3	C	529	4	CS
536	4	--	542	4	C	543	3	C	543	4	C
542	4	C	570	13	S	567	3	S	570	11	S
567	2	S	597	17	A	575	5	C	596	16	A
575	5	C	--	--	--	595	10	A	--	--	--
595	10	A	--	--	--	--	--	--	--	--	--

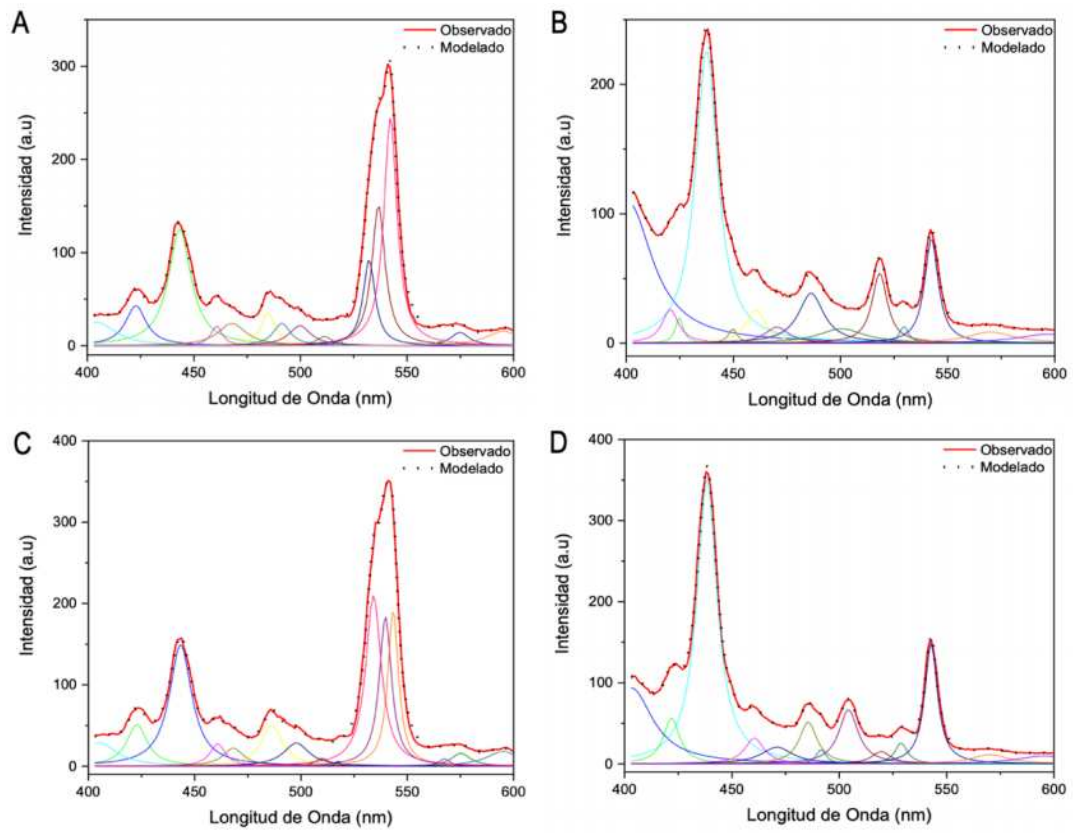
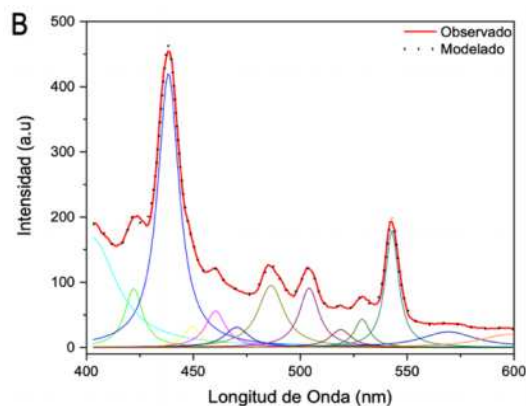
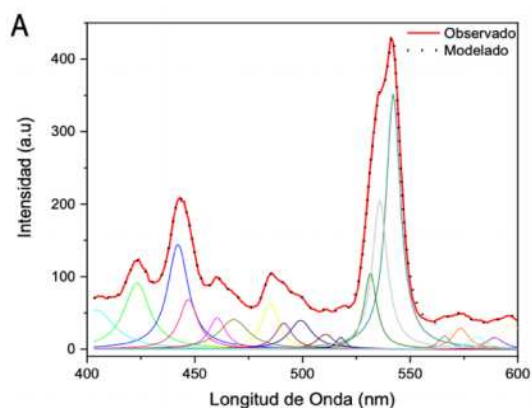


Figura 3-16. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2 en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 3-13. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del *Prismatoolithus* a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. **A.** Albita; **C.** Calcita; **Q.** Cuarzo; **S.** SiO₂; **Δ.** FWHM; **M.** Estándar; **CS.** Calcio de las especies actuales

Superficie Externa						Superficie Interna					
λ: 250 nm (EE)			λ: 370 nm (EE)			λ: 250 nm (EE)			λ: 370 nm (EE)		
λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
404	10	CS	402	14	CS	404	10	CS	402	14	CS
423	7	CS	422	5	CS	423	7	CS	422	5	CS
442	6	Q	438	6	Q	444	7	Q	438	6	Q
447	5	Q	449	4	Q	461	4	CS	449	3	Q
460	5	CS	460	6	CS	468	5	S	460	6	CS
468	8	S	470	7	S	475	5	CS	471	11	S
485	5	A	486	7	A	484	4	A	485	4	A
491	5	CS	504	5	CS	490	5	CS	491	4	CS
499	6	--	519	6	C	499	6	--	504	6	CS
511	5	Q	529	4	CS	511	4	Q	519	6	C
518	2	C	543	4	C	517	1	C	529	4	CS
532	3	--	569	15	CS	534	5	--	543	4	C
539	4	--	598	16	A	542	4	C	569	16	S
542	4	C	--	--	--	567	3	S	598	17	A
566	3	S	--	--	--	575	6	C	--	--	--
573	4	C	--	--	--	595	11	A	--	--	--
581	5	CS	--	--	--	--	--	--	--	--	--
589	5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
597	6	A	--	--	--	--	--	--	--	--	--



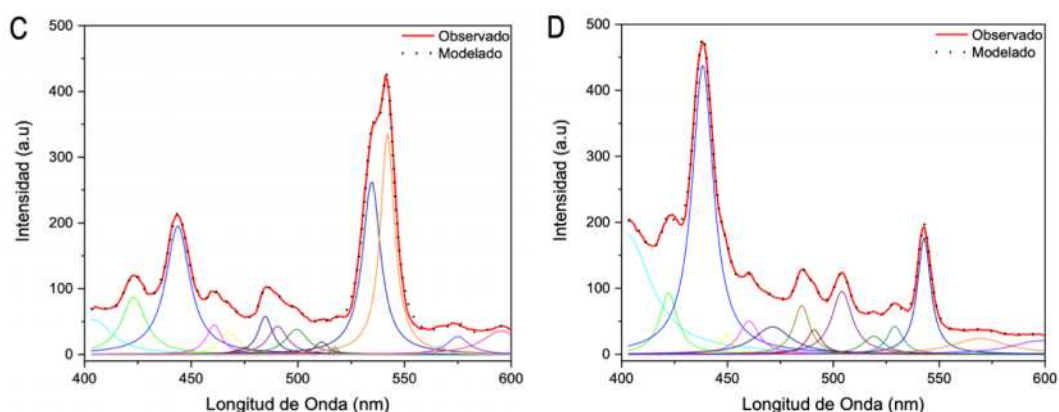


Figura 3-17. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del ootaxon *Pristatoolithus* en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Tabla 3-14. Longitudes de onda obtenidas de la desconvolución de las señales de fluorescencia de las superficies del cascarón de huevo del ootaxon no identificado a energías de excitación (EE) de 250 nm y 370 nm. **A.** Albita; **C.** Calcita; **Q.** Cuarzo; **S.** SiO₂; Δ . FWHM; **M.** Estándar; **CS.** Calcio de las especies actuales

Superficie Externa						Superficie Interna					
$\lambda: 250$ nm (EE)			$\lambda: 370$ nm (EE)			$\lambda: 250$ nm (EE)			$\lambda: 370$ nm (EE)		
λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
405	9	CS	403	12	CS	405	10	CS	403	13	CS
423	6	CS	422	5	CS	423	6	CS	422	5	CS
443	6	Q	438	6	Q	443	6	Q	438	6	Q
461	4	CS	450	2	Q	461	4	CS	461	7	CS
468	7	S	460	6	CS	468	7	S	471	5	S
485	4	A	470	7	S	485	4	A	486	7	A
491	5	CS	486	7	A	492	5	CS	504	5	CS
499	6	--	504	5	CS	499	6	--	519	6	C
510	4	Q	519	6	C	511	3	Q	529	4	CS
517	2	C	529	3	CS	517	1	C	543	4	C
532	3	--	543	4	C	534	4	--	563	5	CS
536	4	--	570	10	S	540	3	C	573	9	C
542	4	C	595	15	A	543	3	C	595	15	A
568	3	S	--	--	--	566	3	S	--	--	--
575	5	C	--	--	--	574	6	C	--	--	--
595	10	A	--	--	--	595	11	A	--	--	--

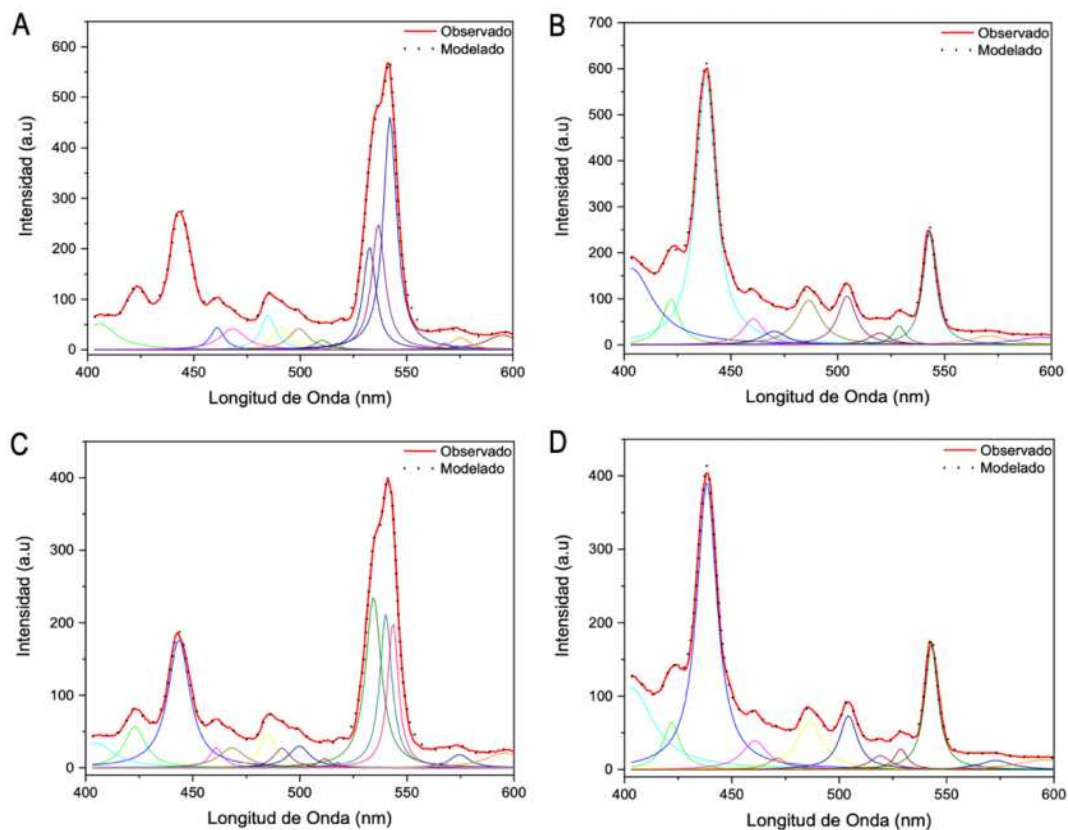


Figura 3-18. Fotoluminiscencia del cascarón de huevo del ootaxon no identificado en la superficie externa (A, B) e interna (C, D) a $\lambda = 250$ nm (A, C) y $\lambda = 370$ nm (B, D) de energía de excitación. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

ANEXO 3.2

Análisis Molecular por Espectroscopia Raman

El desplazamiento Raman fue identificado en todas las muestras de cascarones de huevo, de los cuales se analizaron en tres zonas en ambas superficies del cascaron, permitiendo la identificación de la calcita, cuarzo, dióxido de silicio, albita, anhidrita, hematita e hidroxiapatita.

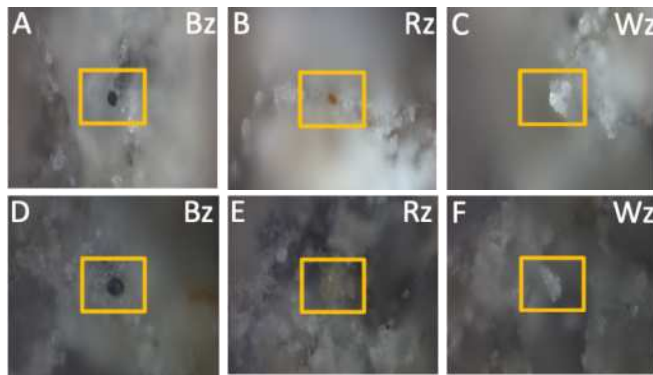


Figura 3-19. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **A-C.** Superficie externa; **D-F.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca

Tabla 3-15. Desplazamiento Raman observado en el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. θ . Calcita; ω . Albita; ε . Cuarzo; ρ . Anhidrita; ψ . SiO₂; τ . Hematita; π . Hidroxiapatita.^a

Superficie Externa						Superficie Interna				
θ	ω	ε	ψ	ρ	τ	θ	ω	ε	ψ	π
155	171	387	245	1028	685	155	171	353	245	568
281	297	--	555	--	--	281	507	454	--	885
1088	480	--	--	--	--	712	--	603	--	--
--	833	--	--	--	--	1088	--	--	--	--

^a El desplazamiento está dado en cm⁻¹

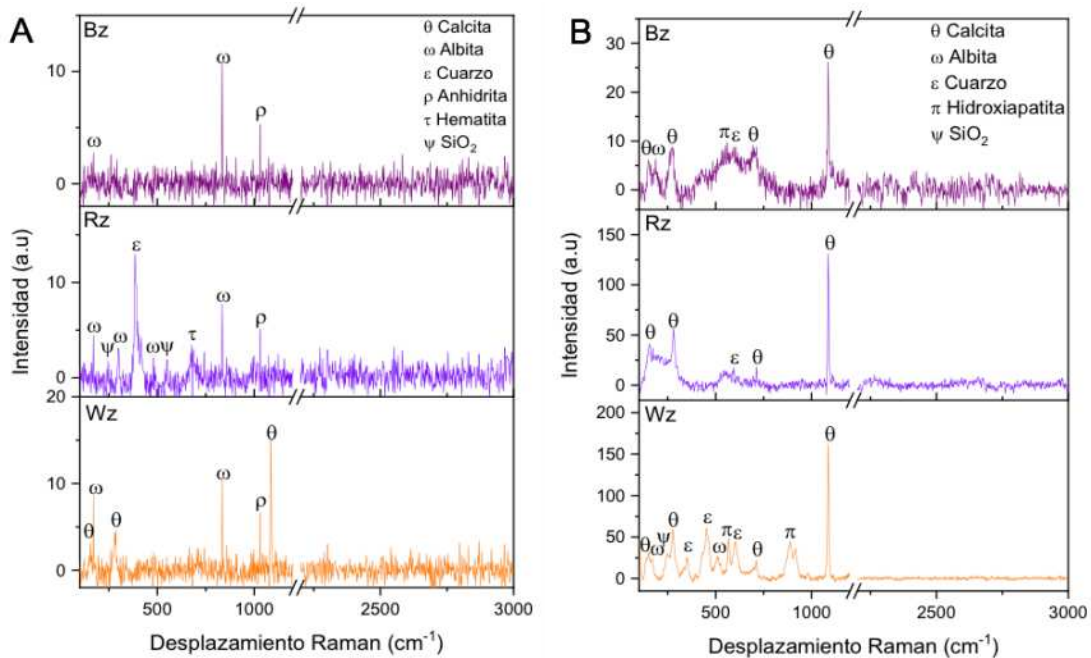


Figura 3-20. Espectros Raman del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae en las tres zonas correspondientes. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca; θ . Calcita; ω . Albita; ε . Cuarzo; ρ . Anhidrita; ψ . SiO₂; τ . Hematita; π . Hidroxiapatita

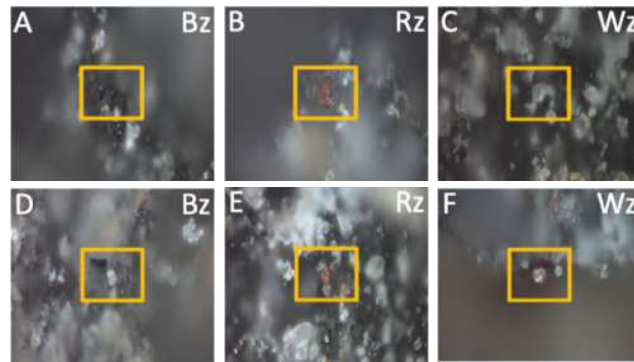


Figura 3-21. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **A-C.** Superficie externa; **D-F.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca

Tabla 3-16. Desplazamientos Raman observados en el cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ψ . SiO_2 .^a

Superficie Externa			Superficie Interna			
θ	ω	ϵ	θ	ω	ϵ	ψ
155	171	218	155	656	218	245
281	656	387	281	833	406	--
712	833	603	712	--	603	--
1088	--	--	1088	--	--	--

^a El desplazamiento está dado en cm^{-1}

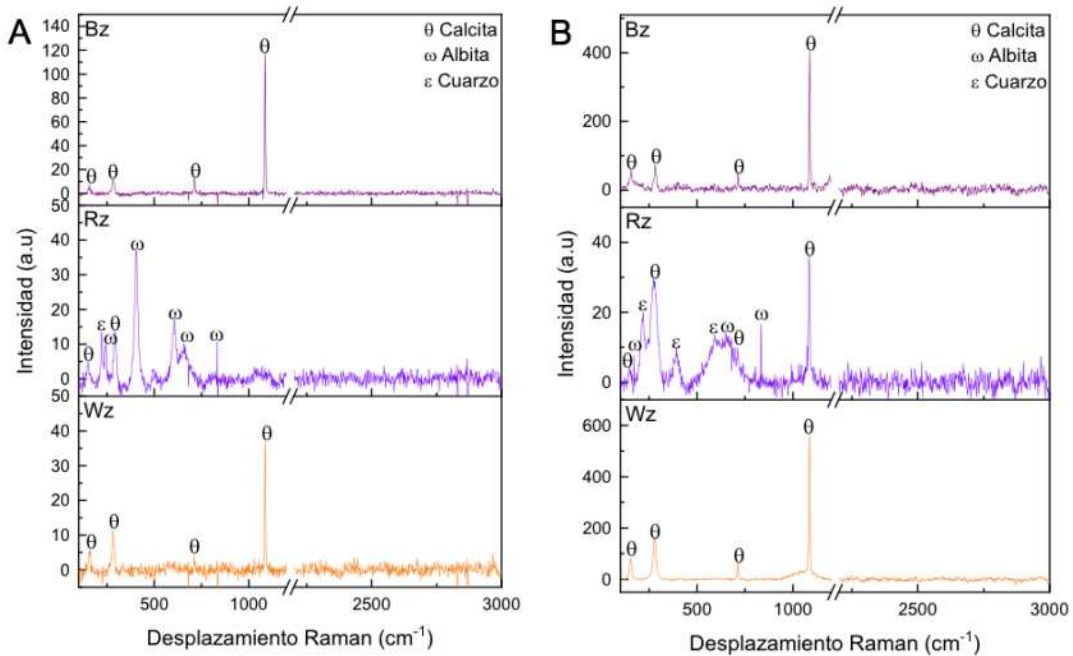


Figura 3-22. Espectros Raman del cascarón de huevo *Spheroolithus* muestra 2 en las tres zonas correspondientes. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca; θ . Calcita; ω . Albita; ϵ . Cuarzo; ψ . SiO_2

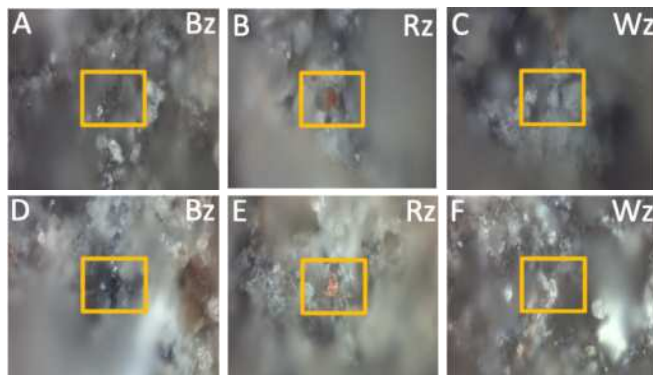


Figura 3-23. Zonas correspondientes a las mediciones de microRaman del cascarón de huevo del ootaxón no identificado. **A-C.** Superficie externa; **D-F.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca

Tabla 3-17. Desplazamientos Raman observados en el cascarón de huevo del ootaxón no identificado. θ . Calcita; ω . Albita; ε . Cuarzo; ρ . Anhidrita; ψ . SiO₂.^a

Superficie Externa					Superficie Interna		
θ	ω	ε	ψ	ρ	θ	ε	ψ
155	171	126	224	1028	155	218	581
281	480	512	410	--	281	387	--
1088	--	603	--	--	712	--	--
--	--	--	--	--	1088	--	--

^a El desplazamiento está dado en cm⁻¹

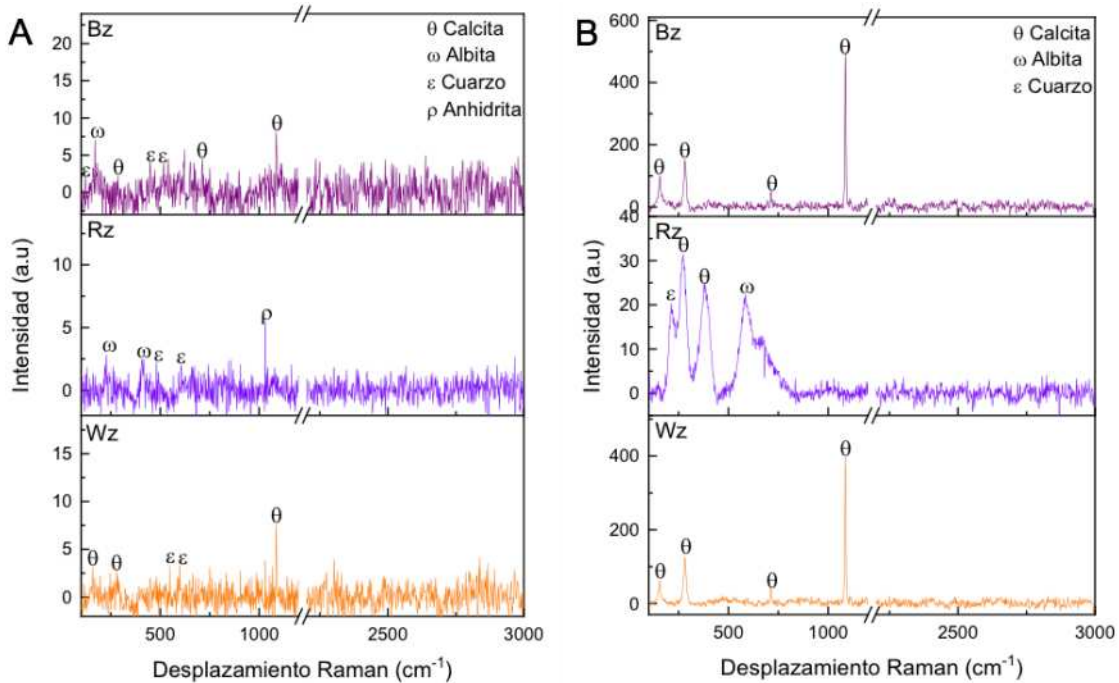


Figura 3-24. Espectros Raman del cascarón de huevo del ootaxón no identificado en las tres zonas correspondientes. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna; **Bz.** Zona negra; **Rz.** Zona roja; **Wz.** Zona blanca; θ . Calcita; ω . Albita; ε . Cuarzo; ρ . Anhidrita

ANEXO 3.3

Caracterización de cristalitas por XRD

Los minerales presentes en las muestras de cascarones de huevo fueron identificados, así como el tamaño de las cristalitas determinado por la ecuación de Scherrer que poseen y el porcentaje de masa presente en las muestras.

Tabla 3-18. Tamaño de cristalita y el porcentaje de cada uno de los minerales presentes en los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae, *Spheroolithus* muestra 2, y del ootaxón no identificado

Oogénero	Cristalita	Superficie externa		Superficie interna	
		Tamaño (Å)	Concentración (%)	Tamaño (Å)	Concentración (%)
Lambeosaurinae	Calcita	496.3	1.93	567.3	2.58
	Cuarzo	1323.8	0.58	567.3	0.28
	Albita	992.8	0.68	722.2	0.36
<i>Spheroolithus</i> sample 2	Calcita	248.2	2.05	496.3	3.11
	Albita	--	--	611.1	0.04
Ootaxón no identificado	Calcita	397.0	2.37	397.0	2.36
	Cuarzo	722.2	1.03	1323.8	0.24
	Albita	496.3	0.10	882.2	0.10

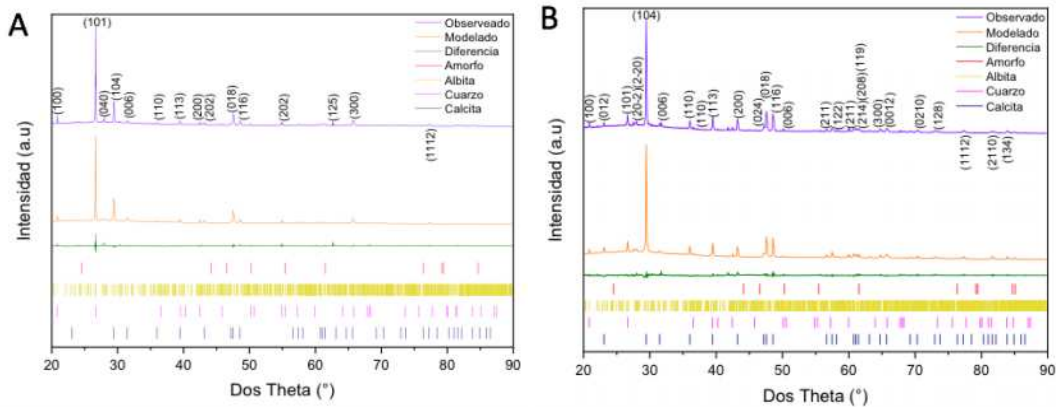


Figura 3-25. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

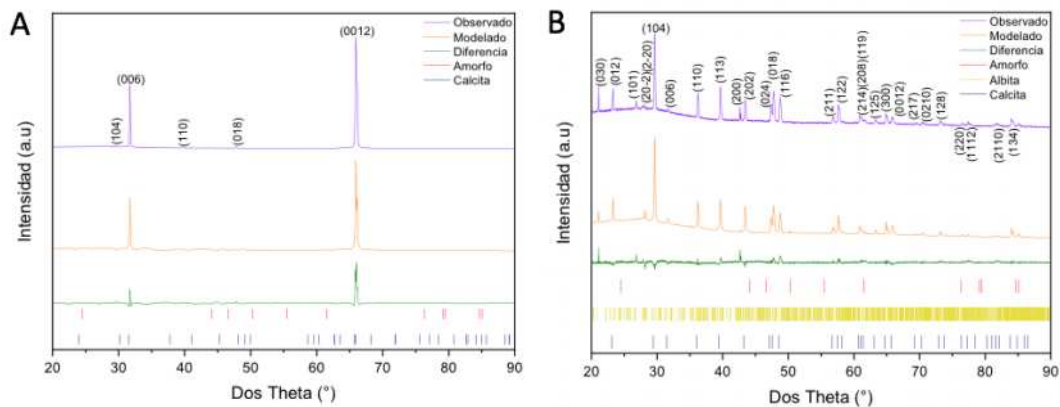


Figura 3-26. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

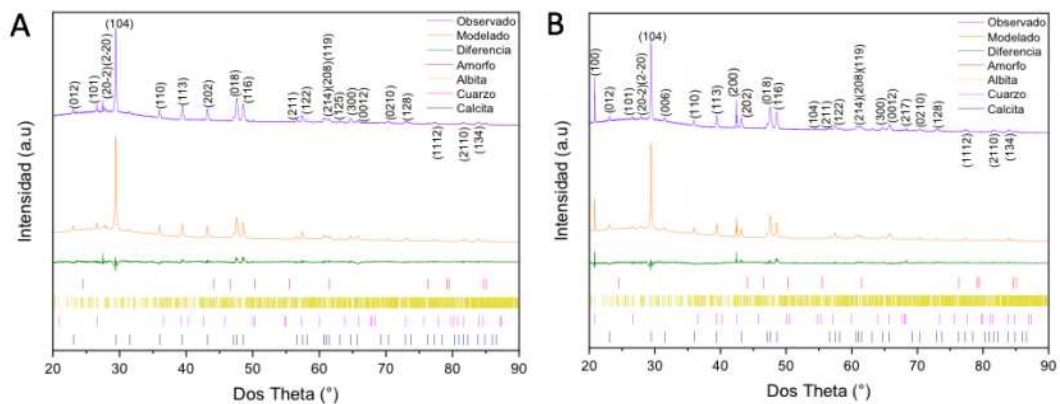


Figura 3-27. Difractograma de las fases obtenidas correspondientes al cascarón de huevo del ootaxon no identificado. **A.** Superficie externa; **B.** Superficie interna

ANEXO 3.4

Moléculas orgánicas caracterizadas por FT-IR

La desconvolución de cada gráfica se desarrolló con el propósito de identificar los picos característicos de los aminoácidos que conforman la estructura primaria de las proteínas intraminerales presente en los cascarones de huevo de dinosaurio, así como la información de la estructura secundarias de las mismas.

Tabla 3-19. Desconvolución del espectro de FT-IR y asignación de las vibraciones correspondientes a los aminoácidos de la cadena lateral (AA) así como de la estructura secundaria (ES) de las proteínas intraminerales presentes en la superficie externa (e) e interna (i) de los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae, *Spheroolithus* muestra 2 y ootaxon no identificado. ν_0 : Número de onda; **st**: estiramiento; **bd**: flexión; **s**: simétrico; **as**: asimétrico.

AA/ES	Lambeosaurinae		<i>Spheroolithus</i> sample 2		Ootaxon no Identificado		Tipo de Vibración
	$\nu_{0(e)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(i)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(e)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(i)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(e)}$ (cm ⁻¹)	$\nu_{0(i)}$ (cm ⁻¹)	
Asp	1572	1570	1576	1574	1575	1573	-COO ⁻ st as
	--	1721	--	--	--	--	-COOH st
Glu	1564	1557	1559	1559	1559	1559	-COO ⁻ st as
	1713	1711	1710	--	1710	1709	-COOH st
Arg	1673	--	--	--	--	--	-CN ₃ H ₅ ⁺ st as
	--	1637	1638	1637	--	1638	-CN ₃ H ₅ ⁺ st s
Lys	1631	1627	1629	1631	1631	1629	-NH ₃ ⁺ bd as
	1525	--	--	--	1530	1527	-NH ₃ ⁺ bd s
	1514	--	1513	--	1512	1512	-NH ₃ ⁺ bd s
Asn	1681	1680	1679	1680	1679	1678	-C=O st
	1621	1620	1621	1620	1622	1618	-NH ₂ bd
Gln	--	1668	1671	1670	1669	1669	-C=O st
	1611	--	1610	--	1609	--	-NH ₂ bd
Tyr	1519	1520	1520	1520	1520	1518	Anillo-OH
	--	--	--	1605	--	--	Anillo -O-
	--	--	1496	1496	1496	--	Anillo -O-
His	1593	1594	--	1591	1594	--	Anillo
Phe	1493	1493	1488	1489	--	1492	Anillo
Turns	1691	1692	1690	1691	1694	1696	--
	--	1668	--	--	--	--	--
	1664	--	1662	--	1663	--	--
α -hélice	1703	1701	1700	1705	1701	--	--
	1652	1657	1655	1657	1654	1657	--
	--	--	1648	1648	1648	--	--
Hojas- β	--	--	--	--	--	1685	--
Desorden	1644	1646	--	--	1641	1646	--

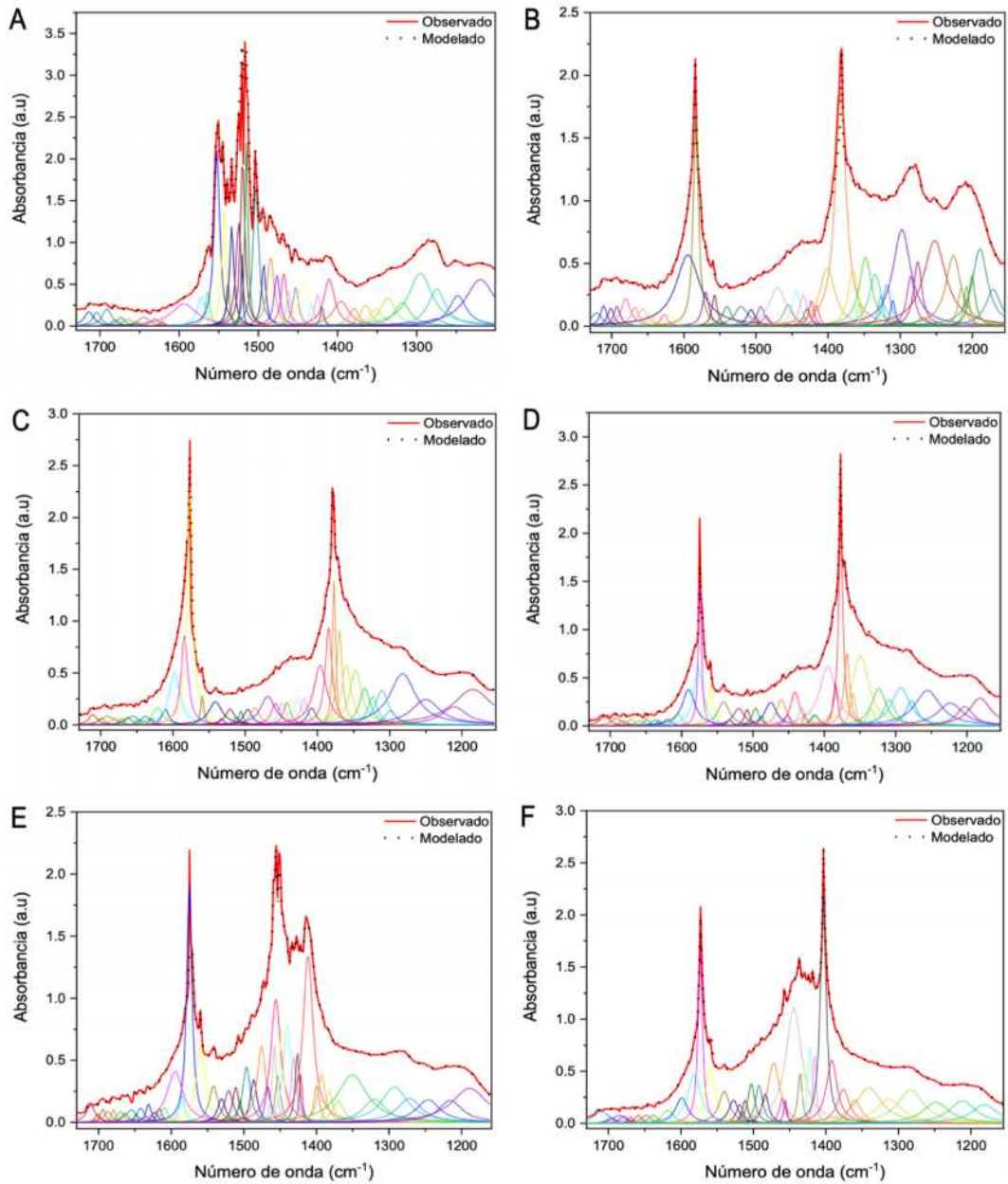


Figura 3-28. Espectros de FT-IR de los cascarones de huevo de la familia Lambeosaurinae (**A, B**), *Spheroolithus* muestra 2 (**C, D**) y ootaxon no identificado (**E, F**) de ambas superficies. **A, C, E.** Superficie externa; **B, D, F.** Superficie interna. La línea roja corresponde a los datos experimentales y los puntos negros a la suma de las gráficas Lorentzianas de la desconvolución de los picos

Capítulo 4.

Determinación de la Rugosidad y Área Superficial de los Cascarones de Huevo de Especies Ancestrales y Actuales

.....

Elejalde-Cadena, N. R.; Moreno, A. Fractal analysis of the distribution and morphology of pores in dinosaur eggshells collected in Mexico. Implications to understand the biomineralization of calcium. *ACS Omega*. **2021**, *6*, 7887-7895.

4.1 INTRODUCCIÓN

El cascarón de huevo es una estructura mineralizada que cumple la función de proteger al embrión para su correcto crecimiento y desarrollo. Está dividido en una fase orgánica (compuesta principalmente por biomacromoléculas) y una fase inorgánica (compuesta principalmente por carbonato de calcio, CaCO_3), y dependiendo del contenido de estas fases, algunos huevos pueden ser flexibles (tortugas), semirrígidos (cocodrilos), y rígidos (gallina). De las especies caracterizadas por presentar huevos rígidos, están los dinosaurios. Los huevos de dinosaurio no solo presentan una alta rigidez, sino que también tienden a poseer una fase inorgánica gruesa.¹

La morfología exhibida por las unidades cristalinas y los poros en los cascarones de dinosaurios permite discernir entre una variedad de cascarones que pertenecen a diferentes especies. Independiente del tipo de poro y del tipo de cascarón, estos cumplen la misma función: 1) protección y aislamiento del embrión con el medio externo; 2) intercambio de gases producidos por la respiración y metabolismo del embrión; 3) intercambio de vapor de agua; e 4) intercambio térmico desde el interior al exterior del cascarón y viceversa.^{2,3}

En cascarones de otras especies, poros entre 0.01 mm a 1 mm han sido observados, y acorde con la IUPAC están clasificados como macro poros (>50 nm). Si los poros son pequeños y el número de poros presentes en el cascarón incrementa, el área superficial específica del sistema incrementa (relación área/volumen) dramáticamente, así como incrementa la rugosidad. De acuerdo con Russu, et al.,⁴ la porosidad de un cascarón depende de cuatro factores: 1) el número de poros; 2) el área transversal; 3) longitud del poro; y 4) morfología del poro, los cuales, a su vez, están relacionados con la dimensión fractal.⁵

De los diferentes métodos usados para la determinación de la porosidad, rugosidad y/o área superficial, el más utilizado es el cálculo de la dimensión fractal por medio del conteo de cajas, el cual usa un conteo del número de cajas mínimo N (de tamaño h) necesarios para completar un gráfico o una imagen (en 2D (SEM) o 3D (AFM)). El proceso de conteo es repetido para diferentes valores de h y el $\log(N)$ se representa en función del $\log(1/h)$. Los puntos obtenidos se aproximan por el método tradicional de mínimos cuadrados a una línea recta. Por definición de conteo de cajas, la dimensión fractal es el límite de la relación $\log(N) / \log(1/h)$ cuando h tiende a cero. Este valor se puede aproximar muy bien como la magnitud de la pendiente de la línea. Luego, para cada caso, se cuenta el número de cajas (N) que cubren las características fractales, y este logaritmo se representa frente al tamaño de las cajas (h).^{6,7} La dimensión fractal (D) se determina a partir del coeficiente máximo de pendiente de la gráfica definida como:

$$D = \lim_{h \rightarrow 0} - \frac{\log N(h)}{\log h} \quad (1)$$

Los fractales han sido aceptados para describir diferentes sistemas naturales y actualmente se encuentran en la aplicación de diversas áreas como en la tecnología de la telecomunicación,⁸ en ciencias de la computación,⁹ en dispositivos ópticos y electrónicos,^{10,11} y en la caracterización de la capacidad de absorción, porosidad y área superficial,¹² usando imágenes de AFM,¹³ de SEM,¹⁴ corioalantoideas,¹⁵ de vasos extraembrionarios,¹⁶ de redes vasculares,¹⁷ y de resonancia magnética,¹⁸ entre otros. Los sistemas aleatorios a escala microscópica se comportan como fractales, es decir, sus unidades geométricas se parecen entre sí en todas las escalas (se identifican características similares tanto en aumento alto como en bajo), lo que indica que los fractales no son sensibles a la escala de resolución y el análisis fractal puede usarse para extraer más información sobre una superficie en comparación con los métodos estadísticos convencionales, por lo que se cree que la presencia de regiones de baja densidad (red de poros) de superficies con microestructuras fue la razón del comportamiento fractal de las superficies delgadas. En superficies rugosas, la dimensión fractal se usa como índice analítico para medir cómo varían las características morfológicas a medida que varía la escala.^{19,20} Los análisis fractales proporcionan información sobre el exponente de rugosidad, la longitud de correlación y el desplazamiento (o tamaño de la red). Estos parámetros ofrecen una descripción detallada de los patrones espaciales, la segmentación, la textura y la rugosidad lateral de la morfología de la superficie.^{21,22}

Por otro lado, es evidente que las estructuras porosas no presentan un arreglo ordenado, por lo que no es trivial encontrar uno. Por esta razón, diferentes métodos se han desarrollado utilizando en análisis fractal en varios sistemas. De acuerdo con Benoit B. Mandelbrot: "*Fractales se pueden definir intuitivamente como objetos dentro de objetos o la repetición del mismo objeto a diferentes escalas*".²³ Por lo tanto, se han identificado dos tipos de fractales: auto-similares y auto-afines. Los autosimilares involucran objetos geométricos cuya forma no cambia cuando se amplía a diferentes escalas, esto significa que estos objetos presentan fractales regulares. En cambio, los auto-afines existen en varios objetos naturales (pero no siempre) que exhiben una autosimilitud solo hasta cierto nivel de aumento o solo en ciertas partes de este,^{6,24} ejemplo: el cascarón de huevo (Figura 4-1). La superficie del cascarón se puede ver como un objeto fractal debido a la rugosidad a diferentes escalas.

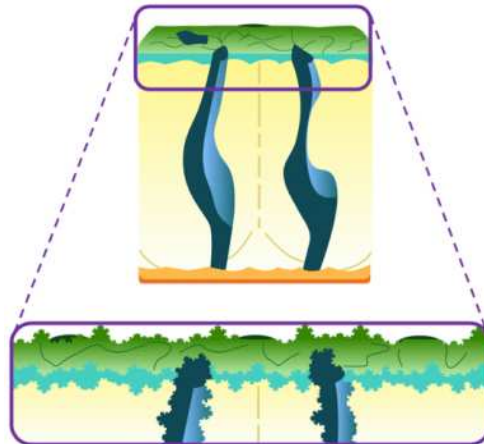


Figura 4-1. Representación de la superficie del cascarón con comportamiento fractal (Koch curve). El recuadro muestra el zoom sobre la superficie de cascarón donde se observa la auto-afinidad

Debido a la falta de información de la determinación del área superficial y rugosidad de cascarones de dinosaurios usando el método por conteo de cajas, los cascarones de diferentes dinosaurios se estudiaron, con el fin de obtener el análisis de la dimensión fractal en 2D y 3D usando imágenes obtenidas mediante el uso de microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 Identificación de la morfología de los poros y dimensión fractal (2D) por microscopía electrónica de barrido (SEM) de cascarones de huevo de dinosaurio

Para las imágenes de SEM, se utilizó un microscopio TESCAN VEGA 3 SB con un rango de voltaje de 10-20 kV a alto vacío a 200x, 500x y 1000x de amplificación. Las imágenes de SEM a 500x se observaron con el software Digital Micrograph para observar el tamaño de los poros en ambas superficies del cascarón, mientras que las imágenes de 1000x de amplificación se convirtieron en imágenes binarias usando el software ImageJ. Después de la conversión, la dimensión fractal de las imágenes binarias se determinó mediante el método de conteo de cajas. Las imágenes de 200x se utilizaron para la determinación de la morfología de los poros.

4.2.2 Determinación de la dimensión fractal (3D), rugosidad y área superficial mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) de cascarones de huevo de dinosaurio

Las imágenes de AFM se tomaron utilizando un Nanoscope®V de Thermo, empleando una punta scanasyst-air y el modo scan-assist a diferentes velocidades de escaneo en el software

NanoScope 9.2 y, procesadas con el software Gwyddion, obteniendo el área de superficie, la rugosidad media y la dimensión fractal de cada muestra.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Determinación de la dimensión fractal (2D) e identificación del diámetro de los poros mediante imágenes de SEM de cascarones de huevo de dinosaurio

Se tomaron imágenes de SEM de ambas superficies de cada uno de los cascarones para observar la homogeneidad de la muestra, observando estructuras más grandes en la superficie externa del cascarón, lo que proporciona una alta rugosidad. Mientras que, en la superficie interna, las estructuras observadas son más pequeñas dando una apariencia suave y homogénea en comparación con la superficie externa. Además, utilizando imágenes de SEM a 1000x, se convirtieron a imágenes binarias para obtener información del tamaño y forma del poro presentes en los cascarones (áreas oscuras, Figura 4-2B), los cuales presentan diferentes morfologías y tamaños, siendo más amplios los observados en la superficie externa.

Con base en las imágenes binarias, se calculó la dimensión fractal (Figura 4-3) utilizando un logaritmo basado en la relación del número de una caja vacía ($N(H)$) y el tamaño de la caja (h) (Ecuación 4-1). Los cascarones de *Spheroolithus* muestra 2 (**Sph S2**) y *Prismatoolithus* (**Prsm**) presentan una distribución de tamaño de poro similar en ambas superficies, lo que podría indicar que el poro tiene una entrada y salida única, lo que garantiza una mayor rugosidad, pero no necesariamente un área superficial mayor, así como se observa en el cascarón del ootaxon no identificado (**NI**). En cambio, de los otros dos cascarones, *Spheroolithus* muestra 1 (**Sph S1**) y Lambeosaurinae (**Lmb**), la diferencia de la rugosidad observada es mayor, en comparación con las otras tres muestras, probablemente al desgaste causado por los cambios diagenéticos durante los procesos de fosilización,²⁵ lo que permitió la formación de estructuras de gran tamaño y fragmentación de las mismas, causando un aumento en la rugosidad, así como de las zonas huecas, interfiriendo con los datos, como se observa principalmente en el cascarón de la familia Lambeosaurinae (**Lmb**).

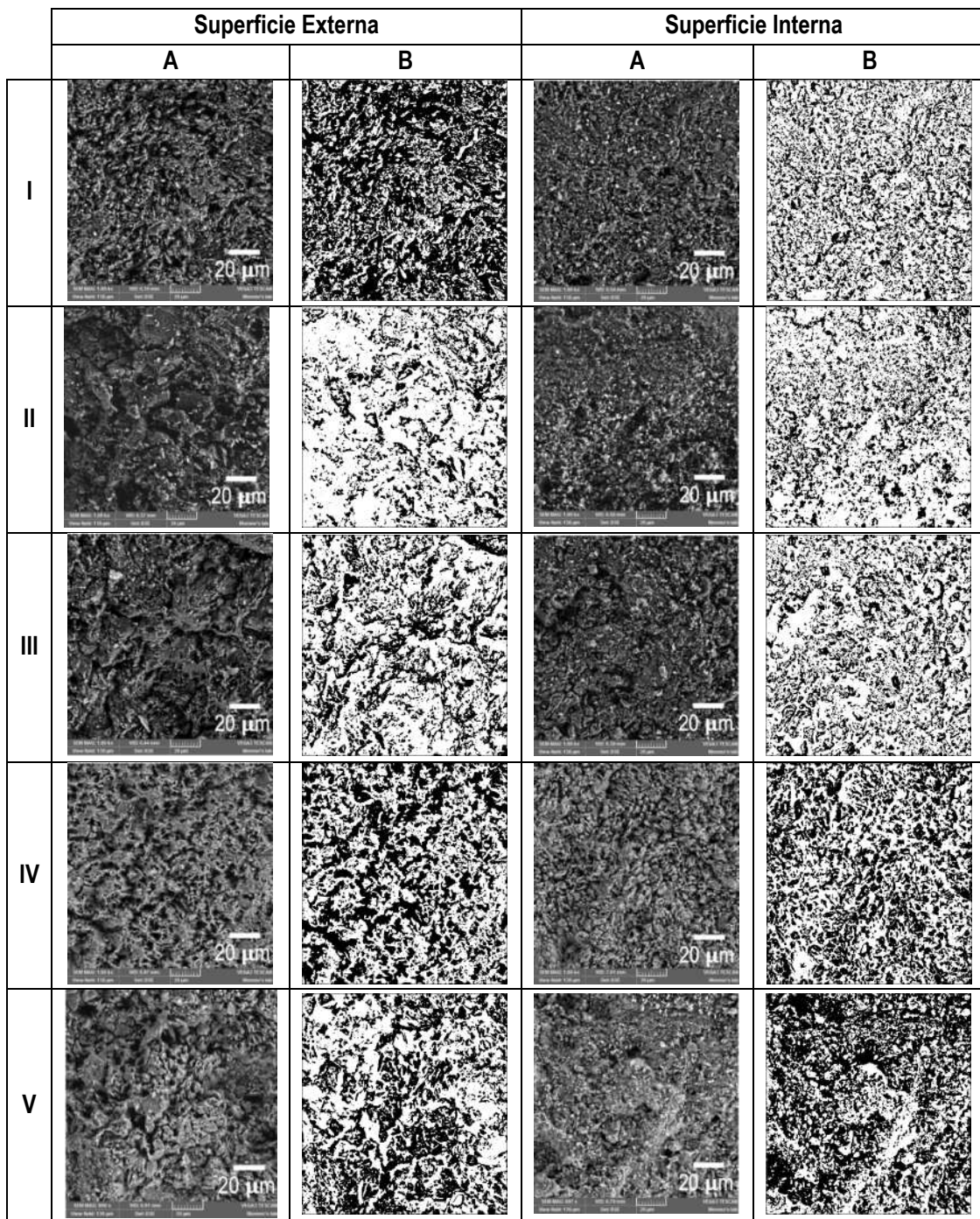


Figura 4-2. Imágenes de SEM usadas para el análisis por conteo de cajas. **A.** Imágenes de SEM a 1000x; **B.** Imágenes binarias; **I.** *Spheroolithus* muestra 1; **II.** Lambeosaurinae; **III.** *Spheroolithus* muestra 2; **IV.** *Prismaoolithus*; **V.** Ootaxon no identificado

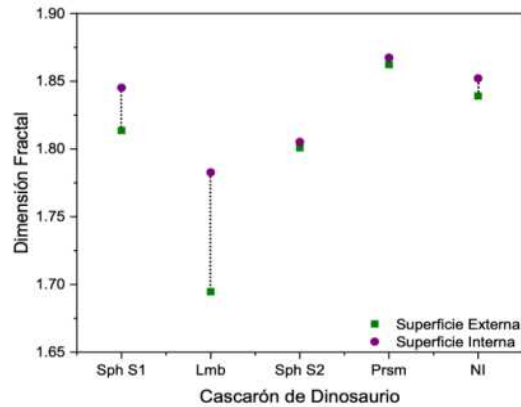


Figura 4-3. Dimensión fractal 2D a partir de imágenes de SEM de los cascarones de huevo de dinosaurio. **Sph S1.** *Spheroolithus* muestra 1; **Lmb.** Lambeosaurinae; **Sph S2.** *Spheroolithus* muestra 2; **Prsm.** *Prismatoolithus*; **NI.** Ootaxon no identificado. Los valores de la dimensión fractal (D) se encuentran entre 1.69 y 1.87, respectivamente (ver tabla 4-2 del anexo 4.1)

Debido a los resultados obtenidos al calcular la dimensión fractal, se decidió determinar el posible tamaño del poro observado a partir de las imágenes SEM (Figura 4-4 y 4-5), los cuales se midieron utilizando el software Digital Micrograph, donde los poros de la superficie interna presentan un diámetro más pequeño, que los observados en la superficie externa. Este procedimiento se realizó en los cinco cascarones de dinosaurio en estudio (ver Anexo 4.1) y se obtuvo el mismo patrón.

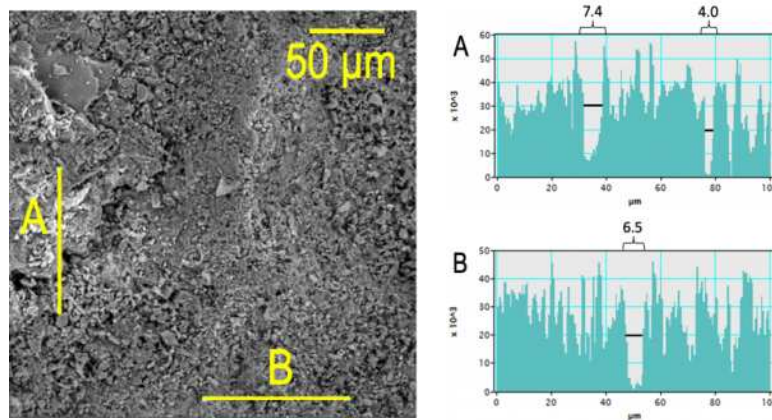


Figura 4-4. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

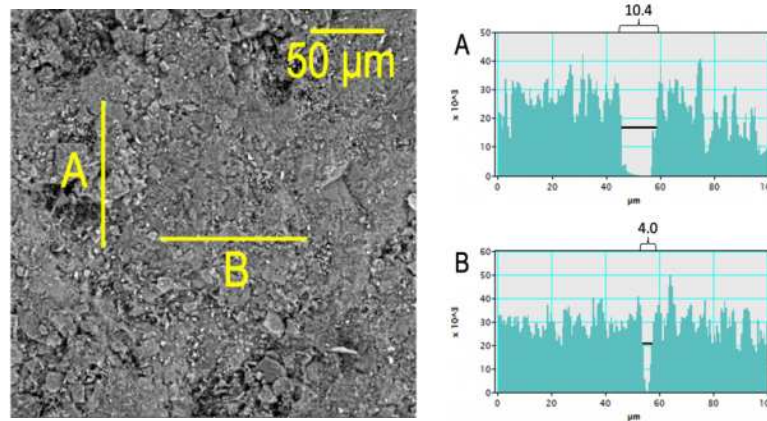


Figura 4-5. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

4.3.2 Determinación de la dimensión fractal (3D), rugosidad y área superficial mediante imágenes de AFM de cascarones de huevo de dinosaurio

Un análisis más preciso de la morfología y rugosidad de ambas superficies, así como el cálculo del área superficial se puede obtener a partir de imágenes de AFM. Esta técnica es más precisa en comparación con el análisis a partir de imágenes de SEM, principalmente cuando las muestras en estudio no son buenos conductores. Una desventaja en AFM ocurre cuando las muestras en estudio son muy rugosas, lo que dificulta la interpretación de los resultados, por lo que se debe utilizar otras herramientas para una buena interpretación de los mismos, tal es el caso del análisis fractal que proporciona buenos resultados estadísticos que ayudan a la caracterización de muestras como las discutidas en este trabajo. La dimensión fractal (entre 2D y 3D), se determinó utilizando imágenes de AFM y los resultados fueron similares a los obtenidos por SEM (dimensión fractal entre 1D y 2D), ya que la superficie interna presenta una mayor rugosidad. Los valores obtenidos entre cada una de las fases están lejos el uno del otro, ya que con la dimensión fractal en AFM, no solo la superficie sino también el volumen de la cantidad de materia presente en las superficies de las muestras se analiza hasta unas pocas micras de profundidad. Según la Figura 4-6, los cascarones *Spheroolithus* (**Sph S1** and **S2**) muestran una mayor rugosidad (dimensión fractal 3D cercana a 3) comparada con los cascarones de la familia Lambeosaurinae (**Lmb**) y *Prismatoolithus* (**Prsm**), y finalmente el ootaxon no identificado (**NI**), presenta una baja rugosidad en la superficie externa y disminuye aún más en la superficie interna.

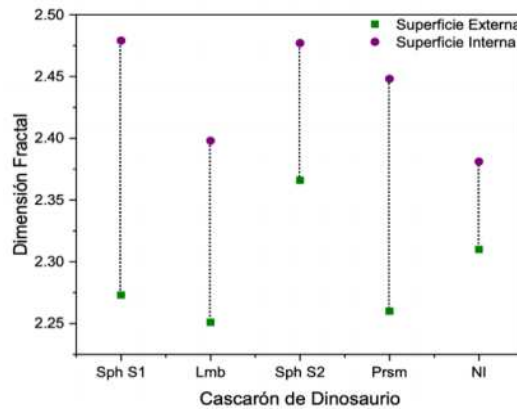


Figura 4-6. Dimensión fractal 3D a partir de imágenes de AFM de los cascarones de dinosaurio. **Sph S1.** *Spheroolithus* muestra 1; **Lmb.** Lambeosaurinae; **Sph S2.** *Spheroolithus* muestra 2; **Prsm.** *Prismatoolithus*; **NI.** Ootaxon no identificado. Los valores de la dimensión fractal (D) se encuentran entre 2.25 y 2.5, respectivamente (ver tabla 4-3 del anexo 4.1)

Los datos de la rugosidad se pueden confirmar con los perfiles obtenidos de las topografías tomadas por AFM, donde se puede ver que la superficie interna presenta una mayor rugosidad reflejada en la variedad del tamaño de las estructura observadas (Figura 4-7 y 4-8, sección SI1), mientras que la externa, presenta grandes estructuras que dan una apariencia casi lisa a la superficie (Figura 4-7 y 4-8, sección SE1), lo que indica que la formación de estructuras fue un poco más ordenada y lenta, permitiendo una baja variación del tamaño de las estructuras presentes en la superficie. Este comportamiento podría observarse en los perfiles verticales y horizontales (Figura 4-7 y 4-8, sección 2) realizados en las dos superficies de cada cascarón (para las otras especies, ver anexo 1). Además, del cascarón Lambeosaurinae (Figura 4-22, anexo 4.1), fue posible capturar la topografía de un poro con un diámetro de aproximadamente 3.5 μm .

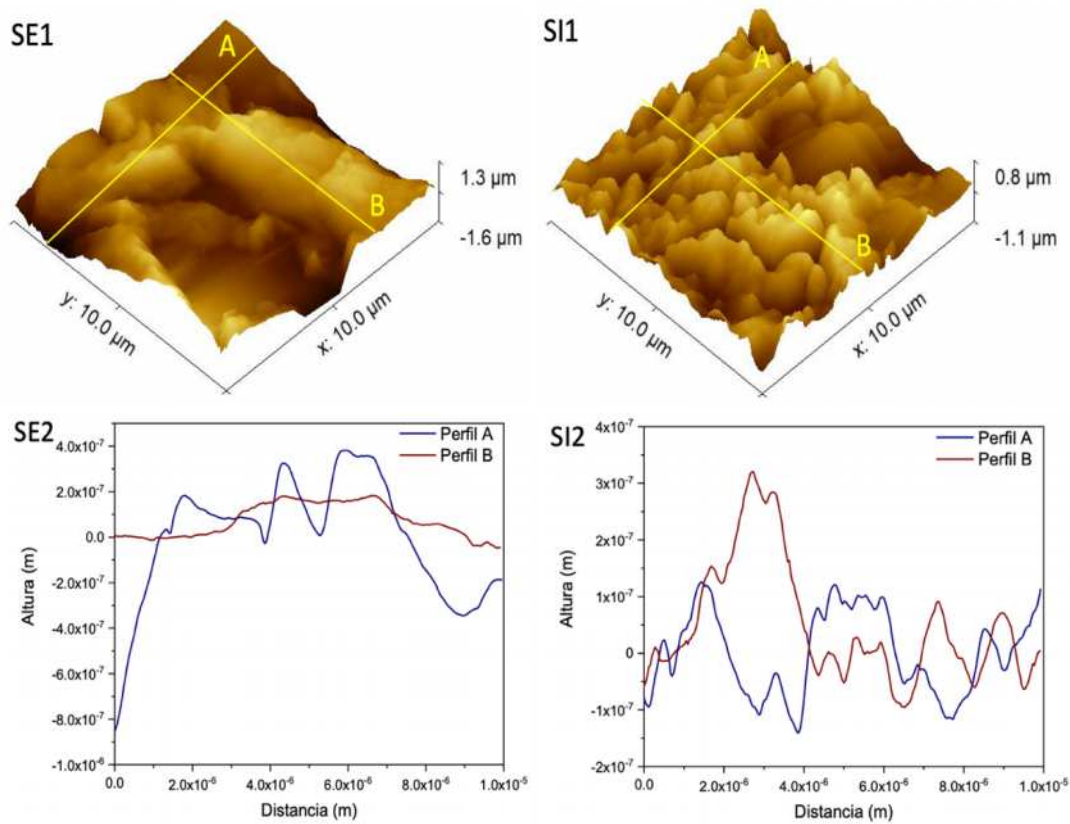


Figura 4-7. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 1. **SE.** Superficie externa; **SI.** Superficie interna; **1.** Imagen de AFM; **2.** Perfiles de las estructuras superficiales; **A.** Perfil correspondiente al eje X; **B.** Perfil correspondiente al eje Y

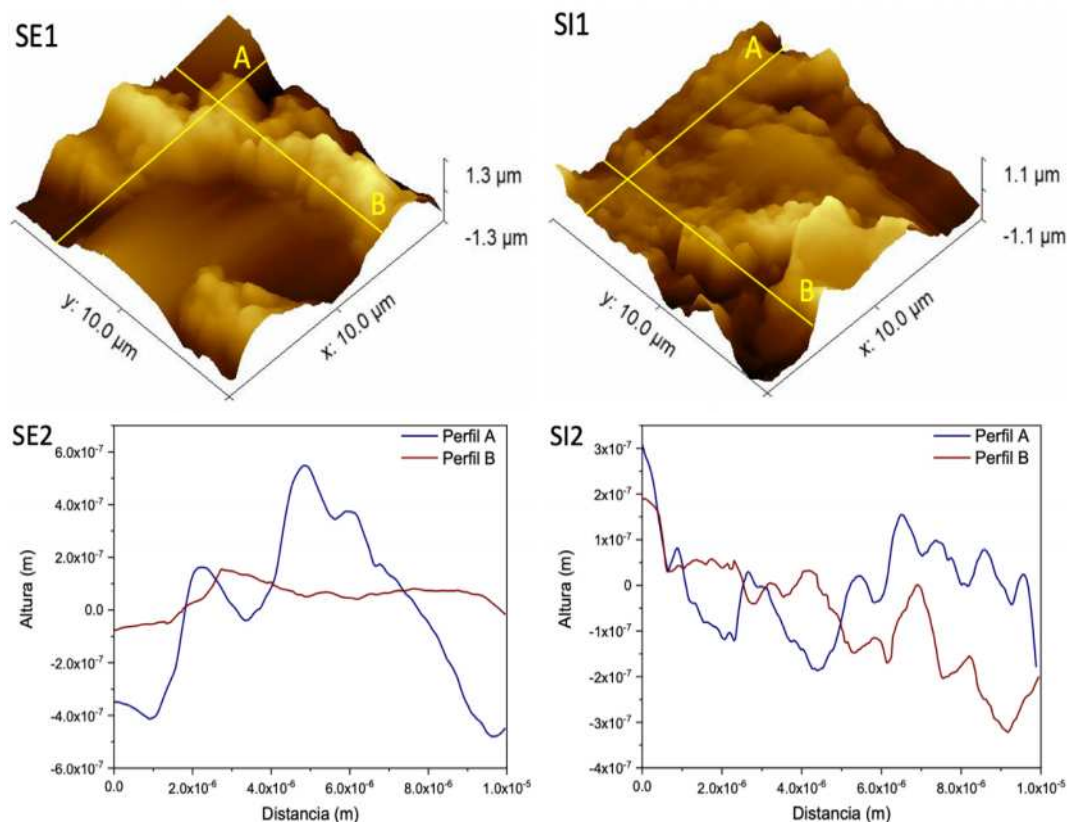


Figura 4-8. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del *Prismoolithus*. **SE.** Superficie externa; **SI.** Superficie interna; **1.** Imagen de AFM; **2.** Perfiles de las estructuras superficiales; **A.** Perfil correspondiente al eje X; **B.** Perfil correspondiente al eje Y

Finalmente, la rugosidad se confirmó calculando el área de superficie de cada cascarón (Figura 4-9), indicando que la superficie interna es más rugosa, presentando una relación con el tamaño de los poros determinado por las imágenes de SEM, que cuanto mayor sea el diámetro del poro, menor es la rugosidad presentada en la superficie. Por lo tanto, es posible que la relación entre el área superficial y la dimensión fractal sean directamente proporcional (Figura 4-10).

Tabla 4-1. Área superficial y rugosidad media de los cascarones de huevo de dinosaurio, basado en imágenes de AFM

Cascarón de huevo	Rugosidad Externa - μm^2 (Rugosidad Media (Sa) - nm)	Rugosidad Interna - μm^2 (Rugosidad Media (Sa) - nm)
<i>Spheroolithus</i> M1	143.4 (386.7)	152.2 (204.5)
Lambeosaurinae	109.7 (79)	112.0 (178.0)
<i>Spheroolithus</i> M2	133.6 (357.7)	145.4 (230.4)
<i>Prismoolithus</i>	135.8 (386.9)	137.3 (278.3)
No Identificado	130.2 (203.8)	139.4 (319.2)

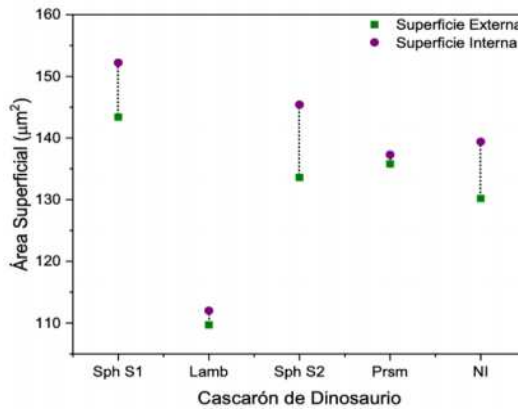


Figura 4-9. Área superficial basada de imágenes AFM de los cascarones de huevo de dinosaurio. **Sph S1.** *Spheroolithus* muestra 1; **Lmb.** Lambeosaurinae; **Sph S2.** *Spheroolithus* muestra 2; **Prsm.** *Prismatoolithus*; **NI.** Ootaxon no identificado. Los datos tabulados están en la Tabla 4-3 del anexo 4.1

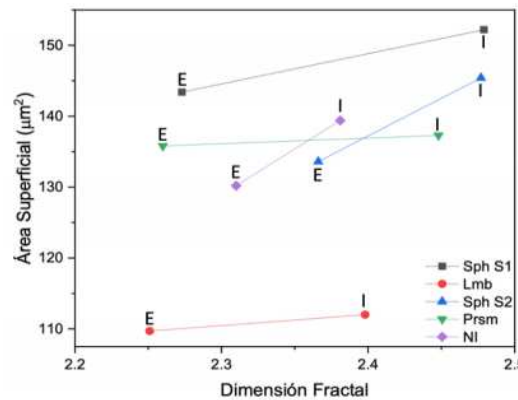


Figura 4-10. Correlación entre la dimensión fractal y el área superficial de los cascarones de huevo de dinosaurio. **E.** Superficie externa; **I.** Superficie interna; **Sph S1.** *Spheroolithus* muestra 1; **Lmb.** Lambeosaurinae; **Sph S2.** *Spheroolithus* muestra 2; **Prsm.** *Prismatoolithus*; **NI.** Ootaxon no identificado

4.3.3 Identificación del tamaño y morfología de los poros en cascarones de huevo de dinosaurio y especies actuales

Los resultados anteriores, se tomaron como un indicativo de que las estructuras y los poros presentados en la superficie interna de los cascarones son más pequeños, pero cuando se encuentran en abundancia, la rugosidad aumenta. Esta conclusión se corroboró mediante el análisis de la distribución de los poros utilizando las imágenes binarias obtenidas de SEM, las cuales se analizaron utilizando el software ImageJ. A partir de estas imágenes, se determinó el diámetro de los poros, de los cuales para el cascarón *Spheroolithus* muestra 1 (Figura 4-11, negro), presentó en la superficie externa poros con un diámetro entre 1.1-1.3 µm (Figura 4-11, 1A), mientras que, en la superficie interna, el tamaño de los poros fue más pequeño con valores aproximadamente de 1µm (Figura 4-11, 1B). Resultados similares fueron obtenidos de los

cascarones de la familia Lambeosaurinae (Figura 4-11, rojo) y *Spheroolithus* muestra 2 (Figura 4-11, azul), con la diferencia de que el último, presenta poros más grandes en la superficie externa comparados con las otras dos especies. Mientras que, *Prismatoolithus* (Figura 4-11, verde) y el ootaxon no identificado (Figura 4-11, púrpura), presentaron valores de aproximadamente 1-2 μm y 1.3-1.8 μm para la superficie externa y de 1.8-2.2 μm y 1.2-1.5 μm para la superficie interna, respectivamente, siendo estos los de mayor diámetro.

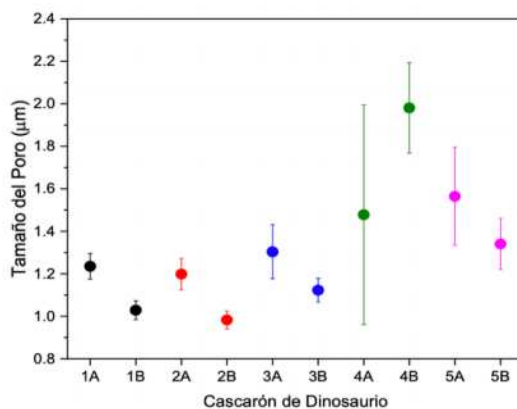


Figura 4-11. Distribución de los poros usando ImageJ de los cascarones de huevo de dinosaurio en estudio. E. Superficie externa; I. Superficie interna; 1. *Spheroolithus* muestra 1 (negro); 2. Lambeosaurinae (rojo); 3. *Spheroolithus* muestra 2 (azul); 4. *Prismatoolithus* (verde); 5. Ootaxon no identificado (púrpura).

Estos valores, comparados con los reportados por Carpenter (Tabla 4-2),²⁵ son consistentes a pesar de los procesos de fosilización a los que fueron sometidos los cascarones de huevo,^{26,27} como la recristalización de carbonatos de calcio pedogénicos²⁸ o fluidos hidrotermales provocados principalmente por vulcanismo,²⁹ que indujeron la formación de estructuras irregulares no propias del cascarón de huevo que se adhirieron a las superficies, provocando una deformación de las microestructuras de los cascarones de huevo (agregados cristalinos) lo que dificulta la visibilidad de los poros o la cobertura total de los mismos. Este mismo hecho, provoca que el valor de la rugosidad aumente, lo que, a su vez, incrementa el área superficial de ambas superficies de los cascarones de huevo.

Tabla 4-2. Distribución de los poros presentes en cascarones de huevo de dinosaurio.²⁵

Nombre del poro	Tamaño del canal (mm)	Abundancia (mm ²)	Intercambio	Ambiente
Angusticanaliculato	0.01-0.1	3-20/100	Bajo	Seco
Tubocanaliculato	0.5-0.2	400-500/100	Alto	Enterrado en montículos húmedos
Multicanaliculato	0.1-0.3	600-1000/100	Alto	Montículos húmedos
Prolatocanaliculato	0.05-1	30-150/100	Moderado	Variado
Rimocanaliculato	0.01-0.03	Indefinido	Indefinido	Seco
Obliquicanaliculato	Indefinido	Indefinido	Indefinido	Indefinido

En adición, la morfología de los poros de cada uno de los cascarones de huevo en estudio fue observados, los cuales están relacionados con el tamaño del poro determinado en la Figura 4-6. La Figura 4-12A correspondiente al *Spheroolithus* muestra 1, presenta un poro con un diámetro de aproximadamente 200 μm , con una cavidad más ancha en la superficie externa, que en la superficie interna. En el cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae (Figura 4-12B), que, a pesar de presentar un diámetro un poco más angosto, presenta una morfología similar a la observada en el cascarón de huevo *Spheroolithus* muestra 1, y siguiendo la teoría de Carpenter, el tipo de poro apropiado para estas dos muestras es el tubocanaliculato (Figura 4-13B) con un tamaño de canal de 0.5-0.2 mm. Además, *Spheroolithus* muestra 2, el cual pertenece a la familia Hadrosauridae al igual que las dos especies anteriores, presenta una diferencia en la morfología y el tamaño del poro (Figura 4-12C). En este caso, el poro presenta un diámetro de aproximadamente 100 μm , el cual corresponde al poro multicanaliculato (Figura 4-13C), con un canal de tamaño de 0.1-0.3 mm. Ambos poros, el tubocanaliculato y multicanaliculato muestran un alto intercambio con el medio ambiente debido a las condiciones en las que los huevos fueron depositados, el cual podría ser un ambiente húmedo. Por otro lado, otro tipo de poro es observado en el cascarón de huevo *Prismatoolithus* y en el ootaxon no identificado (Figura 4-12D y 4-12E), donde el poro que se observa es el prolatocanaliculato (Figura 4-13D), el cual se caracteriza por poseer un diámetro y una morfología variable, así como el ambiente en el que depositaron los cascarones de huevo.

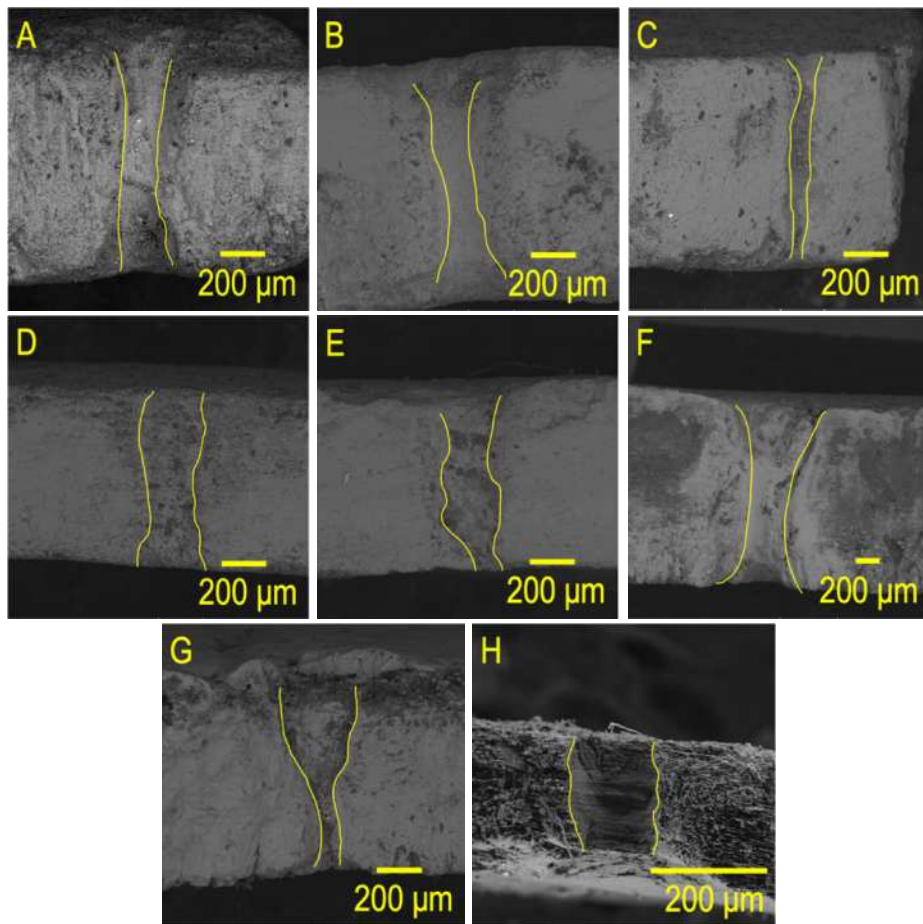


Figura 4-12. Morfología de los poros de los cascarones de huevo de dinosaurio bajo estudio y de las especies filogenéticamente relacionados. **A.** *Spheroolithus* muestra 1; **B.** Lambeosaurinae; **C.** *Spheroolithus* muestra 2; **D.** *Prismatoolithus*; **E.** Ootaxon no identificado; **F.** Avestruz; **G.** Emú; **H.** Cocodrilo.

Subsecuentemente, los poros de los cascarones de huevo de las especies actuales como el avestruz, emú y cocodrilo (Figura 4-12F, 4-12G y 4-12H) fueron determinados con el objetivo de observar la variabilidad de los poros en otras especies relacionadas filogenéticamente. En el caso del avestruz y emú (Figura 4-12F y 4-12G), especies que corresponden a la misma clase, del superorden Palaeognathae, presentan poros con diferente morfología. Este resultado puede ser evidencia de que la morfología de los poros no está relacionada con las especies del mismo orden. Al mismo tiempo, el avestruz y cocodrilo (Figura 4-12F y 4-12H) presentaron similitud en la forma con el poro observado en los cascarones de huevo *Spheroolithus* muestra 1 y Lambeosaurinae. Por otro lado, el poro observado en el cascarón de huevo de emú corresponde al rimocanaliculato (Figura 4-13E), el cual se caracteriza por presentar una forma de embudo con un diámetro externo mayor que el diámetro interno. Este tipo de poro es adecuado para deposiciones en ambientes secos.

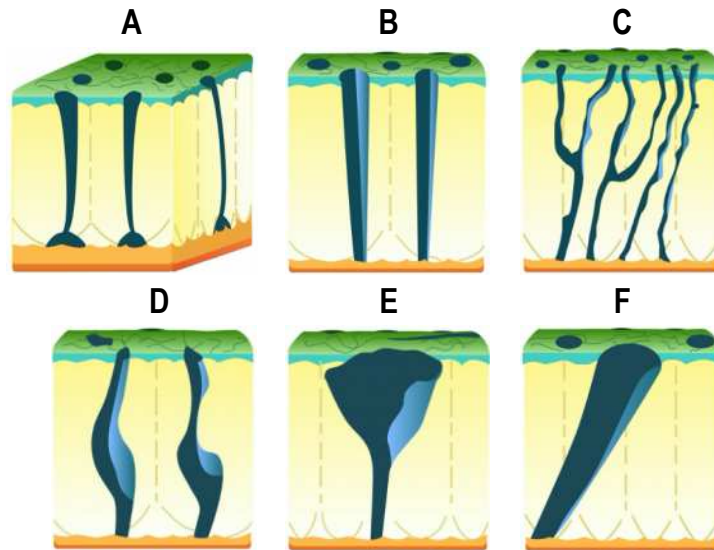


Figura 4-13. Diseño de los poros presentes en cascarones de huevo de dinosaurio. **A.** Angusticanaliculato; **B.** Tubocaniculato; **C.** Multicanaliculato; **D.** Prolatocaniculato; **E.** Rimocaniculato; **F.** Obliquicanaliculato.²⁵

4.4 CONCLUSIONES

La correlación de la información obtenida entre las dos técnicas (SEM y AFM) usando el análisis de la dimensión fractal mediante el método de conteo de cajas, permitió determinar la morfología de las estructuras presentes en las superficies, así como el tamaño de los poros desde las imágenes binarias (zonas negras) y la morfología de los poros desde las imágenes de la sección transversal. Además, se identificó que los poros de la superficie interna de los cascarones de huevo presentan diámetros pequeños, favoreciendo la formación de pequeñas estructuras, y, por lo tanto, otorgando una mayor rugosidad y superficie de área, evidenciando la relación entre la dimensión fractal (1D y 2D) y el área superficial.

Estos análisis fueron desarrollados con el propósito de obtener información acerca de la distribución de los poros y la rugosidad de los cascarones de huevo de dinosaurios, contribuyendo a la investigación enfocada en el estudio de superficies que presentan cierto grado de rugosidad y fractalidad en diferentes materiales. Además, identificar la superficie interna y externa de cascarones de huevos fosilizados, usando métodos que están disponibles a toda la sociedad científica, podría ser una gran contribución al área paleontológica, principalmente porque esta metodología podría ser aplicada a imágenes que son fáciles de obtener, como las imágenes ópticas.

4.5 ANEXOS

ANEXO 4.1

Determinación de la rugosidad y el tamaño del poro mediante SEM y AFM

El área superficial y la rugosidad fueron determinados mediante la dimensión fractal en ambas superficies de los cascarones de huevo usando imágenes de SEM y AFM, respectivamente. Además, el tamaño de los poros fue determinado con imágenes de SEM usando ImageJ y Digital Micrograph Software.

Tabla 4-3. Dimensión fractal de las superficies de los cascarones de huevo de dinosaurio usando imágenes binarias de SEM e imágenes de AFM

Cascarón de Dinosaurio	Imágenes SEM		Imágenes AFM	
	SE	SI	SE	SI
<i>Spheroolithus</i> muestra 1 (I)	1.8136	1.8452	2.273	2.479
Lambeosaurinae (II)	1.6947	1.7827	2.251	2.398
<i>Spheroolithus</i> muestra 2 (III)	1.8009	1.8052	2.366	2.477
<i>Prismatoolithus</i> (IV)	1.8622	1.8674	2.260	2.448
Ootacon no identificado (V)	1.8391	1.8521	2.310	2.381

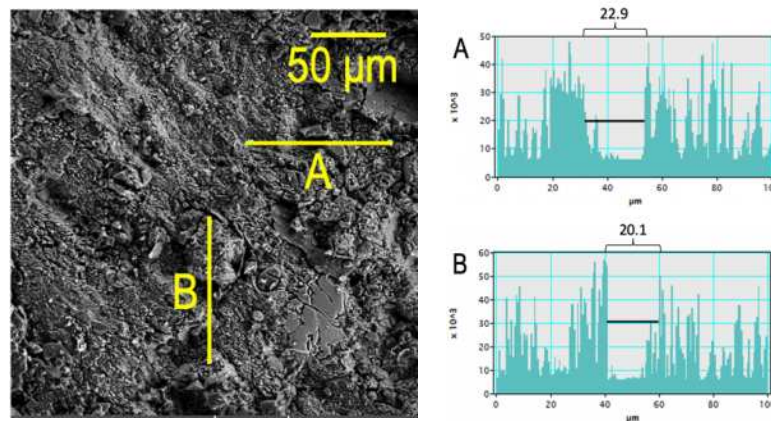


Figura 4-14. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

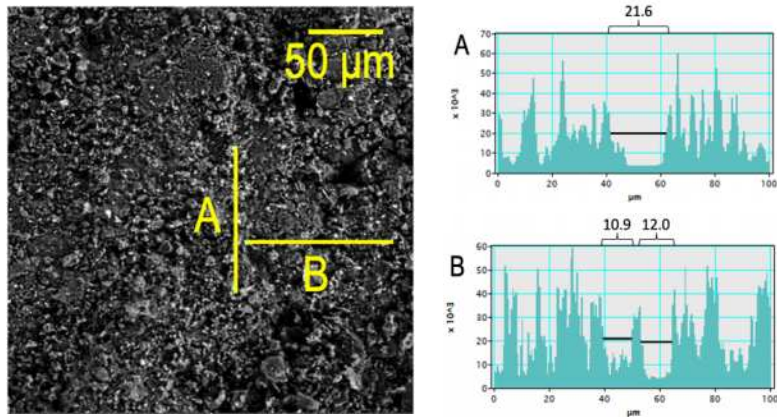


Figura 4-15. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

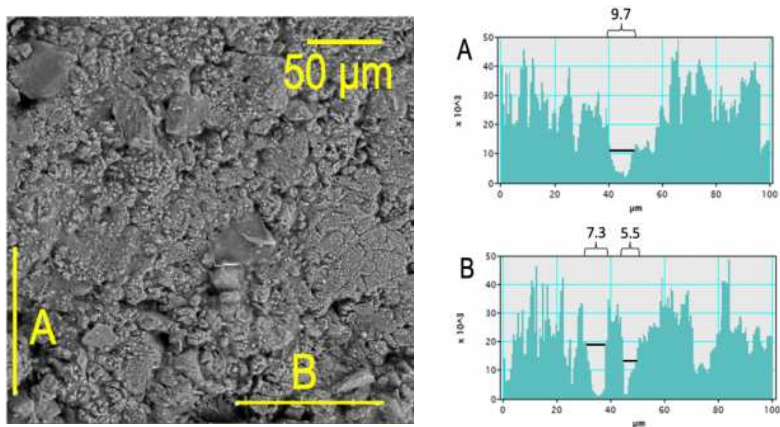


Figura 4-16. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

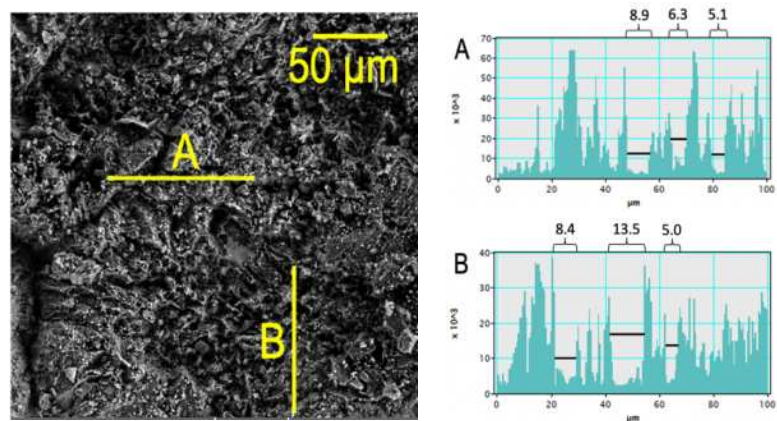


Figura 4-17. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

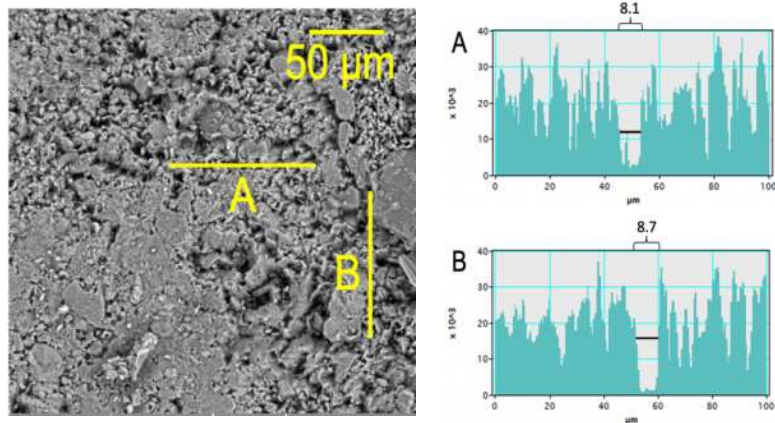


Figura 4-18. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del *Pristatoolithus*. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

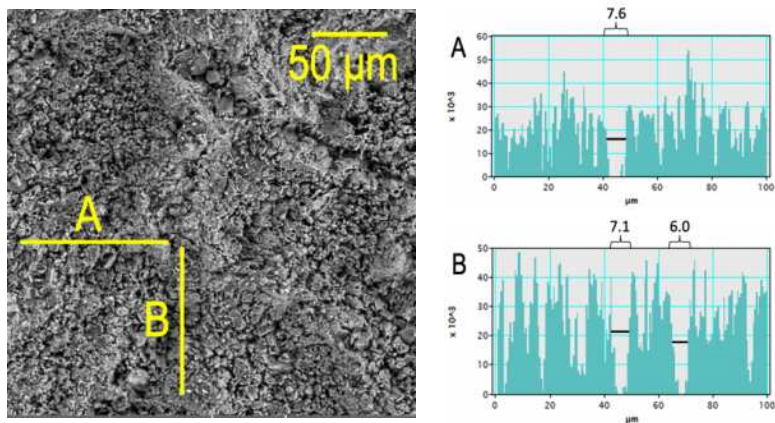


Figura 4-19. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del *Pristatoolithus*. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

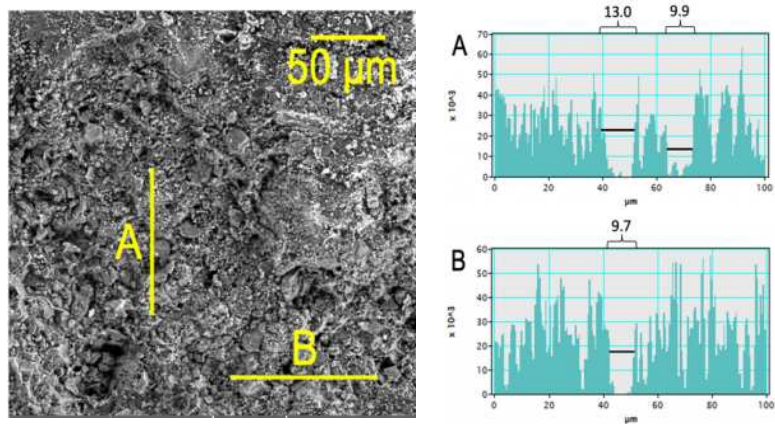


Figura 4-20. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie externa del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

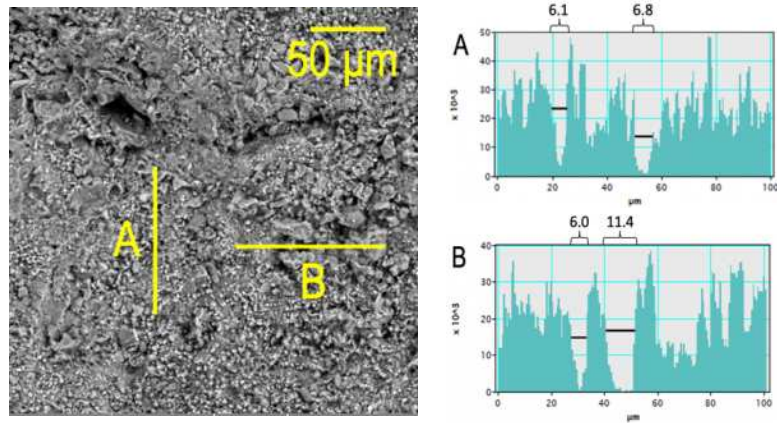


Figura 4-21. Imagen de SEM y perfil de rugosidad indicando el tamaño aproximado de los poros de la superficie interna del cascarón de huevo del ootaxon no identificado. **A.** Perfil A; **B.** Perfil B

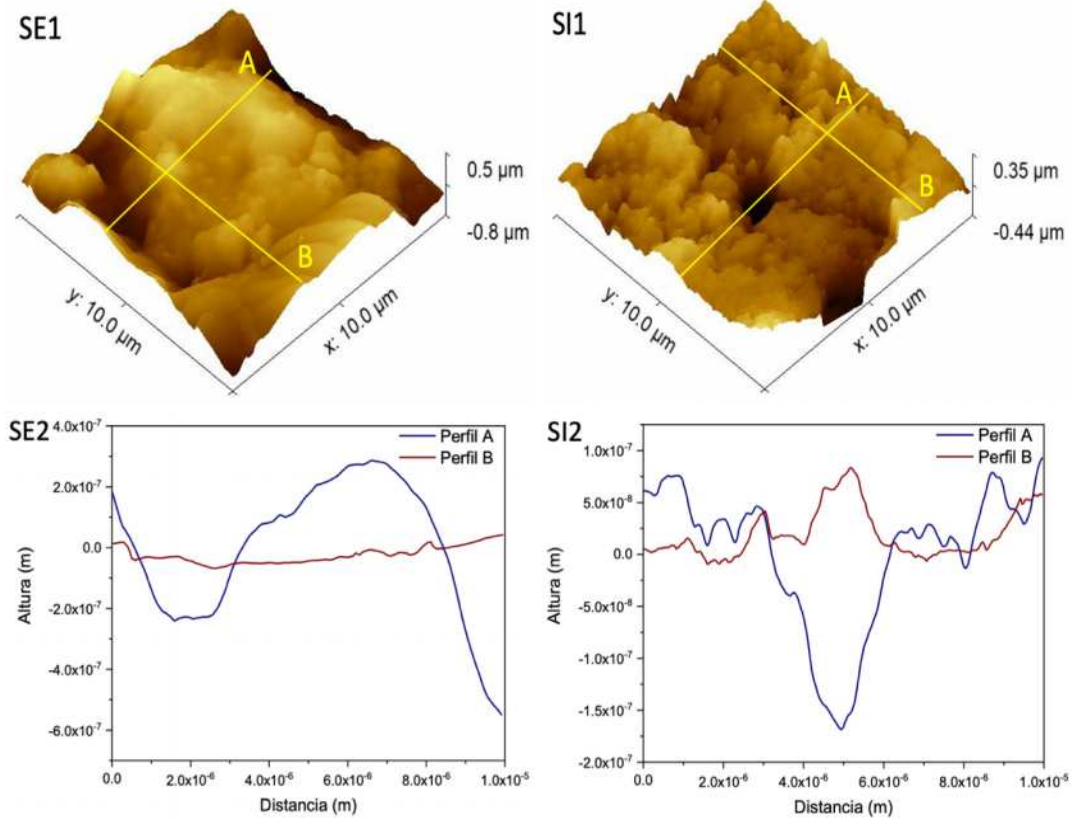


Figura 4-22. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo de la familia Lambeosaurinae. **SE.** Superficie externa; **SI.** Superficie interna; **1.** Imagen de AFM; **2.** Perfiles de las estructuras superficiales; **A.** Perfil correspondiente al eje X; **B.** Perfil correspondiente al eje Y

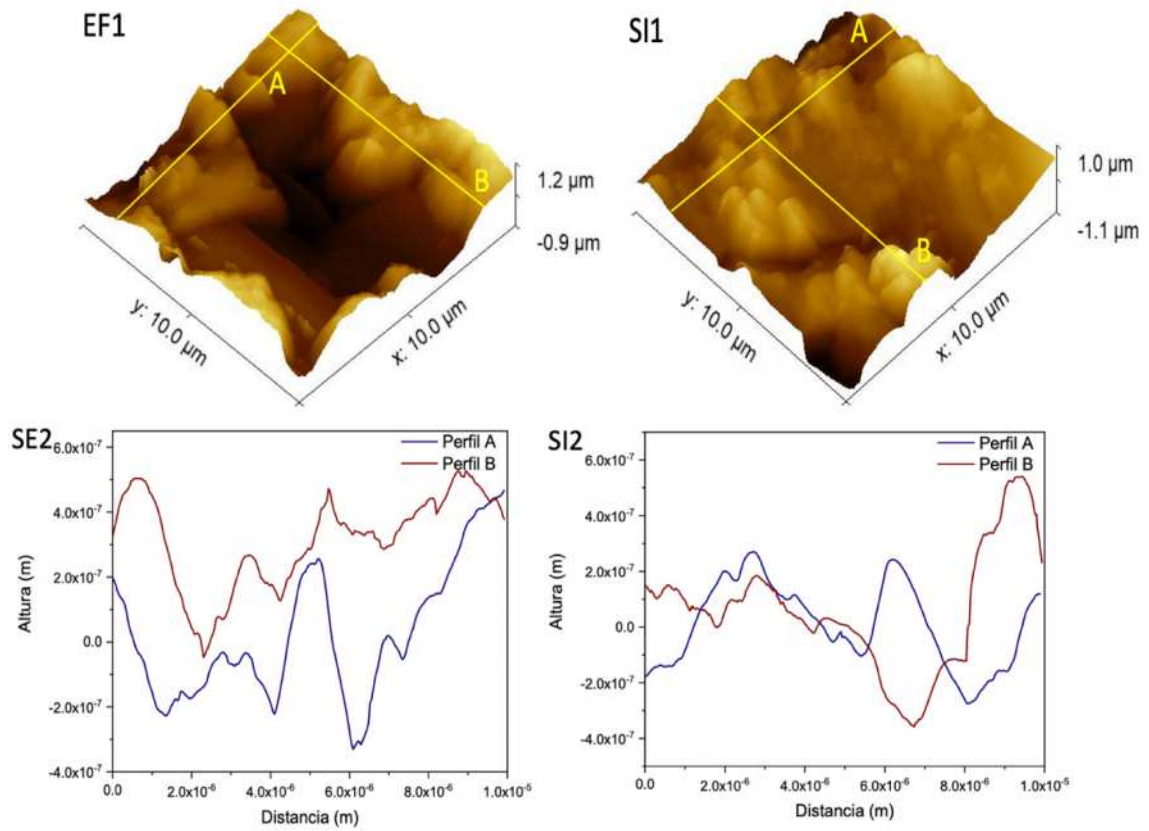


Figura 4-23. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascarón de huevo del *Spheroolithus* muestra 2. **SE.** Superficie externa; **SI.** Superficie interna; **1.** Imagen de AFM; **2.** Perfiles de las estructuras superficiales; **A.** Perfil correspondiente al eje X; **B.** Perfil correspondiente al eje Y

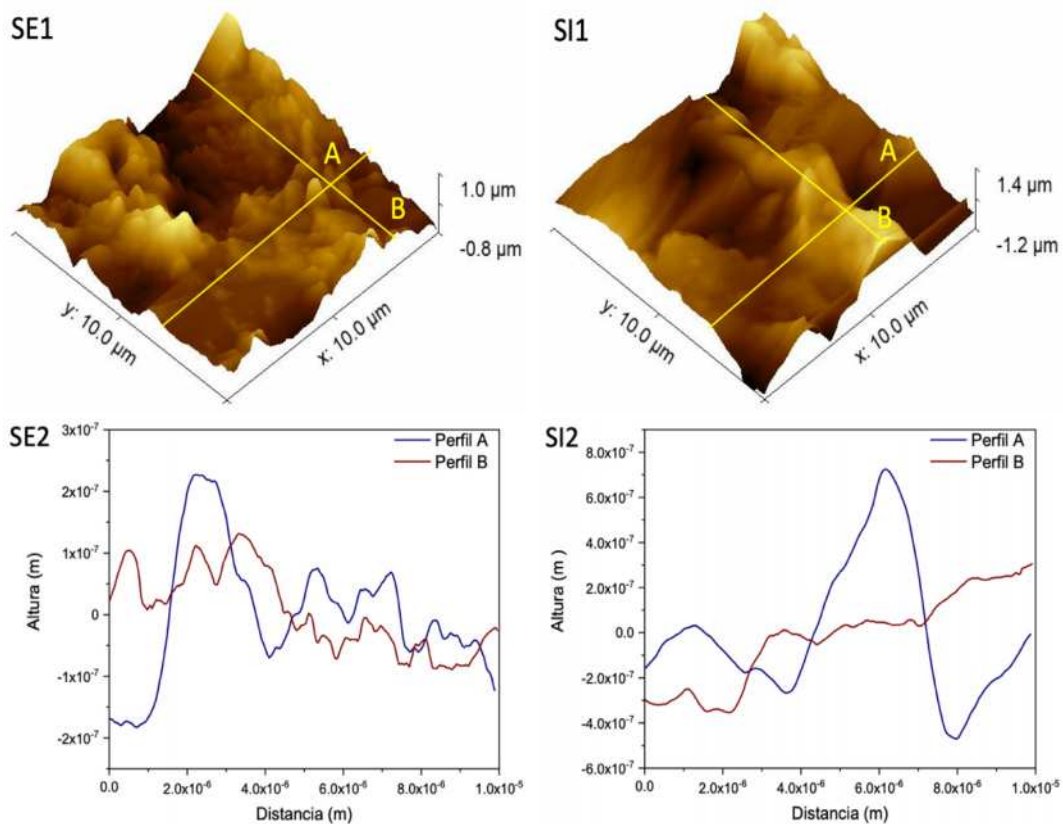


Figura 4-24. Topografías y perfiles del tamaño de poro en las superficies del cascaron de huevo del ootaxon no identificado. **SE.** Superficie externa; **SI.** Superficie interna; **1.** Imagen de AFM; **2.** Perfiles de las estructuras superficiales; **A.** Perfil correspondiente al eje X; **B.** Perfil correspondiente al eje Y

Capítulo 5.

Relación Bioquímica de los Cascarones de Aves y Reptiles con Otras Especies

5.1 INTRODUCCIÓN

La biomineralización del huevo es un proceso controlado por proteínas que conforman la matriz orgánica. Este proceso se lleva a cabo en el útero, en medio del fluido uterino libre de células y rico en minerales y proteínas necesarios para la formación del cascarón.^{1,2} En el fluido uterino, se han determinado más de 50 proteínas que desarrollan diferentes funciones como formación de proteoglicano, proteínas chaperonas, proteasas, antibacterianas y mineralización.³ Además, en el cascarón de huevo, la matriz orgánica se compone de 70% proteínas y 11% de proteoglicanos y polisacáridos.⁴

Las proteínas se dividen en tres grupos: 1) proteínas ubicuas; 2) proteínas de la clara de huevo; 3) proteínas específicas del cascarón. Las proteínas ubicuas se encuentran en tejidos como colágeno tipo X, osteopontina y clusterina. Las proteínas de la clara de huevo, como su nombre lo indica, se encuentran en la clara de huevo y en el cascarón como albúmina, ovotransferrina y lisozima. Y las proteínas específicas del cascarón, son las implicadas en el proceso de biomineralización y se encuentran principalmente en la fase mineral del cascarón.^{5,6} Estas proteínas se distinguen por poseer un dominio tipo lectina tipo C (CTLD, por sus siglas en inglés), similar al dominio que poseen las lectinas tipo C, las cuales, a su vez, son similares a lectinas dependientes de calcio.⁷

Las CTLD, son proteínas que contienen aproximadamente de 110 a 140 aminoácidos.^{8,9} Estas proteínas están relacionadas con la formación cristalina del cascarón y su función se puede determinar gracias al uso de herramientas computacionales que han permitido predecir dicha función a partir de su historia o información evolutiva.^{10,11} La relación evolutiva presente entre uno o varios grupos de proteínas depende del ancestro común del que provengan. Si provienen de un mismo ancestro común, estas proteínas se les denomina homólogas, pero a su vez, se dividen en parálogas y ortólogas. Las parálogas son las que se producen por duplicación genética y presentan diferencias en sus funciones bioquímicas, mientras que las ortólogas están separadas por eventos de especiación y presentan funciones bioquímicas similares.¹²⁻¹⁴

Existen varios métodos para identificar homólogas utilizando como criterios diferentes servidores y algoritmos. Un ejemplo es el servidor BLAST, que contiene varios algoritmos para la búsqueda de proteínas en función a las necesidades. QuickBLASTP la cual es una versión acelerada de BLASTP que es muy rápida y funciona mejor si el porcentaje de identidad objetivo es 50% o más. BLASTP simplemente compara una consulta de proteínas con una base de datos de proteínas. PSI-BLAST permite al usuario construir una PSSM (matriz de puntuación específica de la posición) utilizando los resultados de la primera ejecución de BLASTP. PHI-BLAST realiza la

búsqueda, pero limita las alineaciones a aquellas que coinciden con un patrón en la consulta. DELTA-BLAST construye un PSSM utilizando los resultados de una búsqueda en la base de datos de dominios conservados y busca en una base de datos de secuencia.^{15,16} En el caso de requerir una búsqueda de homólogos para un análisis filogenético de familias de genes, suelen emplearse QuickBLASTP (>50% identidad, >50% cobertura) si son secuencias muy conservadas y BLASTP (20% identidad, 20 cobertura) si son pocas conservadas. PSI-BLAST, PHI-BLAST, DELTA-BLAST son búsquedas más restrictivas o informativas con búsquedas de puntuación específica, patrones de consultas o dominios, lo que puede conllevar al aumento en el número de secuencias a analizar, y la mayoría no están relacionadas a las familias de genes.^{15,16}

Para identificar las relaciones evolutivas entre las proteínas o genes es necesario analizar la filogenia mediante la construcción de un árbol filogenético que ilustra las relaciones que se conservan entre las secuencias a analizar. La construcción de un árbol se lleva a cabo mediante cuatro pasos: 1) Identificación y alineación de las secuencias; 2) Estimación del árbol a partir de las secuencias; 3) Construcción del árbol; 4) Evaluación del árbol. En un árbol filogenético, las especies se encuentran ramificadas y unidos por nodos o puntos de ramificación, los cuales indican la divergencia entre cada especie o el ancestro común más reciente de las especies que descienden de esa ramificación. Entre más relacionadas estén dos especies entre sí, tendrán un ancestro común más reciente (Figura 5-1).^{17,18}

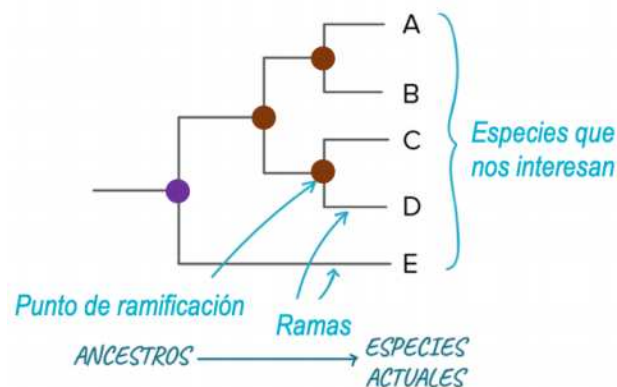


Figura 5-1. Ejemplo de un árbol filogenético. Se puede observar los puntos de ramificación (puntos cafés) obtenidos por duplicación génica o especiación, y el ancestro común de las secuencias (punto morado)

Por lo tanto, este capítulo está enfocado en el estudio de las proteínas intraminerales de cascarones de huevo de especies actuales como avestruz, emú, y cocodrilo, y la posible relación que presentan con las proteínas de otras especies mediante la construcción de un árbol filogenético.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Proteínas intraminerales

5.2.1.1 Aislamiento de proteínas intraminerales

Los cascarones de avestruz, emú y cocodrilo se lavaron con una solución de EDTA al 5% (ácido etilendiaminotetraacético) por 45 minutos con el objetivo de eliminar la membrana orgánica e impurezas presente en las muestras. Posteriormente, se lavaron con agua Milli-Q y se secaron al ambiente. Una vez los cascarones estuviesen limpios y secos, se trituraron hasta obtener un tamaño de partícula similar al del polvo fino, el cual se disolvió en una solución de ácido acético (AcOH) al 10% en una relación 20 mL de ácido acético por 1 g de huevo y se dejan en agitación por 72 h a 4°C. Pasado el tiempo, las muestras se colocaron a una temperatura de -30°C durante 12 h, para realizar el proceso de crioconcentración, siguiendo los pasos de Virgen-Ortiz, et al.¹⁹ Por último, la solución se concentró durante 30 min, a 6000 rpm, en 4°C, mediante el uso de una centrifuga LISA Centrifuge AFI-C200R, y una membrana de corte molecular de 3 kDa y 10 kDa. El concentrado es separado para la posterior purificación de las proteínas.

5.2.1.2 Purificación de proteínas intraminerales

La separación y purificación de las proteínas se llevó a cabo mediante cromatografía líquida. Como primera instancia, se empleó cromatografía de fase reversa, la cual permite la separación de moléculas de acuerdo con su polaridad. Para este ensayo, se utilizó cromatografía líquida ultra rápida (UPLC, por sus siglas en inglés) utilizando un equipo UPLC Shimadzu Liquid Chromatograph LC-20AT, empleando una columna de fase reserva Júpiter C18 (250 mm x 10 mm) y un volumen de muestra de 1 mL. La fase móvil fue TFA al 0.1% en acetonitrilo (ACN, grado HPLC) con un gradiente lineal de 0-100% en 60 minutos, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.

En segunda instancia se utilizó cromatografía de exclusión molecular, la cual consiste en la separación de proteínas de acuerdo con su peso molecular. El método consiste en el uso de una resina con poros de diferentes tamaños a través de los cuales las proteínas se difunden a una velocidad directamente proporcional a su tamaño. Para este ensayo, se empleó la cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad (FPLC – fast protein liquid chromatography) en un AKTA PURE, con una columna de filtración en gel Superdex 75 Increase 10/300 GL, y un volumen de muestra de 1 mL. La velocidad de flujo fue 0.5 mL/min y 0.3 mL/min en 1.5 VC (volúmenes de columna), empleando como fase móvil diferentes buffers como Tris-HCl 50 mM pH 8.0,

bicarbonato 50 mM pH 7.8, fosfatos 10 mM pH 7.55, acetato de amonio 100 mM pH 5.0 + 1.0 M guanidina, y Citratos 50 mM pH 3.6.

Como tercera instancia, se llevó a cabo cromatografía de intercambio iónico, la cual se basa en la separación de proteínas de acuerdo con la carga de su superficie. Este método consiste en las interacciones iónicas entre los grupos polares cargados de la superficie de las proteínas y la resina de la columna a utilizar. El método empleado fue intercambio catiónico utilizando una columna HiTrap SP HP de 1 mL en un AKTA PURE, con un volumen de muestra de 1 mL, y una velocidad de flujo de 1 mL/min, en gradiente lineal de 0-100% en 30 minutos. Las fases móviles fueron: Buffer A: citratos 50 mM pH 3.6; Buffer B: citratos 50 mM pH 3.6 + 1.0 M NaOH.

5.2.1.3 Identificación de las proteínas intraminerales

La identificación de las proteínas se realizó mediante electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE – sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), mediante la determinación de bandas o patrones característicos de las proteínas obtenidas de la separación. Los geles se corrieron en un sistema de separación vertical Mini-PROTEAN 3 (Biorad), con placas de vidrio de 0.75 mm de grosor, 10 cm de altura, y, 7 cm de ancho. Las muestras se incubaron con el tampón de carga en una relación 2:1 muestra/buffer durante 8 min a 90°C (ver tabla 2), y se utilizó una intensidad de 30 V por 30 min (hasta que las bandas toquen el gel separador), luego 120 V por 1 h 45 min. La tinción de los geles se realizó con azul de Coomassie R-250 al 0.5% (p/V) en ácido acético:metanol:H₂O (1:4:5) a temperatura ambiente durante 1 h min, y posteriormente, se llevó a cabo la decoloración de los geles, utilizando una solución de decoloración por 30 min. Finalmente, los geles se dejan en agua Millil-Q durante 12 h.

5.2.1.4 Determinación del peso molecular

La espectrometría de masas se llevó a cabo para determinar el peso molecular de las proteínas aisladas, mediante el uso de un espectrómetro Buker Esquire, utilizando la técnica MALDI-TOF (Matriz-Assisted Lase Desorption/Ionization) con una matriz 1:1 de ácido sinapínico (SA) y ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), permitiendo la ionización de las de la matriz y de la proteína mediante la irradiación de un láser. Una vez ionizadas las moléculas, la separación se lleva cabo en función la relación masa/carga.

5.2.1.5 Análisis mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS)

El radio hidrodinámico (Rh) y la polidispersidad (pureza) de las proteínas, se determinó mediante el uso de un DLS Malvern Nano S Zetasizer con un láser NIBS (Non Invasive Back Scattering) de longitud de onda de 633 nm a 25°C, con un controlador de temperatura Peltier, utilizando una celda de cuarzo ZEN2112 con un volumen de muestra de 60 μ L. Las muestras se filtraron utilizando un filtro de tamaño de poro 0.02 μ L, y se realizaron mediciones por triplicado.

5.2.1.6 Crecimiento de cristales

Los ensayos de cristalización se realizaron utilizando la técnica de gota sedente en placas de 96 pozos Compact Clover de Jena Biosciences, con el fin de determinar las condiciones adecuadas de cristalización, utilizando el Kit de cristalización JBScreen Classic 7 (MPD based) a 4°C y 18°C (anexo 5.1).

5.2.2 Construcción del árbol filogenético

5.2.2.1 Inferencia evolutiva de las estruthiocalcinas

El análisis preliminar de la distribución filogenética se realizó utilizando la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) tomando como base la secuencia de aminoácidos de la proteína estruthiocalcina-1 (SCA-1) y estruthiocalcina-2 (SCA-2), utilizando el algoritmo Quick BLASTP (Accelerated protein-protein Blast) con una matriz Blosum62 y un *E*-value < 0.05, restringiendo la búsqueda al reino animalia y excluyendo a mamíferos. La selección de las secuencias se hizo manualmente para evitar la repetición de secuencias y la parcialidad de las mismas. Para concluir el curado, se utilizó el servidor Isoelectric Point Calculator, identificando la relación del punto isoeléctrico (PI) con el peso molecular (PM), confirmando la selección de las proteínas a utilizar.

5.2.2.2 Identificación de los residuos evolutivamente conservados y construcción del árbol filogenético

La identificación se realizó en las proteínas identificadas anteriormente, realizando primeramente un análisis SDT (Sequence Demarcation Tool versión 1.2) utilizando el método de Muscle. Posteriormente, el marcaje y la identificación de la secuencia conservada de cada orden identificado se desarrolló usando el servidor Clustal Omega.²⁰ Finalmente, la construcción del árbol se llevó a cabo utilizando el software MEGAX, mediante el método de MUSCLE, para la

identificación del mejor modelo evolutivo. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron automáticamente aplicando algoritmos Neighbour-Join y BionNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el modelo JTT, y luego, se selecciona la topología con el mayor valor de probabilidad logarítmico.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1 Aislamiento de proteínas intraminerales presentes en los cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo

Como materia de partida se utilizó cascarón de huevo de avestruz, el cual posee las proteínas SCA-1 y SCA-2. Se tomaron 200 g de cascarón de huevo triturado y se disolvieron en 4.0 L de AcOH 10%, el cual se adiciona poco a poco para evitar la formación de espuma no controlada obtenida por la formación de CO₂ gaseoso, provocando la pérdida de la muestra. La solución que contiene el cascarón de huevo se deja en agitación por 72 h a 4°C hasta que no se observe más la efervescencia. Posteriormente, el extracto se filtró dos veces utilizando un sistema tipo embudo Büchner con un filtro Millipore de 0.22 µm y se concentró utilizando la técnica de crioconcentración, basada en el uso de las propiedades coligativas del sistema agua-proteína,¹⁹ permitiendo obtener la proteína por su bajo punto de congelación, la cual se dializó mediante el uso de una membrana de corte de 3 kDa en ácido acético al 5% por 24 h en agitación constante a 4°C, con el fin de eliminar partículas de pequeño peso molecular y restablecer el equilibrio. Finalmente, el extracto se concentró utilizando tubos Millipore con filtro de membrana de 10 kDa a 3500 rpm por 15 min a 4°C, obteniendo una concentración final de 4.5 mg/mL en 5 mL de extracto.

De cada paso realizado, se tomó una alícuota para realizar un gel y observar el comportamiento de las proteínas, identificando que, durante cada paso previo a la purificación, no se observa oligomerización de las proteínas, y se observan las bandas características de las proteínas SCA-1 y SCA-2 (15.2 kDa y 16.8 kDa, respectivamente). Posteriormente, se continúa con el cascarón de huevo de emú (150 g de material triturado) y de cocodrilo (5 g de material triturado), utilizando la metodología desarrollada con el cascarón de huevo de avestruz, obteniendo una concentración de 3.8 mg/mL en un volumen final de 4.0 mL para la muestra de emú (DCA-1: 16.3 kDa y DCA-2: 16.6 kDa), y de 3.3 mg/mL en un volumen de 3.5 mL para la muestra de cocodrilo (CCA-1 y CCA-2), respectivamente.

5.3.2 Optimización del método para la purificación de proteínas intraminerales

5.3.2.1 Purificación mediante UPLC

Para la purificación de proteínas, se utilizaron dos tipos de columnas, una de filtración en gel, la cual separa las proteínas de acuerdo con el peso molecular, y otra de fase reversa, permitiendo la separación en base a la polaridad. La separación por filtración en gel se lleva a cabo por difusión, gracias al tamaño de los poros que presenta la resina, por los cuales, las moléculas se difunden a una velocidad directamente proporcional a su peso molecular, y la separación por fase reversa se ejecuta mediante interacciones hidrofóbicas molécula-resina.

5.3.2.1.1 Proteínas del cascarón de huevo de cocodrilo (CCA-1 y CCA-2)

Una vez identificadas las proteínas del cascarón de huevo del cocodrilo, su purificación se inicia con el método de fase reversa con un volumen de inyección de 1.0 mL, permitiendo así la separación de cuatro picos (Figura 5-2A), que mediante un gel de electroforesis desnaturalizante se observaron dos bandas características de 7 kDa (Figura 5-2B).

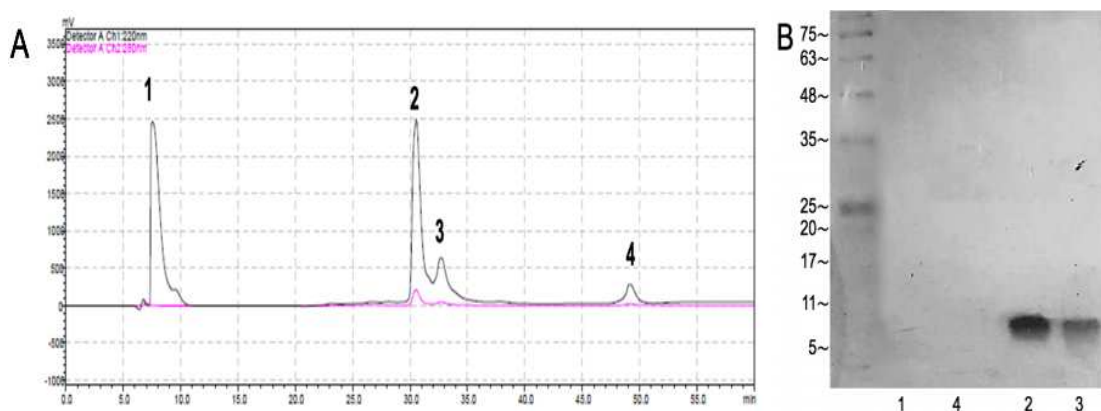


Figura 5-2. A. Cromatograma correspondiente al cascarón de huevo de cocodrilo. **B.** Gel de SDS-PAGE al 12% de la purificación de las CCA-1 (fracción 2) y CCA-2 (fracción 3) usando fase reversa. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa

Una vez obtenidas las proteínas, se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF con el objetivo de determinar el peso molecular de las dos bandas observadas anteriormente. Las fracciones 2 y 3 presentaron un peso molecular de 6.9 kDa y 7.0 kDa, respectivamente (Figura 5-3), y una concentración final de 0.7 mg/mL en 200 μ L para la CCA-1 (fracción 2) y 0.3 mg/mL en 100 μ L para la CCA-2 (fracción 3), con un diámetro hidrodinámico en un buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 de 0.6 nm para cada una (Figura 5-4).

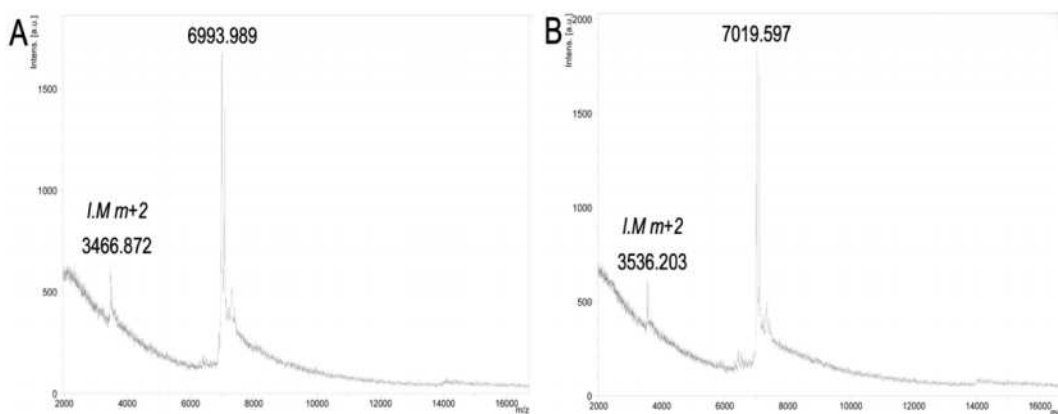


Figura 5-3. Espectros de masa de las proteínas CCA-1 (A) y CCA-2 (B). I.M. Ion molecular

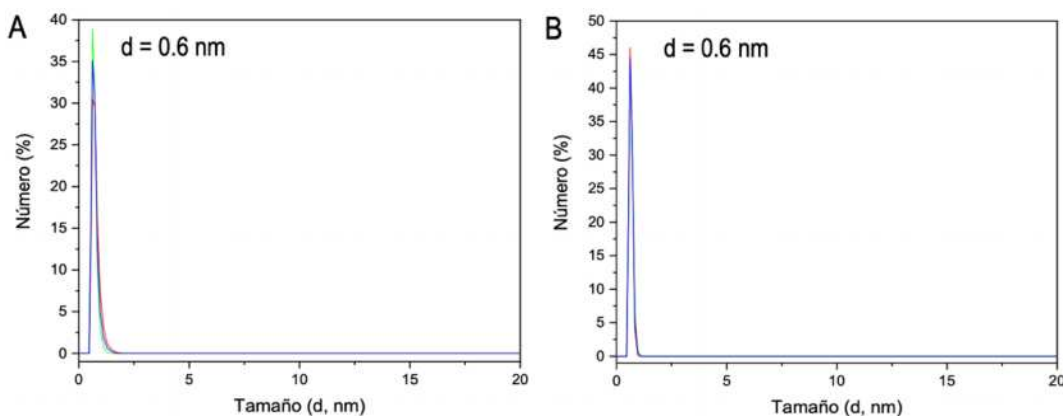


Figura 5-4. DLS de las proteínas crococalcina-1 (CCA-1, A) y crococalcina-2 (CCA-2, B). d. Diámetro hidrodinámico

5.3.2.1.2 Cristalización de las proteínas de cascarón de huevo de cocodrilo

La cristalización de las proteínas obtenidas se llevó a cabo de acuerdo con la información reportada por Reyes-Grajeda, et al.,²¹ utilizando el kit JBScreen Classic 7-MPD based CS-107L (Figura 17, anexo 1) empleando el método de difusión en fase vapor de gota sedente. La concentración de proteína que se utilizó fue de 0.7 mg/mL (en 200 μ L) para la CCA-1 y 0.4 mg/mL (en 100 μ L) para la CCA-2, y se realizó dos ensayos, uno a 4°C y otro a 18°C, en una proporción 1:1 proteína:agente precipitante, para un volumen final de 1 μ L.

Una vez transcurrido dos semanas, solo se obtuvieron cristales en los ensayos realizados a 4°C, en las condiciones A3, A6, C6 y D2, respectivamente. Los cristales obtenidos, fueron sumergidos en una solución crioprotectora (glicerol 30%) para su difracción, pero los patrones obtenidos correspondían a sales inorgánicas y no a monocristales de proteína.

Por lo tanto, una vez purificadas las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de cocodrilo, se continuó con la purificación de las proteínas pertenecientes al cascarón de huevo de emú y avestruz, pero en estas muestras no se observó una óptima separación.

5.3.2.2 Purificación mediante FPLC

Una vez realizado el aislamiento de las proteínas SCA, DCA y CCA, mencionado en el inciso 3.1, se continuó con su purificación.

5.3.2.2.1 Proteínas de cascarón de huevo de avestruz (SCA-1 y SCA-2)

La purificación de las proteínas inició empleando cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Superdex 75 Increase 10/300 GL, un buffer de Citratos 50 mM pH 3.6 y una velocidad de flujo de 0.5 mL/min.²² Del cromatograma obtenido (Figura 5-5A), se colectaron 4 fracciones (tabla 5-1) las cuales se observaron por gel SDS-PAGE (Figura 5-5B), revelando que las fracciones 2, 3 y 4 contenían mezcla de las dos proteínas.

Tabla 5-1. Fracciones colectadas de las inyecciones realizadas con citratos 50 mM pH 3.6 con un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones se colectaron cada 1 mL. **Fxn:** Fracción; **Vol:** Volumen inicial de la fracción

Fxn	1	2	3	4
Vol (mL)	12.5	13.5	14.5	15.5

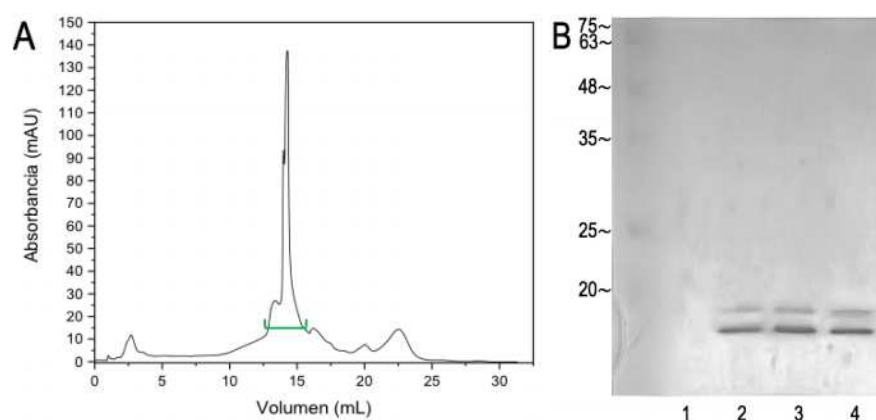


Figura 5-5. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 12% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de avestruz mediante el método filtración en gel utilizando citratos 50 mM pH 3.6 como fase móvil y una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. La línea verde indica las fracciones que se tomaron para el gel, las cuales se encuentran tabuladas con su respectivo volumen. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa

Con el fin de separar las dos proteínas observadas anteriormente, se realizó otro ensayo cambiando la velocidad de flujo a 0.3 mL/min (Figura 5-6A). De este ensayo, se identificaron dos picos los cuales se colectaron y se observaron en SDS-PAGE al 12%, permitiendo identificar por separado que la banda 1 corresponde a la SCA-1 (~17 kDa) y la banda 2 a la SCA-2 (~15 kDa) (Figura 5-6B).

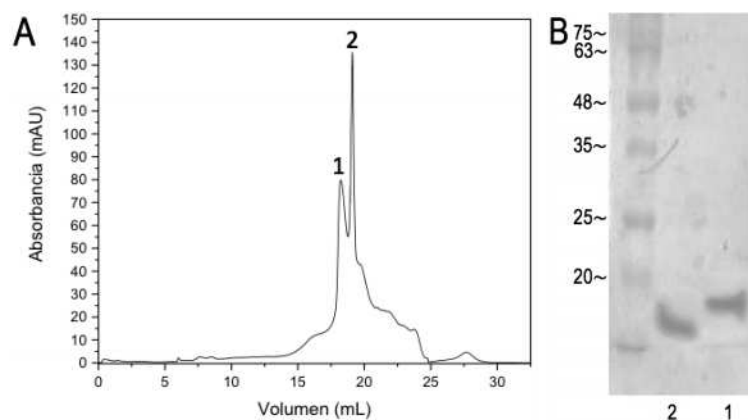


Figura 5-6. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 12% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de avestruz mediante el método filtración en gel utilizando citratos 50 mM pH 3.6 como fase móvil y una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa

5.3.2.2.2 Proteínas de cascarón de huevo de emú (DCA-1 y DCA-2)

Una vez purificadas las proteínas SCA del cascarón de huevo avestruz, se continúa con la purificación de las proteínas DCA presentes en el casarón de huevo de emú. Para su purificación, se realizó un ensayo mediante el método de intercambio catiónico, utilizando una columna HiTRAP SP HP. Las fases móviles utilizadas fueron citratos 50 mM pH 3.6 como Buffer A y citratos 50 mM pH 3.6 + 1.0 M NaCl como Buffer B. En la Figura 5-7A, podemos ver que en el cromatograma se observa la obtención de dos picos identificados como 1 y 2, con absorbancias pequeñas, y con proteína presente solo en el pico 2, cómo lo evidencia el gel de SDS-PAGE (Figura 5-7B). Por lo tanto, se infiere que las proteínas se precipitan dentro de la columna al pH empleado, causando un alto porcentaje de pérdida de las proteínas de interés.

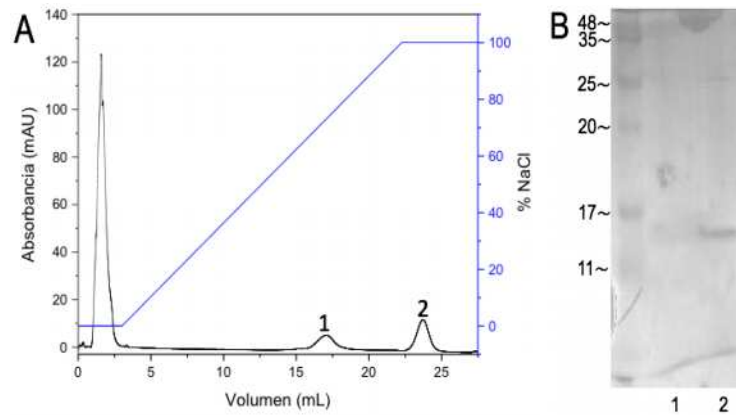


Figura 5-7. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 15% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de emú mediante el método intercambio catiónico utilizando como fase móvil citratos 50 mM pH 3.6 como buffer A y citratos 50 mM pH 3.6 + 1.0 M NaOH como buffer B, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa

Con el fin de encontrar una mejor metodología para obtener las proteínas a una mayor concentración, se realizaron ensayos utilizando el método por filtración en gel con una columna Superdex 75 Increase 10/300 GL empleando el buffer de acetato de amonio 100 mM pH 5.0 + 1.0 M guanidina, a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min.²³ Del cromatograma obtenido (Figura 8A), se observaron dos picos los cuales probablemente correspondan a las proteínas de emú DCA-1 (16.3 kDa) y DCA-2 (16.6 kDa), respectivamente (Figura 8B). Sin embargo, este resultado es necesario corroborarlo mediante la identificación del peso molecular de cada una de las fracciones, para confirmar la presencia de una o de las dos proteínas por separado.

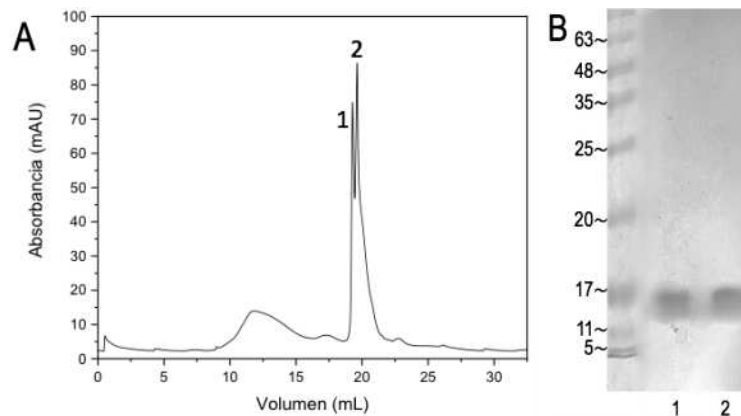


Figura 8. Cromatograma (A) y gel SDS-PAGE al 12% (B) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de emú mediante el método filtración en gel utilizando acetato de amonio 100 mM pH 5.0 + 1.0 M guanidina como fase móvil y una velocidad de flujo de 0.3 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa

5.3.2.2.3 Proteínas de cascarón de huevo de cocodrilo (CCA-1 y CCA-2)

Para la purificación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de cocodrilo, se utilizó el método por filtración en gel implementado en la separación de las proteínas de avestruz y emú. Se realizó varios ensayos a diferentes pHs y cuando se utilizaron buffers a pHs ácidos no se obtuvieron resultados característicos, así que se decidió utilizar pHs básicos. El primer ensayo fue con un buffer de fosfatos 10 mM pH 7.55 (Figura 9A) del cual se obtuvieron dos picos donde el pico 1 fue el único que contenía proteína de aproximadamente 14 kDa de peso molecular (Figura 9D). Este resultado fue inesperado, ya que del caso anterior (inciso 3.2), el peso molecular de las proteínas aisladas fue de 7 kDa para ambos casos. Por lo tanto, se concluye que el cascarón de huevo de cocodrilo posee dos proteínas de diferente peso molecular, una de 7 kDa y otra de 14 kDa. Por lo tanto, se realizó otro ensayo con un buffer de mayor pH y concentración. Así que, se utilizó un buffer de bicarbonatos 50 mM pH 7.8 y el cromatograma obtenido fue similar al obtenido con el buffer de Fosfatos (Figura 9B). De este ensayo, se colectaron dos fracciones correspondientes a los picos de 3 y 4, obteniendo una proteína de 14 kDa en la fracción 3 (Figura 9D). Con el propósito de obtener la proteína de 7 kDa, se realizó otro ensayo con Tris-HCl 50 mM pH 8.0, y el resultado fue similar al obtenido con fosfatos y bicarbonatos (Figura 9C). Así mismo, se realizó el gel de las dos fracciones colectadas y solo se observó una proteína de 14 kDa en la fracción 5 (Figura 9D). Por lo tanto, la proteína de 7 kDa no se está obteniendo probablemente porque se está quedando retenida en la columna, o que al momento de concentrar las fracciones en tubos amicon ultra con membrana de corte de 3 kDa, se esté filtrando y, por ende, pérdida de la proteína.

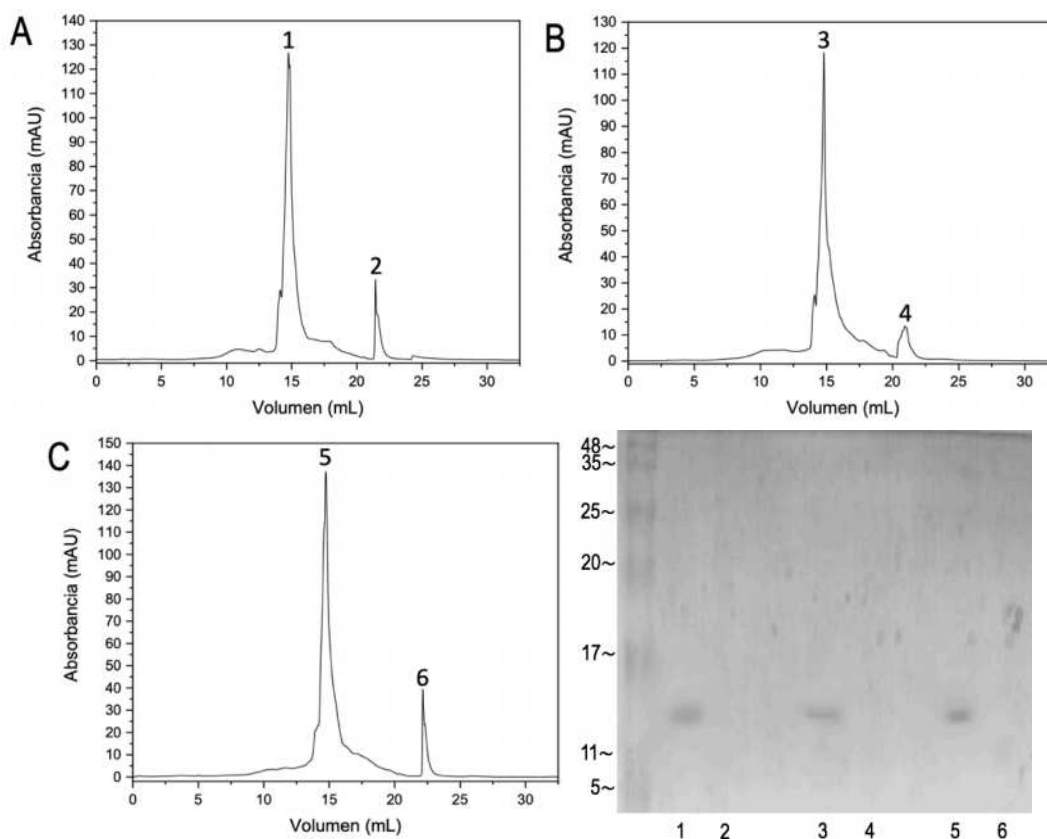


Figura 5-9. Cromatogramas (A, B, C) y gel SDS-PAGE al 15% (D) de la separación de las proteínas intraminerales del cascarón de huevo de cocodrilo mediante el método filtración en gel utilizando fosfatos 10 mM pH 7.55 (A), bicarbonatos 50 mM pH 7.8 (B) y tris-HCl 50 mM pH 8.0 (C) como fase móvil, a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Los números indican las fracciones que se tomaron para el gel. El marcador de peso molecular corresponde a BLUEstain™ 2 Protein ladder, 5-245 kDa

5.3.3 Estudio bioinformático preliminar de las proteínas intraminerales

Una vez purificadas las proteínas, se llevó a cabo la caracterización de las proteínas presentes dentro del mismo reino, con el fin de identificar los grupos funcionales de acuerdo con las características estructurales determinadas *in silico*, y de los homólogos en diferentes organismos, con la finalidad de ver la relación filogenética presente en las especies bajo estudio.

5.3.3.1 Inferencia evolutiva de las proteínas estruthiocalcinas

La inferencia evolutiva de las estruthiocalcinas SCA-1 (P83514.1) y SCA-2 (P83515.1) se realizó mediante una bioprospección *in silico* de acuerdo con lo reportado por Kamble, et al.²⁴ Este análisis consta de dos pasos: 1) La búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos y, 2) uso de herramientas bioinformáticas para seleccionar y analizar posibles candidatos.

5.3.3.1.1 Búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos

La primera etapa de la bioprospección se realizó en el servidor BLAST en la base de datos del NCBI tomando como referencia la secuencia de la estruthiocalcina-1 (SCA-1) y estruthiocalcina-2 (SCA-2), utilizando el algoritmo Quick BLASTP para obtener secuencias con un porcentaje de identidad del 50% o más, y realizando la búsqueda a tres niveles taxonómicos: 1) Struthioniformes; 2) aves y 3) animalia, excluyendo a los mamíferos, ya que la característica principal de las especies estudiadas en este trabajo es que presentan la ovoposición.

No obstante, la herramienta BLASTP arrojó como resultado más de 5000 secuencias de salida, con una amplia variedad de dominios y estructuras que no tienen relación con las estruthiocalcinas, por lo que requiere una alta demanda de tiempo para curar datos, y realizar este trabajo tomaría meses, y la información que se obtendría podría ser muy ambigua, ya que la adición de dominios es muy común en estas proteínas, como lo refleja el análisis de las struthioniformes desarrollado a continuación.

La búsqueda de secuencias independiente usando la herramienta QuickBLASTP en el reino animalia, excluyendo a los mamíferos, dio como resultado 18 y 88 secuencias altamente idénticas a la SCA-1 y SCA-2, respectivamente.

5.3.3.1.2 Uso de herramientas bioinformáticas para seleccionar y analizar posibles candidatos

A partir de estos dos resultados, los cuales se combinaron y se descartaron las secuencias que eran redundantes y denominadas en el nombre de identificación como “parciales”. Posteriormente, las secuencias se sometieron a un alineamiento con la herramienta ClustalOmega (ya que, al penalizar los gaps, permite que el alineamiento sea más compacto y los aminoácidos conservados son más fáciles de visualizar) con la finalidad de observar la presencia de Cys conservadas entre las estruthiocalcinas. Por lo tanto, las proteínas que no contenían estas determinantes se eliminaron. Un conjunto final de 40 secuencias se selecciona como candidatos para el análisis filogenético. Una vez realizado la selección de las secuencias de interés, mediante un gráfico del PI vs PM de las proteínas analizadas previamente, se observa una homogénea dispersión (perfil congruente) (Figura 5-10), a excepción de las dos proteínas de peso molecular de 38.5 kDa y de 31.5 kDa, debido a la edición que se presenta en el C-Terminal, adquiriendo una funcionalidad adicional de acuerdo con el orden al que corresponden, siendo Charadriiformes y Anseriformes, respectivamente.

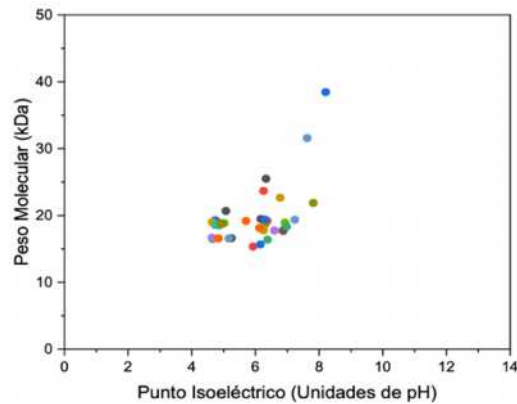


Figura 5-10. Gráfico de correlación del PI vs PM de las proteínas obtenidas del quickBLAST tomando como referencia la SCA-1 y SCA-2

5.3.3.2 Identificación de las regiones evolutivamente conservadas y construcción del árbol filogenético

Una vez identificadas las proteínas de interés, fueron sometidas a un alineamiento pareado usando el programa Sequence Demarcation Tool (SDT versión 1.2) mediante el método de Muscle (ya que cuando se hace con ClustalW no se aprecia una buena formación de bloques, debido a la penalización de los gaps). De esta manera, se observó que aparecen 30 secuencias de aves del orden Struthioniformes, Apterygiformes, Anseriformes, Falconiformes, Accipitriformes, Charadriiformes, Psittaciformes, y Passeriformes; 7 de tortugas del orden Testudines, 1 de cocodrilo del orden Crocodylia, 1 de pez del orden Cyprinodontiformes; y 1 de equinoderma Temnopleuroida (Figura 5-11). Las secuencias de la clase reptilia, actinopterygii y echinoidea, presentan mayor porcentaje de identidad entre ellas, lo que podría indicar un origen ancestral común que se dio en el surgimiento de las aves. A su vez, estas secuencias de cocodrilos, pez, erizo y tortugas, que presentan menor porcentaje de identidad con las aves, pueden servir como grupo externo para la inferencia evolutiva con MEGA X.

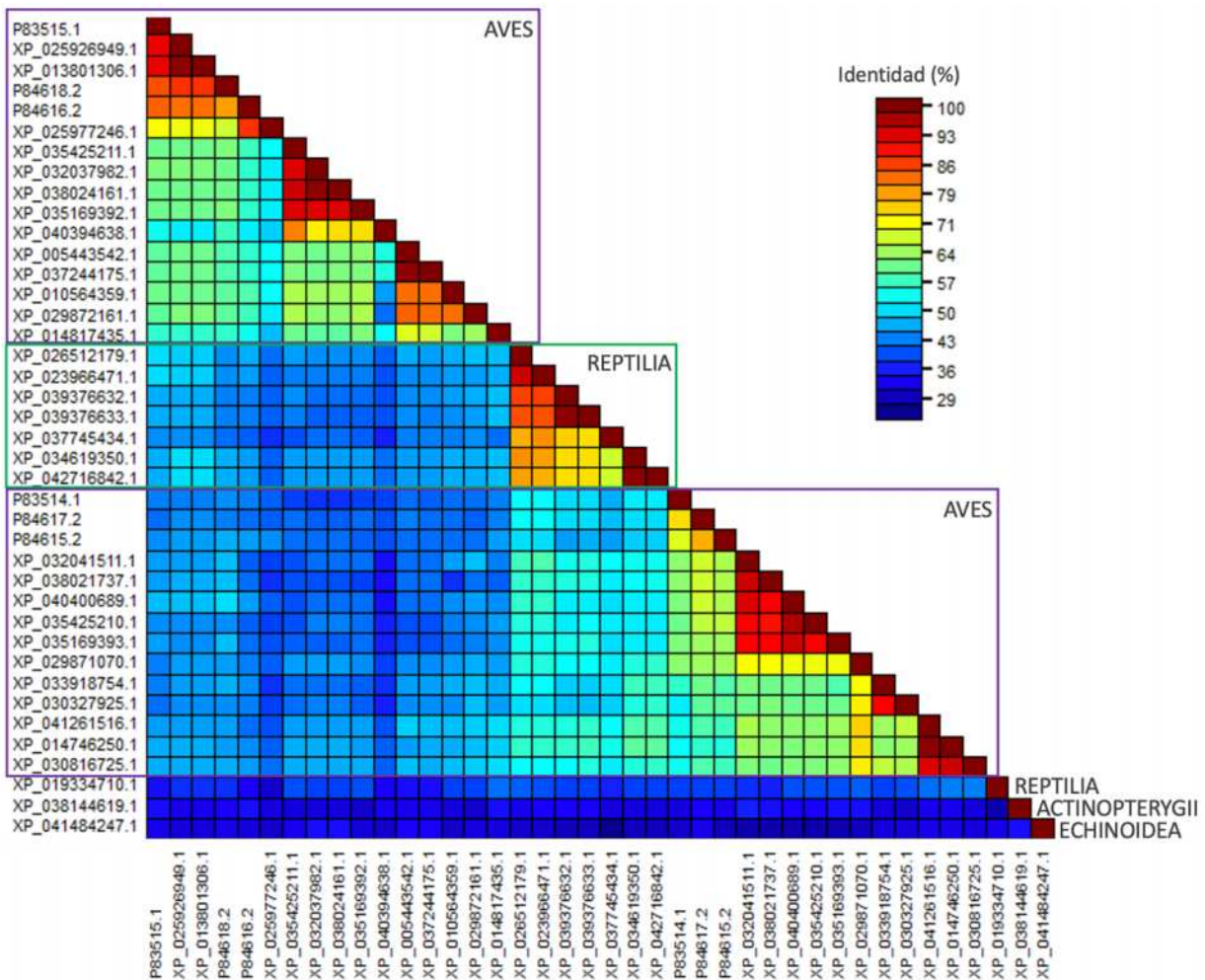


Figura 5-11. Alineamiento pareado de las 40 secuencias e identificación de bloques asociados con el porcentaje de identidad. El bloque superior corresponde a especies de aves relacionadas con la SCA-2. El bloque del centro corresponde a especies del orden Testudines. El bloque inferior corresponde a especies relacionadas con la SCA-1. **P83515.1.** *Struthio camelus* (SCA-2); **XP_025926949.1.** *Apteryx rowi*; **XP_013801306.1.** *Apteryx mantelli*; **P84618.2.** *Rhea americana* (RCA-2); **P84616.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-2); **XP_025977246.1.** *Dromaius novaehollandiae*; **XP_035425211.1.** *Cygnus atratus*; **XP_032037982.1.** *Aythya fuligula*; **XP_038024161.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_035169392.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_040394638.1.** *Cygnus olor*; **XP_005443542.1.** *Falco cherrug*; **XP_037244175.1.** *Falco rusticolus*; **XP_010564359.1.** *Haliaeetus leucocephalus*; **XP_029872161.1.** *Aquila chrysaetos chrysaetos*; **XP_014817435.1.** *Calidris pugnax*; **XP_026512179.1.** *Terrapene carolina triunguis*; **XP_023966471.1.** *Chrysemys picta bellii*; **XP_039376632.1.** *Mauremys reevesii*; **XP_039376633.1.** *Mauremys reevesii*; **XP_037745434.1.** *Chelonia mydas*; **XP_034619350.1.** *Trachemys scripta elegans*; **XP_042716842.1.** *Chrysemys picta bellii*; **P83514.1** *Struthio camelus* (SCA-1); **P84617.2.** *Rhea americana* (RCA-1); **P84615.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-1); **XP_032041511.1.** *Aythya fuligula*; **XP_038021737.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_040400689.1.** *Cygnus olor*; **XP_035425210.1.** *Cygnus atratus*; **XP_035169393.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_029871070.1.** *Aquila chrysaetos chrysaetos*; **XP_033918754.1.** *Melopsittacus undulatus*; **XP_030327925.1.** *Strigops habroptila*; **XP_041261516.1.** *Onychostruthus taczanowskii*; **XP_014746250.1.** *Sturnus vulgaris*; **XP_030816725.1.** *Camarhynchus parvulus*; **XP_019334710.1.** *Alligator mississippiensis*; **XP_038144619.1.** *Echinoidea*

Cyprinodon tularosa; **XP_041484247.1**. *Lytechinus variegatus*. Los códigos se encuentran en orden de superior/izquierda a inferior/derecha

En MEGA X, las secuencias se alinearon mediante el método de MUSCLE y se sometieron a la búsqueda del mejor modelo evolutivo. El mejor modelo determinado por el *BIC score* más bajo fue el JTT +G +I, pero el valor de +I era cero y el *BIC score* era prácticamente similar al JTT +G, por lo tanto, el árbol se corrió con ese modelo evolutivo.²⁶

La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima verosimilitud y el modelo en matrices JTT.²⁵ En la Figura 5-12, se muestra el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-7181.81). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agruparon se muestra junto a las ramas (1000 réplicas). Además, se utilizó una distribución gamma discreta para modelar las diferencias de tasa de evolución entre los sitios (2 categorías (+G, parámetro = 1.6370)). El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 40 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 628 posiciones en el conjunto de datos finales.²⁶

Al igual que el resultado SDT, se observa que la división está dada principalmente por la filogenia con la SCA-1 (inferior) y SCA-2 (superior), siendo separadas por las secuencias correspondientes a tortugas (Testudines – amarillo claro) (Figura 5-12). Del primer grupo de aves, están los órdenes Struthioniformes (morado), Apterygiformes (naranja), Anseriformes (verde), Charadriiformes (azul), Falconiformes (rosado oscuro), Accipitriformes (rosado claro) y Testudine (amarillo claro). De las secuencias presentes en el segundo grupo de aves están los órdenes Accipitriformes (rosado claro), Psittaciformes (gris), Passeriformes (morado claro), Struthioniformes (morado oscuro) y Anseriformes (verdes).

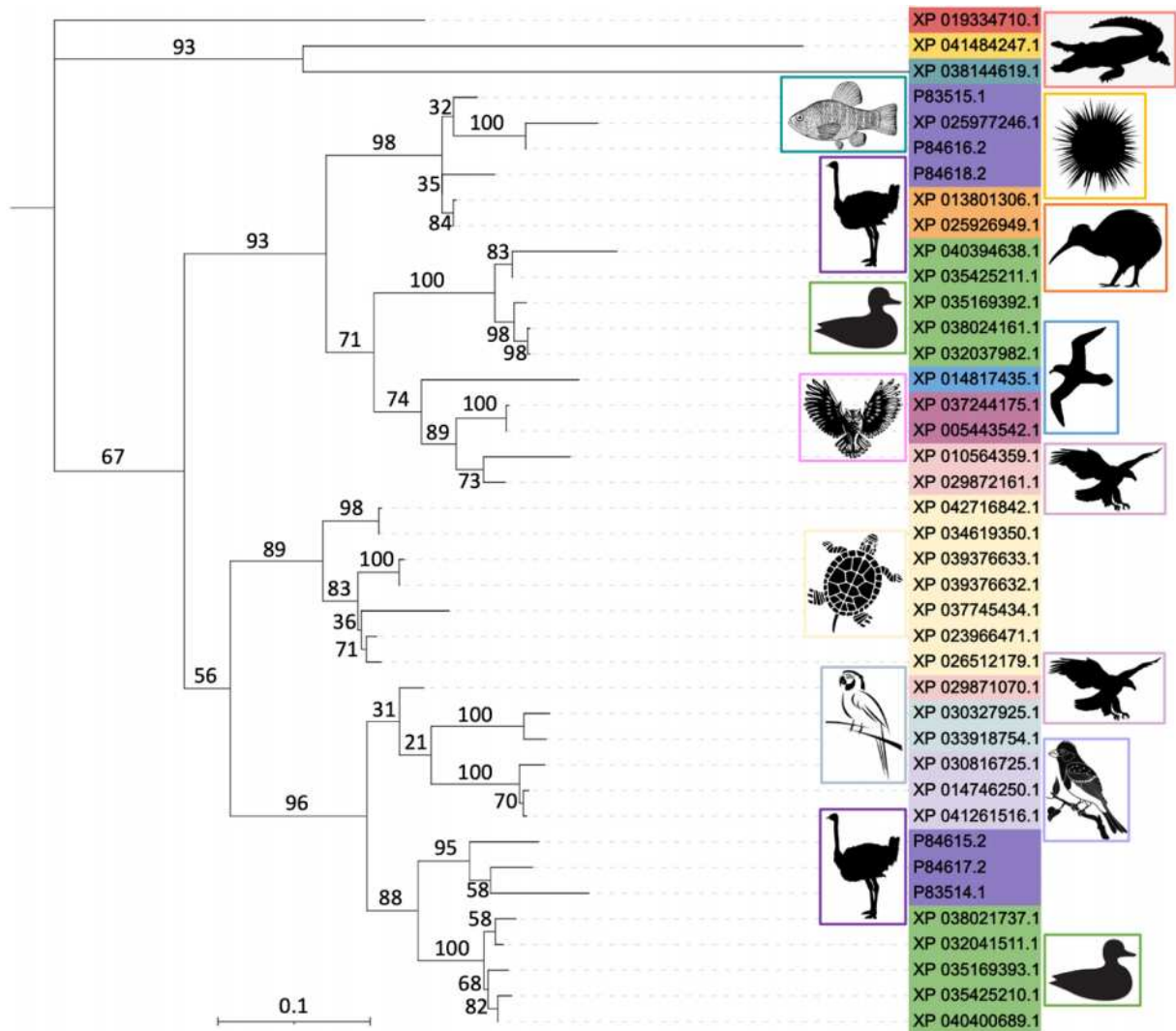


Figura 5-12. Árbol filogenético de las 40 secuencias de proteínas organizadas por el orden de la especie a la que corresponden. Secuencias externas: **Rojo.** Cocodrilos: **XP_019334710.1.** *Alligator mississippiensis*. **Amarillo oscuro.** Temnopleuroidea: **XP_041484247.1.** *Lytechinus variegatus*. **Verde grisaseo.** Cyprinodontiformes: **XP_038144619.1.** *Cyprinodon Tularosa*. Secuencias relacionadas a la SCA-2: **Morado.** Struthioniformes: **P83515.1.** *Struthio camelus* (SCA-2); **XP_025977246.1.** *Dromaius novaehollandiae*; **P84616.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-2); **P84618.2.** *Rhea americana* (RCA-2). **Naranja.** Apterygiformes: **XP_013801306.1.** *Apteryx mantelli*; **XP_025926949.1.** *Apteryx rowi*. **Verde.** Anseriformes: **XP_040394638.1.** *Cygnus olor*; **XP_035425211.1.** *Cygnus atratus*; **XP_035169392.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_038024161.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_032037982.1.** *Aythya fuligula*. **Azul.** Charadriiformes: **XP_014817435.1.** *Calidris pugnax*. **Rosado oscuro.** Falconiformes: **XP_037244175.1.** *Falco rusticolus*; **XP_005443542.1.** *Falco cherrug*. **Rosado claro.** Accipitriformes: **XP_010564359.1.** *Haliaeetus leucocephalus*; **XP_029872161.1.** *Aquila chrysaetos chrysaetos*. **Amarillo claro.** Testudine: **XP_042716842.1.** *Chrysemys picta bellii*; **XP_034619350.1.** *Trachemys scripta elegans*; **XP_039376633.1.** *Mauremys reevesii*; **XP_039376632.1.** *Mauremys reevesii*; **XP_037745434.1.** *Chelonia mydas*; **XP_023966471.1.** *Chrysemys picta bellii*; **XP_026512179.1.** *Terrapene carolina triunguis*. Secuencias relacionadas a la SCA-1: **Rosado claro.** Accipitriformes: **XP_029871070.1.** *Aquila chrysaetos chrysaetos*. **Gris.** Psittaciformes: **XP_030327925.1.** *Strigops habroptila*; **XP_033918754.1.** *Melospittacus undulatus*. **Morado claro.** Passeriformes:

XP_030816725.1. *Camarhynchus parvulus*; **XP_014746250.1.** *Sturnus vulgaris*; **XP_041261516.1.** *Onychostruthus taczanowskii*. **Morado oscuro.** Struthioniformes: **P84615.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-1); **P84617.2.** *Rhea americana* (RCA-1); **P83514.1** *Struthio camelus* (SCA-1). **Verde.** Anseriformes: **XP_038021737.1.** *Anas platyrhynchos*; **XP_032041511.1.** *Aythya fuligula*; **XP_035169393.1.** *Oxyura jamaicensis*; **XP_040400689.1.** *Cygnus olor*; **XP_035425210.1.** *Cygnus atratus*. Los bootstrap se muestran para una de las ramas

El análisis de las secuencias de los grupos de órdenes obtenidos del árbol filogenético nos evidencia la conservación del dominio (cuadro morado) y de las cisteínas características de estos grupos de proteínas con dominio lectina tipo-C. De la secuencia de la proteína correspondiente al orden Cocodrilia (XP_019224710.1), se observa que presenta similitud con la SCA-1 (P83514.1), con 7 cisteínas conservadas y una variación en el N-terminal y en el C-terminal de aproximadamente 30 aminoácidos (Figura 5-13). Algo similar se observa en el alineamiento de las secuencias externas del orden Temnopleurodia (XP_041484247.1, Figura 5-14A) y Cyprinodontiformes (XP_038144619.1, Figura 5-14B) con la secuencia de la SCA-2 (P83515.1) identificando las cisteínas y los aminoácidos conservados entre ellas, así como la extensión del N-terminal (Figura 5-14). El análisis entre estas secuencias de aminoácidos reveló que los miembros de cada orden son evolutivamente diferentes, lo que indica que probablemente el gen que codifica a la SCA-1 y SCA-2 se haya duplicado.

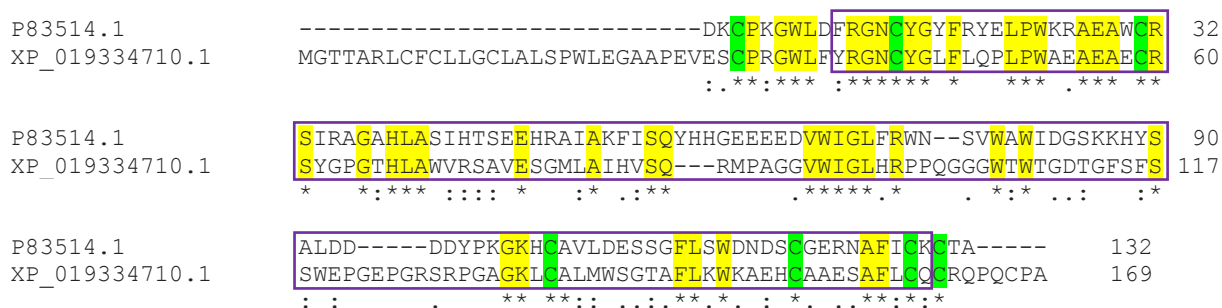


Figura 5-13. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (**P83514.1.** SCA-1) y del orden Cocodrilia (**XP_019334710.1.** *Alligator mississippiensis*). **Verde:** Cisteínas conservadas; **Amarillo:** Aminoácidos conservados; **Morado:** Dominio

A

```

P83515.1          -----RERAGCAKGWIFDGRCYGFFPQ-ELSWRAE 31
XP_041484247.1  MEVFAKSCVVVSTLIFIGTFVEVFPYVAGGGCGCSPLWTSYNGHCYRFFNDRNISWIDAE 60
                  .**:* * :*:** ** : :** **

P83515.1          GFCQRLGA-----RTHIASIHSEEEHQAIVSM LASSQPYS DSEEEAGEEVWIGLH 81
XP_041484247.1  LRCSRFSIPCGDLTSTQSI AHLVSVHSQEE MDFLTAMY ESL-----RSKRGPSR VWIGLH 115
                  *: :. :**.*:***:** : ::* * :. . .*****

P83515.1          RPLGRRNWEWS DGT KL DYGS WYRDVFLRR RACVALED TDFATWDV-----ELCSD--RK 134
XP_041484247.1  DKSTENRSEWI DGT AVNFTD WAPGQPND RRG---FHDCTFFAKWGDYQWNDMA CDPENVE 172
                  ... ** *** :*: . * . *.. :.* * **.* . * . :

P83515.1          PFICEYRT-      142
XP_041484247.1  SYICKHPKW      181
                  :**:: .

```

B

```

P83515.1          -----REFAGCAKGWIFDGRCYGFFPQELSWRAEGFGQR 36
XP_038144619.1  MMRLFLFALTLPAVTPSHGQEQLLRGGCPMFWYSENYRCYKYVSSRMTWGEAELHCVS 60
                  *.** * *:*** :. . :*:** *

P83515.1          LGARTH L A S I H S E E E H Q A I V S M L A S S Q P Y S D S E E E A G E V W I G L H R P L G R R N W E W S D G T K 96
XP_038144619.1  EGA--NLVSIHSQEEHN FVNYLIK N F S-----PTQELTWIGLTDVHKEGAWMWS D G S K 111
                  ** :* .***:**: : :. . : * .*** . * ***:**

P83515.1          LDYGSWYRDVFLRR--RACVALED TDFATWDVELSDRKPFI CEYRT--      142
XP_038144619.1  YTFNWA EKEPNNVGGDEHCGYTNIHPNFKW NDDQCSKPKPFVCASRLCP      161
                  :.* .. . : .*: : ** .***:* *

```

Figura 5-14. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2), del orden Temnopleuroida (A) (XP_041484247.1. *Lytechinus variegatus*) y del orden Cyprinodontiformes (B) (XP_038144619.1. *Cyprinodon Tularosa*). **Verde:** Cisteínas conservadas; **Amarillo:** Aminoácidos conservados; **Morado:** Dominio

El alineamiento de secuencias de las especies de los órdenes Struthioniformes (Figura 5-15) y Anseriformes (Figura 5-16) permitió identificar 85 y 77 aminoácidos conservados, respectivamente. Estos aminoácidos están resaltados en verde para las cisteínas y en amarillo para los demás residuos. Los otros aminoácidos, son sustituidos por residuos que presentan propiedades fisicoquímicas similares, lo que es probable que sea una propiedad característica de una especie o de un linaje en específico. De tal manera, puede ser que el plegamiento tridimensional esté conservado evolutivamente. Algo similar se observó con las demás especies de diferentes órdenes, incluyendo al orden Testudines, correspondientes a tortugas (ver Anexo 5.2).

5.4 CONCLUSIONES


La separación y purificación de las proteínas intraminerales presente en cascarones de huevo de avestruz, emú y cocodrilo se llevó a cabo utilizando el método de crioconcentración y cromatografía de exclusión molecular. Del cascarón de huevo de avestruz se obtuvieron las dos proteínas correspondientes a la estruthiocalcina-1 (SCA-1) y estruthiocalcina-2 (SCA-2). Así mismo, se obtuvieron las proteínas del cascarón de huevo de emú dromaiocalcina-1 (DCA-1) y dromaiocalcina-2 (DCA-2). En el cascarón de huevo de cocodrilo, se logró obtener una sola proteína correspondiente a la crococalcina-1 (CCA-1), la cual presenta un peso de 14 kDa mediante el FPLC, mientras que por UPLC se obtuvo la proteína de 7 kDa (CCA-2). Los ensayos de cristalización que se llevaron a cabo utilizando la CCA-2, no fueron exitosos debido a la baja concentración de proteína y a la alta inducción y formación de agregados policristalinos de sales inorgánicas presentes en el medio.

Las especies estudiadas, así como las obtenidas mediante el método BLAST, son exclusivas del reino animalia y presentaron una alta identidad, con regiones altamente conservadas, lo que sugiere que el plegamiento está conservado evolutivamente, y que presentan un origen evolutivo en común.

5.5 ANEXOS


ANEXO 5.1

Agentes precipitantes utilizados en la prueba de cristalización



iBScreen Classic 7
(MPD based)
Cat.-No.: CS-107L


SCREEN FORMULATION



Jena Bioscience

No.	Precipitant	Precipitant 2	Buffer	Additive
7/A1	10 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM tri-Sodium citrate
7/A2	12 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	50 mM Magnesium chloride
7/A3	15 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	20 mM Calcium chloride
7/A4	15 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	5 % w/v Polyethylene glycol 4,000	100 mM Imidazole; pH 8.0	none
7/A5	15 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Ammonium acetate
7/A6	15 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Magnesium acetate
7/B1	15 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM tri-Sodium citrate
7/B2	20 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	100 mM tri-Sodium citrate
7/B3	20 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Imidazole; pH 8.0	none
7/B4	20 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	4 % w/v Glycerol	none	200 mM Sodium chloride
7/B5	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Sodium acetate; pH 4.6	20 mM Calcium chloride
7/B6	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM tri-Sodium citrate; pH 5.6	200 mM Ammonium acetate
7/C1	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM MES; pH 6.5	200 mM Magnesium acetate
7/C2	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	500 mM Ammonium sulfate
7/C3	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	200 mM tri-Sodium citrate
7/C4	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	5 % w/v Polyethylene glycol 4,000	100 mM HEPES; pH 7.5	none
7/C5	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	10 % w/v Polyethylene glycol 4,000	100 mM Imidazole; pH 8.0	none
7/C6	30 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	20 % w/v Ethanol	none	none
7/D1	35 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	none	none
7/D2	35 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM Imidazole; pH 8.0	none
7/D3	40 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM TRIS; pH 8.5	none
7/D4	47 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	100 mM HEPES; pH 7.5	none
7/D5	47 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	2 % w/v 2-Methyl-2-propanol	none	none
7/D6	50 % w/v 2-Methyl-2,4-pentanediol	none	none	none

*pH values indicated are those of the 1.0 M buffer stock solution prior to dilution with other components



IFA AG
Certified EMS and EMS according to
DIN EN ISO 9001 and DIN EN ISO 14001
Reg.-No.: K030077 036 and K030077 036

Jena Bioscience GmbH
Libliedter Str. 71 | 07749 Jena, Germany | Tel. +49-3661-6285 000
<http://www.jenabioscience.com>

Page 1
Version: 09/07, Last update: Jul 21, 2021

Figura 5-17. Agentes precipitantes utilizados en las pruebas de cristalización de las proteínas obtenidas del cascarón de huevo de cocodrilo

ANEXO 5.2

Identificación de las regiones conservadas de las secuencias obtenidas mediante QuickBLAST

A continuación, se realizó los alineamientos de secuencias de diferentes ordenes, con el fin de representar y comparar las estructuras primarias de las proteínas analizadas.

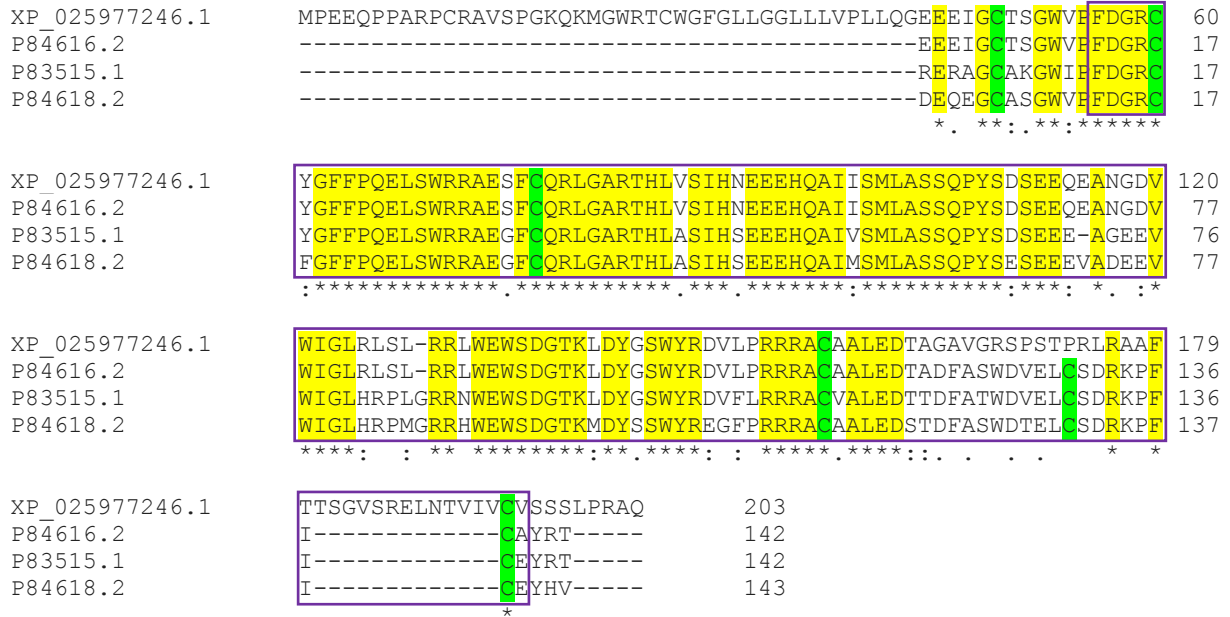


Figura 5-18. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes: **XP_025977246.1.** *Dromaius novaehollandiae*; **P84616.2.** *Dromaius novaehollandiae* (DCA-2); **P83515.1.** SCA-2; **P84618.2.** (RCA-2). **Verde:** Cisteínas conservadas; **Amarillo:** Aminoácidos conservados; **Morado:** Dominio

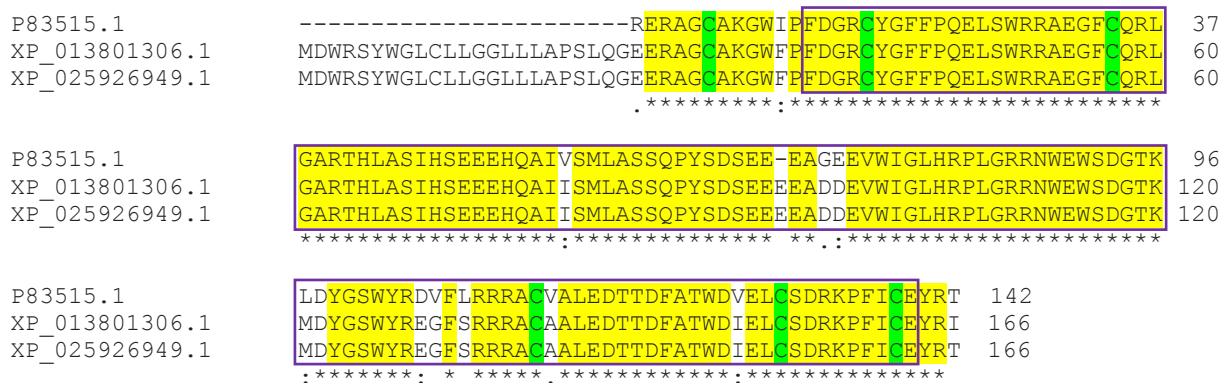


Figura 5-19. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (**P83515.1.** SCA-2) y del orden Apterygiformes (**XP_013801306.1.** *Apteryx mantelli*; **XP_025926949.1.** *Apteryx rowi*). **Verde:** Cisteínas conservadas; **Amarillo:** Aminoácidos conservados; **Morado:** Dominio

```

P83515.1          -----RERAGCAKGWIEFDGRCYGFPPQELSWRRAE--- 31
XP_040394638.1  -MPRYAPTA-----PRSPRPSAGQELSDCTPGWVVEVSGGCLGFFPWELSWSRRAEVRG 51
XP_035425211.1  MAPMWT PGLWLLGCLLLVPALWGQEL---SDCTPGWVVEVSGGCLGFFPWELSWSRRAE--- 54
XP_035169392.1  MAPTWT PGLWLLGCLLLVPVWLGQELSELSDCTPGWVVEVSGGCLGFFPWELSWSRRAE--- 57
XP_038024161.1  MAPTWT PGLWLLGCLLLVPALWGQDLSELSDCSPGWVVEVSGGCLGFFPWELSWSRRAE--- 57
XP_032037982.1  MAPTWT PGLWLLGCLLLVPALWGQDLSELSDCSPGWVVEVSGGCLGFFPWELSWNRAE--- 57
                :.:*:*:*..* * **** ** **

```

```

P83515.1          ----- 31
XP_040394638.1  CRARCGRQLGSAALGGRVTASWGHPRGTLSKGSLSPPDRLPPLWHCCSAPRQSTQGCQA 111
XP_035425211.1  ----- 54
XP_035169392.1  ----- 57
XP_038024161.1  ----- 57
XP_032037982.1  ----- 57

```

```

P83515.1          -----GFCQRLGARTHLASIHSEEEHQAIIVSML 59
XP_040394638.1  PRVPTSPQPRHCSHRPPPGEVAGVTLPSLLQAFCRREFGSGTHLASVHSEEEELQAVVDLL 171
XP_035425211.1  -----AFCRRFGSGTHLASVHSEEEELQAVVDLL 82
XP_035169392.1  -----AFCRRFGSRTHLASVHSEEEELQAVADLL 85
XP_038024161.1  -----AFCRRFGSSTHLASVHSEEEELQAVADLL 85
XP_032037982.1  -----AFCRRFGSRTHLASVHSEEEELQAVADLL 85
                .**:*:*: *****:***** **:::

```

```

P83515.1          ASSQPYSDEEEEAGEEVEWIGLHRPLGRNWEWS DGT KLDYGSWYRDVFLRRRACVALEDT 119
XP_040394638.1  FSSRSDASEEELDEEVEWIGLHRPPRSRSWQWSDGTAVAYNSWHRAALSRRRACAALQDS 231
XP_035425211.1  FSSRSDASEEELDEEVEWIGLHRPPRSRSWQWSDGTAVAYNSWHRAALSRRRACAALQDS 142
XP_035169392.1  FSH-SGEASEEELDEEVEWIGLHRPLRSRSWQWSDGTAVLHNSWHRAAFSRRRACAALQDS 144
XP_038024161.1  FSR-SGDASEEELDEEVEWIGLHRPLRSRSWQWSDGTAVAYNSWHRASFTRRRACAALQDA 144
XP_032037982.1  FSR-SGDASEEELDEEVEWIGLHRPLRSRSWQWSDGTAVAYNSWHRASFTRRRACAALQDA 144
                * . **** .***** ** *.:***** :.:**:* : *****.*:.*:

```

```

P83515.1          TDFATWDVELCS---DRKPFICEYRT----- 142
XP_040394638.1  TGEPTGAPPPAAPPATPPPCAALTEPRSLVAMAGAVLGWLVAHTDTC THMGVLCEHT 291
XP_035425211.1  TDFTTWEAEACS---DRKPFICKSLS----- 165
XP_035169392.1  TDFTTWEAEACS---DRKPFICKSLS----- 167
XP_038024161.1  TDFTTWEAEACS---DRKPFICKSLS----- 167
XP_032037982.1  TDFTTWEAEACS---DRKPFICKSLS----- 167
                *. . : . * * :

```

```

P83515.1          ----- 142
XP_040394638.1  CMLPT 296
XP_035425211.1  ----- 165
XP_035169392.1  ----- 167
XP_038024161.1  ----- 167
XP_032037982.1  ----- 167

```

Figura 5-20. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83515.1. SCA-2) y del orden Anseriformes (XP_040394638.1. *Cygnus olor*; XP_035425211.1. *Cygnus atratus*; XP_035169392.1. *Oxyura jamaicensis*; XP_038024161.1. *Anas platyrhynchos*; XP_032037982.1. *Aythya fuligula*). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio


```

P83514.1          -----DKCPKGWLDFRGNCYGYFRYELPWKRAEAWCRSI 34
XP_029871070.1   MGPA AFLGLCLLGCLALHPSLQGAQANKCPRGWLDFFGGHCYGYFGQELTWRQAEAWCRSS 60
                  :***:***** *:***** ** *::*****

P83514.1          RAGAHLASIHTSEEHRATAKFISQYHH--GEEEEVWIGLFRWNSVWAWIDGSKKHYSAL 92
XP_029871070.1   RGGCHLASLHTPEEHRALAAFIARRQRREEEEENVWIGLYHRSQAWMVVDGSQTRYSAW 120
                  *.*.***:* ** **::: : *::*****:..* *::***:..**

P83514.1          DDDDYPKGKHC AVLDESSGFLSWDNDSCGERNAFIKCTA 132
XP_029871070.1   EGDDPKRKHC AALDDSSGFMSWEDESGERKPFVCKYAA 160
                  :.* ** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

```

Figura 5-25. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1, SCA-1) y del orden Accipitriformes (XP_029871070.1, *Aquila chrysaetos chrysaetos*). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio

```

P83514.1          -----DKCPKGWLDFRGNCYGYFRYELPWKRAEAWCRSI 34
XP_030327925.1   MGPAALLGLCLLIGCLVLSPLQGVQAGPCLREWLSLGGHCYGYFGQELSWRRAEAWCKAA 60
XP_033918754.1   MGPAALLRLCLLIGCLVLSPRMRGVQAGPCPREWLSLGGHCYGYFGQELSWRRAEAWCKAA 60
                  . * : ** . : *::***** ** *::*****:

P83514.1          RAGAHLASIHTSEEHRATAKFISQYHH--GEEEEVWIGLFRWNSVWAW 81
XP_030327925.1   RGGHGLASLHTPEEHRALAAFVSQRQR--HRRHRPREEEDDDDNVWIGLYRRGQAWSW 118
XP_033918754.1   RGGHGLASLHTPEEHRALAAFISQSRQRQRHQRPREEEDDDDNVWIGLYRRGQAWSW 120
                  *.*.***:* ** **::: : *::*****:..* *::***:..**

P83514.1          IDGSKKHYSALDDDDYPKGKHC AVLDESSGFLSWDNDSCGERNAFIKCTA 132
XP_030327925.1   VDGSRRRYSAWDGDDAAGPRCAALEDAAGFMSWDESCSEKPFVCKYAA 169
XP_033918754.1   VDGSRRRYSAWDGDDVAAGPHCAALEDAAGFMSWDIESCSERKPFVCKYAA 171
                  :***:..:*** ** ** * : ** *:::***** : ** *:: ** * : *

```

Figura 5-26. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1, SCA-1) y del orden Psittaciformes (XP_030327925.1, *Strigops habroptila*; XP_033918754.1, *Melopsittacus undulatus*). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio

```

P83514.1          -----DKCPKGWLDFRGNCYGYFRYELPWKRAEAWCRSI 34
XP_030816725.1   MGPAFLGLCLLGCLVLPSPSLPGAATRCPRGWLSFEGHCYGYFGQQLSWRRAEAWCQAT 60
XP_014746250.1   MGPAFLGLCLLGCLVLPSPSLPGAATRCPRGWLSFEGHCYGYFGQQLSWRRAEAWCQAT 60
XP_041261516.1   MGPAFLGLCLLGCLVLPSPSLPGAATRCPRGWLSFEGHCYGYFGQQLSWRRAEAWCQAT 60
                  :***:*** * *::***** * *::*****:

P83514.1          RAGAHLASIHTSEEHRATAKFISQYHH--HGGEEEDVWIGLFRWNSVW 79
XP_030816725.1   R-GGHLASLHSPPEEHRALAAFLARRPRRGEDDEEGEKERDRDREREESVWIGLQRRRQGW 119
XP_014746250.1   R-GGHLASLHSPPEEHRALAAFIARRPRRGDDDEEGEKERER--EREESVWIGLHRRRQGW 117
XP_041261516.1   R-GGHLASLHSPPEEHRALAAFIARRPRRGEDDEEGEKERERERERDKEESVWIGLHRRRQGW 119
                  * * .***:* ** **::: : *::***** * .. *

P83514.1          AWIDGSKKHYSALDDDDYPKGKHC AVLDESSGFLSWDNDSCGERNAFIKCTA 132
XP_030816725.1   LWADGSPRHYWAWEGDDGPKGHPCIALEDSAGFMAWEGEACGERKPFVCKYPA 172
XP_014746250.1   LWADGSPRHYWAWEGDDGPKGHPCIALEDSAGFMAWEGEACGDRKPFVCKYPA 170
XP_041261516.1   LWADGSPRHYWAWEGDDGPKGHPCIALEDSAGFMAWEGEACGERKPFVCKYEA 172
                  * ** * : ** * : ** * ** * : * .:***:***:***:***:***:***:***

```

Figura 5-27. Alineamiento de las secuencias primarias de las especies del orden Struthioniformes (P83514.1, SCA-1) y del orden Passeriformes (XP_030816725.1, *Camarhynchus parvulus*; XP_014746250.1, *Sturnus vulgaris*; XP_041261516.1, *Onychostruthus taczanowskii*). Verde: Cisteínas conservadas; Amarillo: Aminoácidos conservados; Morado: Dominio

Capítulo 6.

Conclusiones Generales y Perspectivas

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se examinaron las microestructuras y cristalografía de diversos cascarones de huevo fosilizados y modernos. El análisis fue particularmente útil para este propósito porque se mostró la microestructura y los granos presentes en cada una de las muestras, mediante difracción de rayos X ya que ofrece el tamaño, número y orientación preferencial de la calcita presente en los cascarones de huevo. El resultado de los estudios muestra que los cascarones de huevo de las aves están compuestos de calcita, pero su mecanismo de desarrollo subyacente es completamente diferente de los cascarones de huevo de reptiles. Aunque ambos cascarones de huevo están compuestos de calcita, es probable que los cascarones de huevo de reptiles se desarrollan de forma independiente, mostrando quizás un polimorfo diferente a la calcita que podría ser aragonito o vaterita. Sin embargo, la similitud superficial puede, por lo tanto, diferenciarse mediante diferentes métodos, lo que se considera un estudio más riguroso de homología vs homoplasia. Este principio es aplicable a muchos cascarones de huevo aparentemente “similares”, como lo son los cascarones de huevo de dinosaurio. Por lo tanto, la interpretación de cascarones de especies extintas es de gran importancia para comprender la evolución de los cascarones de huevo rígidas como lo son las de dinosaurios. Sin embargo, para comprender la evolución de los cascarones de huevos rígidas es necesario identificar la homología y así, la evolución que presentaron después de la cladogénesis. De acuerdo con los resultados mostrados en el capítulo 2, la cristalografía general de los cascarones de huevo dinosaurio de las especies herbívoras frente a la muestra de la especie carnívora, se evidencia una cierta homología, pero, aun así, es necesario estudiar muchos más cascarones de especies extintas o fosilizadas, así como de las modernas.

Otro resultado que se observa del capítulo 2, muestra que los cascarones de huevo fosilizados presentan microestructuras similares con los cascarones de especies modernas, así como también es aplicable con su cristalografía (forma de grano y relación de aspecto), la cual presentó una fuerte orientación preferencial, como se observa en el capítulo 3. En los capítulos 2 y 3, se mostró que las microestructuras de los cascarones de huevo de la especie carnívora fueron las que mejor se observaron, permitiendo un análisis más representativo en comparación con las muestras de especies herbívoras. En la mayoría de los casos, los fenotipos similares se interpretan como una homología y, por lo general, se codifican en el mismo estado en una matriz de caracteres, que se utiliza en el análisis filogenético.

Una de las técnicas que se empezó a utilizar en muestras fosilizadas es la espectroscopía Raman, y como no requiere tratamientos de muestra agresivos o complicados, es una herramienta muy prometedora en la investigación de cascarones de huevos fosilizados. En el capítulo 3 se

muestran los minerales identificados, siendo el principal la calcita, así como albita, cuarzo, óxido de silicio amorfo y algunas trazas de anhidrita, hematita e hidroxiapatita, minerales que le podrían otorgar color a los cascarones fosilizados. Estos minerales, no solo se encontraban en la superficie de los cascarones, sino en los poros formados durante el desarrollo de los cascarones de huevo. Por lo tanto, la morfología de los poros no solo nos podría dar información evolutiva, sino también de la taxonomía extinta. Sin embargo, para poder concluir la idea anterior, es necesario analizar y estudiar cascarones de otras especies extintas, no solo en América, sino también en los demás continentes, debido a que algunas especies solo vivieron en determinados continentes.

En conclusión, los resultados de esta tesis doctoral muestran que los cascarones de huevos fosilizados tienen un gran valor para diversas cuestiones paleobiológicas y geológicas. Como biomineral, el cascarón de huevo contiene información biológica que podría haber sido seleccionada por selección natural. Debido a que los cascarones de huevos fosilizados han evolucionado y contienen señales filogenéticas, la investigación futura debería tratar de encontrar la mayor cantidad de datos latentes posibles. Entre estos están expresión cuantitativa de la microestructura en los cascarones de huevo, evolución homoplástica de la ornamentación en diversos cascarones de huevo, así como en la forma del grano. Por lo tanto, el desarrollo de diversos enfoques que no se probaron en la investigación de cascarones de huevos fosilizados, sería el siguiente paso significativo para mi carrera como investigadora. Así como, la sobreexpresión de las proteínas intraminerales de cascarones de huevo de especies modernas, con el propósito de obtener la estructura tridimensional y poder identificar el plegamiento que se observa en su estructura, la cual, completara la información de la filogenia y finalmente, la relación evolutiva entre especies.

6.2 PERSPECTIVAS

En un futuro cercano se deben secuenciar los péptidos y polipéptidos extraídos de las proteínas intraminerales de los cascarones de huevo de estos 5 tipos de dinosaurios. Esto permitiría poder compararlos con los resultados de la alineación de secuencias, hechas por técnicas de bioinformática en esta tesis doctoral. Las similitudes de ciertas regiones en el contenido de aminoácidos nos podrían dar luz en detectar y confirmar por técnicas bioquímicas y de biología molecular si los dinosaurios, así como las aves raptadas y los cocodrilos tienen un ancestro común que vivió en la tierra o las aves simplemente derivaron de los dinosaurios. Toda esta suposición está basada en la evidencia de haber encontrado al arqueóptero (encontrado en Alemania y que vivió hace 150 millones de años), el cual es el ancestro de las aves. Desafortunadamente, no se tienen cantidades suficientes de cascarones de huevo de dinosaurios, para hacer este estudio

estructural de las proteínas intraminerales por medio de cristalografía por rayos X, pero si fuera posible en las proteínas intraminerales de avestruz, emú, rea americana, cocodrilos, habría que encontrar los genes que codifican para estas proteínas y en un futuro se podría ver si ese gen aparece en los residuos de DNA que se pudieran encontrar en huesos fósiles en esos nidos de dinosaurios encontrados en el norte de México codificó para esas proteínas. Por tanto, esta tesis doctoral abre un camino a investigaciones futuras mucho más ambiciosas que darán resultados cada vez más interesantes en la evolución de las aves y contribuirán en parte entender como la biomineraización de carbonato de calcio, en la formación de cascarones de huevo, contribuyó o no a la extinción de los dinosaurios sobre la faz de la tierra.

6.3 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.3.1 Capítulo 1

1. Mann, S. Biom mineralization, Principles and Concepts in Bioinorganic Materials Chemistry. (Compton, R.; Davies, S & Evans, J.; Eds) 1st edition. Oxford Chemistry Masters. **2001**.
2. Lowenstam, H. A. Minerals formed by organisms. *Science*. **1981**, *211*, 1126-1131.
3. Weiner, S. Organization of organic matrix components in mineralized tissues. *Am. Zool.* **1984**, *24*, 945-951.
4. Nys, Y.; Hincke, M.; Arias, J.; Garcias-Ruiz, J.; Solomon, S. Avian eggshell mineralization. *Avian Poult. Biol. Rev.* **1999**, *10*, 143-166.
5. Gower, L. Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor pathway and its role in biom mineralization. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 4551-4627.
6. Leach, R. M. Biochemistry of the organic matrix of the eggshell. *Poult. Sci.* **1982**, *61*, 2040-2047.
7. Addadi, L.; Weiner, S. Control, and design principles in biological mineralization. *Angew Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 153-169.
8. Tullett, S. G. The porosity of avian eggshells. *Comp. Biochem. Physiol.* **1984**, *78A*, 5-13.
9. Hincke, M. T., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A. B., McKee, M. D. The eggshell: Structure, composition, and mineralization. *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 1266-1280.
10. Dauphin, Y.; Cuif, J. P.; Salomé, M.; Susini, J.; Williams, C. T. Microstructure, and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal. Bioanalytical. Chem.* **2006**, *386*, 1761-1771.
11. Arias, J. L.; Cataldo, M.; Fernandez, M. S.; Kessi, E. Effect of beta-aminopropionitrile on eggshell formation. *British. Poult. Sci.* **1997**, *38*, 349-354.
12. Stemberger, B. H.; Mueller, W. J.; Leach, R. M. Microscopic study of the initial stages of eggshell calcification. *Poult. Sci.* **1997**, *56*, 537-543.
13. Sharp, R. M.; Silyn-Roberts, H. Development of preferred orientation in the eggshell of the domestic fowl. *Biophys. J.* **1984**, *46*, 175-179.

14. Arias, J. L.; Fink, D. J.; Xiao, S. Q.; Heuer, A. H.; Caplan, A. I. Biomineralization and eggshells: Cell mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* **1993**, *145*, 217-250.
15. Rodriguez-Navarro, A.; Kalin, O.; Nys, Y.; Garcia-Ruiz, J. M. Influence of the microstructure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages. *British. Poult. Sci.* **2002**, *43*, 395-403.
16. Rose, M. H.; Hincke, M. Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins. *Cell. Mol. Life. Sci.* **2009**, *66*, 2707-2719.
17. Nys, Y.; Zawadzki, J.; Gautron, J.; Mills, A. D. Whitening of brown-shelled eggs: Mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition. *Poult. Sci.* **1991**, *70*, 1236-1245.
18. Miksík, I.; Holán, V.; Deyl, Z. Avian eggshell pigments and their variability. *Comp. Biochem. Phys. B.* **1996**, *113*, 607-612.
19. Zhao, R.; Xu, G. Y.; Liu, Z. Z.; Li, J. Y.; Yang, N. A study on eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens. *Poult. Sci.* **2006**, *85*, 546-549.
20. Von Linné, C. A general system of nature: through the three grand kingdoms of animals, vegetables, and minerals, systematically divided into their several classes, orders, genera, species, and varieties. (Lackington, A & Co.; Eds – Tranlated by Turton, W.) Volume 1. **1806**.
21. Schodde, R.; Dickinson, E. C.; Steinheimer, F. D., Bock, W. J. The date of Latham's supplementum indicis ornithologici 1801 or 1802. *S. Aust. Ornithol.* **2010**, *35*, 231-235.
22. Cuvier, G.; McMurtrie, H. Cuvier's animal kingdom: Arranged according to its organization. (Orr & Smith; Eds). **1834**.
23. Casas-Andreu, G. Ecología de la anidación de *Crocodylus acutus* (Reptilia: Crocodylidae) en la desembocadura del río Cuitzmala, Jalisco, México. *Acta. Zool. Mex.* **2003**, *89*, 11-128.
24. Home, G. S. A mild-cretaceous ornithopod from central Honduras. *J. Vertebr. Paleontol.* **1994**, *14*, 147-150.
25. Alcober, O. A.; Martinez, R. N. A new herrersaurid (Dinosauria, Saurischia) from the upper Triasic ischigualasto formation of northwestern Argentina. *ZooKeys.* **2010**, *63*, 55-81.
26. Lund, E. K.; Gates, T. A. *A historical and biogeographian examination of hadrosaurian dinosaurs.* (Lucas, S. G, & Sullivan, R. M. Eds). Ed. Late Cretaceous Vertebrates from the Western Interior. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin, 35. Albuquerque, New Mexico. **2006**, pp 263-276.
27. Prieto-Márquez, A. Global phylogeny of Hadrosauridae (Dinosauria: Ornithopoda) using parsimony and Bayesian methods. *Zool. J. Linnean. Soc.* **2010**, *159*, 435-502.
28. Prieto-Márquez, A.; Dalla-Vecchia, F. M.; Gaete, R.; Galobart, À. Diveristy, relationship, and biogeography of the lambeosaurine dinosaurs from the European archipelago with description of the new Aralosaurin *Canardia garonnensis*. *PLoS ONE.* **2013**, *8*, e69835.
29. Godefroit, P.; Bolotsky, Y. L.; Itterbeeck, J. The lambeosaurine dinosaur *Amurosaurus riabinini* from the Maastrichtian of far Eastern Russia. *Acta. Palaeontol. Pol.* **2004**, *49*, 585-618.
30. Dodson, P. Taxonomic implications of relative growth in lambeosaurine hadrosaurus. *Syst. biol.* **1975**, *24*, 37-54.

31. Evans, D. C. Cranial anatomy, and systematics of *Hypacrosaurus altispinus* and a comparative analysis of skull growth in lambeosaurine hadrosaurids (Dinosauria: ornithischia). *Zool. J. Linnean Soc.* **2010**, *159*, 398-434.
32. Lü, J.; Xu, L.; Liu, Y.; Zhang, X.; Jia, S.; Ji, Q. A new troodontid (Theropoda: Troodontidae) from the late cretaceous of central china, and the radiation of Asian troodontids. *Acta. Palaeontol. Pol.* **2010**, *55*, 381-388.
33. Fowler, D. W.; Freedman, E. A.; Scannella, J. B.; Kambic, R. E. The predatory ecology of *Deinonychus* and the origin of flapping in birds. *PLoS ONE.* **2011**, *6*, e28964.
34. Mikhailov, K. E. Classification of fossil eggshells of amniotic vertebrates. *Acta Palaeontol. Pol.* **1991**, *36*, 21-39.
35. Tanaka, K.; Zelenitsky, D. K.; Williamson, T.; Weil, A.; Therrien, F. Fossil eggshells from the Upper Cretaceous (Carnian) Fruitland Formation, Mew Mexico. *Hist. Biol.* **2011**, *23*, 41-55.
36. Jackson, F. D.; Varricchio, D. J. Fossil eggs and eggshell from the lowermost Two Medicine Formation of western Montana, Sevenmile Hill Location. *J. Vertebr. Paleontol.* **2010**, *30*, 1142-1156.
37. Barta, D. E.; Brudringde, K. M.; Croghan, J. A.; Jackson, F. D.; Varricchio, D. J.; Jin, X.; Poust, A. W. Eggs and clutches of the Spheroolithidae from the Cretaceous Tiantai Basin, Zhejiang province, China. *Hist. Biol.* **2013**, *26*, 183-194.
38. Fernández, M. S.; Wang, X.; Vremir, M. L.; Naish, D.; Kaiser, G.; Dyke, G. A mixed vertebrate eggshell assemblage from the Transylvanian Late Cretaceous. *Scientific Reports.* **2019**, *9*, 1-10.
39. Eagle, R. A.; Enriquez, M.; Grellet-Tinner, G.; Pérez-Huerta, A.; Hu, D.; Tütken, T.; Montanari, S.; Loyd, S. J.; Ramirez, P.; Tripathi, A. K.; Kohn, W. J.; Cerling, T. E.; Chiappe, L. M.; Eiler, J. M. Isotopic ordering in eggshells reflects body temperatures and suggest differing thermophysiology in two Cretaceous dinosaurs. *Nat. Commun.* **2015**, *6*:8296.
40. Cojan, I.; Renard, M.; Emmanuel, L. Palaeoenvironmental reconstruction of dinosaur nesting sites base on a geochemical approach to eggshells and associated palaeosols (Maastrichtian, Provence Basin, France). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **2003**, *191*, 111-138.
41. Montanari, S.; Higgins, P.; Norell, M. A. Dinosaur eggshell and tooth enamel geochemistry as an indicator of Mongolian Late Cretaceous paleoenvironments. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **2013**, *370*, 158-166.
42. Erben, H. K.; Hoefs, J.; Wesepohl, K. H. Paleobiological and isotopic studies of eggshells from a declining dinosaur species. *Paleobiology.* **1979**, *5*, 380-414.
43. Aguillón-Martínez, M.; Zelenitsky, D. K.; Brikman, D. Eberth, D. Eggshell fragments from the uppermost Cerro del Pueblo Formation (Upper Cretaceous, Mexico). *J. Vertebr. Paleontol.* **2004**, *24*:33A.
44. Cabrera-Hernández, J. S.; Hernández-Rivera, R.; Montellano-Ballesteros. Fossil eggshells and two perinatals dinosaurs from the El Gallo Formation (Late Cretaceous) El Rosario, Baja California, Mexico. *Society of Vertebrate Paleontology, Abstracts of Papers, 78th Annual meeting:100.* **2018**.
45. Hincke, M.; Gautron, J.; Tsang, C.; McKee, M.; Nys, Y. Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan ovocleidin-116. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 32915-32923.

46. Mann, K.; Hincke, M.; Nys, Y. Isolation of ovocleidin-116 from chicken eggshells, correction of its amino acid sequence and identification of disulfide bonds and glycosylated Asn. *Matrix Biol.* **2002**, *21*, 383-387.
47. Hincke, M.; Tsang, C. P.; Courtney, M.; Hill, V.; Narbaitz, R. Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin-17). *Calcif. Tissue. Int.* **1995**, *56*, 578-583.
48. Reyes-Grajeda, J.; Jauregui-Zuniga, D.; Rodriguez-Romero, A.; Hernandez-Santoyo, A.; Bolano-Garcia, V. M.; Moreno, A. Crystallization, and preliminary X-ray analysis of Ovocleidin-17 a major protein of the Gallus Gallus eggshell calcifies layer. *Prot. And Pep. Letts.* **2002**, *9*, 253-257.
49. Reyes-Grajeda, J. P.; Moreno, A.; Romero, A. Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified Gallus Gallus eggshell: implications in the calcite mineral growth pattern. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40876-40881.
50. Reyes-Grajeda, J. P.; Marín-García, L.; Stojanoff, V.; Moreno, A. Purification, crystallization, and preliminary X-ray analysis of Struthiocalcin-1 from ostrich (*Struthio camelus*) eggshell. *Acta. Crystallogr. F.* **2007**, *63*, 987-989.
51. Mann, K.; Siedler, F. Amino acid sequences and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.* **2006**, *143*, 160-170.
52. Legorreta-Flores, A.; Davila-Tejeda, A.; Velásquez-Gonzáles, O.; Ortega, E.; Ponce, A.; Castillo-Michel, H.; Reyes-Grajeda, J. P.; Hernández-Rivera, R.; Cuéllar-Cruz, M.; Moreno, A. Calcium carbonate crystal shapes mediated by intramineral proteins from eggshells of ratite birds and crocodiles. Implications to the eggshell's formation of a dinosaur of 70 million years old. *Cryst. Growth. Des.* **2018**, *18*, 5663-5673.

6.3.2 Capítulo 2

1. Cullen, T. M.; Longstaffe, F. J.; Wortmann, U. G.; Huang, L.; Fanti, F.; Goodwin, M. B.; Ryan, M. J.; Evans, D. C. Large-scale stable isotope characterization of a Late Cretaceous dinosaur-dominated ecosystem. *Geology.* **2020**, *48*, 546-551.
2. Kuang, H.; Liu, Y.; Ning, Z.; Peng, N.; Xu, K. Cretaceous stratigraphy, paleoenvironment and terrestrial biota in Shandong Province. *Open J. Geol.* **2019**, *9*, 650-653
3. Lucas, S. G. Dinosaurs: The Textbook; 6th ed.; Lucas, S. G., Ed.; Columbia University Press: USA, **2016**; Chapter 12.
4. Grellet-Tinner, G.; Chiappe, L.; Norell, M.; Bottjer, D. Dinosaur eggs and nesting behaviors: a paleobiological investigation. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2006**, *232*, 294-321.
5. Grellet-Tinner, G.; Sim, C. M.; Kim, D. H.; Trimby, P.; Higa, A.; An, S. L.; Oh, H. S.; Kim, T. J.; Kardjilov, N. Description of the first lithostrotian titanosaur embryo in ovo with Neutron characterization and implication for lithostrotian Aptian migration and dispersion. *Gondwana Res.* **2011**, *20*, 621-629.
6. Mikhailov, K. E. *Fossil and recent eggshell in amniotic vertebrates: Fine structure, comparative.* Mikhailov, K. E., Eds.; The Paleontological Association, London. **1997**. Pag. 80.

7. Carpenter, K. Eggs, Nests, and Baby Dinosaurs: A Look at Dinosaur Reproduction; Carpenter, K., Ed.; Indiana University Press: USA, **1999**; Chapter 5.
8. Tanaka, K.; Zelenistky, D. K.; Williamson, T.; Well, A.; Therrien, F. Fossil eggshells from the Upper Cretaceous (Campanian) Fruitland Formation, New Mexico. *Hist. Biol.* **2011**, *23*, 41-45.
9. Jackson, F. D.; Varricchio, D. J. Fossil eggs and eggshell from the lowermost two medicine formation of western Montana, Sevenmile Hill Locality. *J. Vertebr. Paleontol.* **2010**, *30*, 1142-1156.
10. Barta, D. E.; Brundridge, K. M.; Croghan, J. A.; Jackson, F. D.; Varricchio, D. J.; Jin, X.; Poust, A. W. Eggs and clutches of the Spheroolithidae from the Cretaceous Tiantai Basin, Zhejiang province, China. *Hist. Biol.* **2014**, *26*, 183-194.
11. Xie, J. F.; Zhang, S. K.; Jin, X. S.; Li, D. Q.; Zhou, L. Q. A new type of dinosaur eggs from Early Cretaceous of Gansu Province, China. *Vertebr. Palasiat.* **2016**, *54*, 1-10.
12. Fernández, M. S.; Wang, X.; Vremir, M.; Laurent, N. D.; Kaiser, G.; Dyke, G. A mixed vertebrate eggshell assemblage from the Transylvanian Late Cretaceous. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, No. 1944.
13. Eagle, R. A.; Enriquez, M.; Grellet-Tinner, G.; Pérez-Huerta, A.; Hu, D.; Tütken, T.; Montanari, S.; Loyd, S. J.; Ramirez, P.; Tripathi, A. K.; Kohn, W. J.; Cerling, T. E.; Chiappe, L. M.; Eiler, J. M. Isotopic ordering in eggshells reflects body temperatures and suggest differing thermophysiology in two Cretaceous dinosaurs. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, No. 8296.
14. Cojan, I.; Renard, M.; Emmanuel, L. Palaeoenvironmental reconstruction of dinosaur nesting sites base on a geochemical approach to eggshells and associated palaeosols (Maastrichtian, Provence Basin, France). *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2003**, *191*, 111-138.
15. Montanari, S.; Higgins, P.; Norell, M. A. Dinosaur eggshell and tooth enamel geochemistry as an indicator of Mongolian Late Cretaceous paleoenvironments. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2013**, *370*, 158-166.
16. Mikhailov, K. E.; Bray, E. S.; Hirsch, K. F. Paratoxonomy of fossil eggs remains (Veterovata): Principles and application. *J. Vertebr. Paleontol.* **1996**, *16*, 763-769.
17. Quinn, B. *Fossilized eggshell preparation*. Leiggi, P.; May, P., Eds.; Cambridge University Press, New York, **1994**. Pag. 146-153.
18. Jackson, F. D.; Schaff, R. J.; Varricchio, D. J.; Schmitt, J. G. A theropod nesting trace with eggs from the Upper Cretaceous (Campanian). Two medicine formation of Montana. *Palaios.* **2015**, *30*, 362-372.
19. Mikhailov, K. E. Classification of fossil eggshells of amniotic vertebrates. *Acta Paleontol. Pol.* **1991**, *36*, 193-238.
20. Grellet-Tinner, G.; Norell, M. An avian egg from the Campanian of Bayn Dzak, Mongolia. *J. Vertebr. Paleontol.* **2002**, *23*, 719-721.
21. Varricchio, D. J.; Barta, D. E. Revisiting Sabath's larger avian eggs from the Gobi Cretaceous. *Acta Paleontol. Pol.* **2015**, *60*, 11-25.
22. Agnolin, F. L.; Powell, J. E.; Novas, F. E.; Kundrát, M. New alvarezsaurid (Dinosauria, Theropoda) from uppermost Cretaceous or north-western Patagonia with associated eggs. *Cretac. Res.* **2012**, *35*, 33-56.

23. Moreno-Aranza, M.; Canudo, J. I.; Gasca, H. M. Unusual theropod eggshells from the Early Cretaceous Blesa formation of the Iberian Range, Spain. *Acta Palaeontol. Pol.* **2014**, *59*, 843-854.
24. Zhao, Z. *Dinosaur eggs in China: On the structure and evolution of eggshells*. Carpenter, K.; Hirsch, K. F.; Horner, J. R., Eds.; Cambridge University Press, New York, **1994**. Pag. 184-203.
25. Espinosa, A. A., Miranda, J. Elemental Analysis of soils as possible resuspended dust sources in Mexico City. *J. Environ. Res.* **2013**, *7*, 1015-1020.
26. Kurzanov, S. M.; Mikhailov, K. E. *The age of dinosaur in Russia and Mongolia: Dinosaur eggshells from the lower cretaceous of Mongolia*. Benton, M. J.; Shishkin, M. A.; Unwin, D. M.; Kurochkin, E. N., Eds.; Cambridge University Press, UK, **1989**. Chapter 28.
27. Nys, Y.; Hincke, M. T.; Arias, J. L.; García-Ruiz, J. M.; Solomon, S. E. Avian eggshell mineralization. *Avian. Poult. Biol. Rev.* **1999**, *10*, 143-166.
28. Dauphin, Y.; Cuif, J. P.; Salomé, M.; Susini, J.; Williams, C. T. Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1761-1771.
29. Nys, Y.; Gautron, J.; Garcia-Ruiz, J. M.; Hincke, M. T. Avian Eggshell Mineralization: Biochemical and Functional Characterization of Matrix Proteins. *Comptes. Rendus. Palevol.* **2004**, *3*, 549-562.
30. Trubnikov, I. L.; Solov'ev, L. A.; Lupeiko, T. G. Synthesis of wollastonite in salt melts. *Glass. Ceram.* **1989**, *46*, 488-489.
31. Vichaphund, S.; Kitiwan, M.; Atong, D.; Thavorniti, P. Microwave synthesis of wollastonite powder from eggshells. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2011**, *31*, 2435-2440.
32. Dennen, W. Impurities in quartz. *Geol. Soc. Am. Bull.* **1964**, *75*, 241-246.
33. Flicstein, J.; Schieber, M. Micro segregation of impurities in hydrothermally grown quartz crystals. *J. Cryst. Growth.* **1974**, *24*, 603-609.
34. Marshall, D. B.; Wilson, C. J. L. Recrystallization and peristerite formation in albite. *Contrib. Mineral. Petrol.* **1976**, *57*, 55-69.
35. Alexander, G. L.; McMahon, S.; Matthews, J. J.; Still, J. W.; Brasier, A. T. Petrological evidence supports the death mask model for the preservation of Ediacaran soft-bodied organism in South Australia. *Geology.* **2019**, *47*, e473.
36. Hoefler, H.; Strelci, C.; Wobrasuchek, P.; Ovari, M.; Zaray, G. Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim. Acta.* **2006**, *61B*, 1135-1140.
37. Biesinger, M. C.; Payne, B. P.; Grosvenor, A. P.; Lau, L. W. M.; Gerson, A. R.; Smart, R. St.C. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 2717-2730.
38. Thermo Scientific. XPS Simplified/Elements Table. <https://xpssimplified.com/periodictable.php> (accessed May 21, 2020).
39. Naumkin, A. V.; Kraut-Vass, A.; Gaarenstroom, S. W.; Powell, C. J. *NIST Standard Reference Database 20. NIST Standard Reference Database*, 2012.
40. Ferreira, F. V.; Souza, L. P.; Martins, T. M. M.; Lopes, J. H.; Mattos, B. D.; Mariano, M.; Pinheiro, I. F.; Valverde, T. M.; Livi, S.; Camilli, J. A.; Goes, A. M.; Gouveia, R. F.; Lona, L. M. F.; Rojas, O. J.

Nanocellulose/bioactive glass cryogels as scaffolds for bone regeneration. *Nanoscale*. **2019**, *11*, 19842-19849.

6.3.3 Capítulo 3

1. Ramírez- Velasco, A. A.; Hernández-Rivera, R. Diversity of late cretaceous dinosaur from Mexico. *Boletín Geológico y Minero*. **2015**, *126*, 63-108.
2. Hubert, J. F.; Panish, P. T.; Chure, D. J.; Probst, K. S. Chemistry, microstructure, petrology, and diagenetic model of Jurassic dinosaur bones, dinosaur natural monument, Utah. *J. Sediment. Res.* **1996**, *66*, 531-547.
3. Marshall, A. O.; Marshall, C. P. Vibrational spectroscopy of fossils. *Pelaeontology*. **2011**, *58*, 201-211.
4. Piga, G.; Santos-Cubedo, A.; Brunetti, A.; Piccinini, M.; Malgosa, A.; Napolitano, E.; Enzo, S. A multi-technique approach by XRD, XRF, FT-IT to characterize the diagenesis of dinosaur bones from Spain. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* **2011**, *310*, 92-107.
5. Heuser, A.; Tütken, T.; Gussone, N.; Galer, S. J. G. Calcium isotopes in fossil bones and teeth - diagenetic versus biogenic origin. *Geochim. Cosmochim. Acta*. **2011**, *75*, 3419-3433.
6. Das, S.; Hendry, M. J. Application of Raman spectroscopy to identify iron minerals commonly found in mine wastes. *Chem. Geol.* **2011**, *290*, 101-108.
7. Sakae, T.; Mishima, H.; Suzuki, K.; Kozawa, Y.; Sahni, A. Crystallographic and chemical analyses of eggshell of dinosaur (Sauropod Titanosaurids sp.). *J. Fossil. Res.* **1995**, *27*, 50-54.
8. Campos-Casal, F. H.; Cortez, F. A.; Gomez, E. I.; Chamut, S. N. Chemical composition and microstructure of recently oviposited eggshells of *Salvator merianae* (squamata: Teiidae). *Herpetol. Conserv. Biol.* **2020**, *15*, 25-40.
9. Choi, S.; Lee, S. K.; Kim, N. H.; Kim, S. Y.; Lee, Y. N. Raman spectroscopy detects amorphous carbon in an enigmatic egg from the upper cretaceous Wido volcanics of South Korea. *Front. Earth. Sci.* **2020**, *7*, 349. 2020.
10. Choi, S.; Han, S. Y.; Kim, N. H.; Lee, Y. N. A comparative study of eggshells of Gekkotia with morphological, chemical composition and crystallographic approaches and its evolutionary implications. *PLoS ONE*. **2018**, *13*: e0199496.
11. Stein, K.; Prondvai, E.; Huang, T.; Baele, J. M.; Sander, M.; Reisz, R. Structure and evolutionary implications of the earliest (Sinemurian, Early Jurassic) dinosaur eggs and eggshells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4424.
12. Ritcher, D. K.; Götze, T.; Habermann, D. Cathodoluminescence of authigenic albite. *Sediment. Geol.* **2002**, *150*, 367-374.
13. McRae, C. M.; Wilson, N. C. Luminescence Database I – Minerals and Materials. *Microsc. Microanal.* **2008**, *14*, 184-204.
14. Yin, Y.; Yin, J.; Zhang, W.; Tian, H.; Hu, Z.; Ruan, M.; Xu, H.; Liu, L.; Yan, Z.; Chen, D. FT-IR and micro-Raman spectroscopic characterization of minerals in high-calcium coal ashes. *J. Energy. Inst.* **2018**, *91*, 389-396.
15. Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; De Faria, D. L. A.; Monteiro, A. M. F.; Afonso, M. C.; De Blasis,

- P.; Eggers, S. Raman spectroscopic study of 3000-year-old human skeletal remains from a sambaqui, Santa Catarina, Brazil. *J. Raman. Spectrosc.* **2001**, *32*, 17-22.
16. Mckeown, D. Raman spectroscopy and vibrational analyses of albite: from 25°C through the melting temperature. *Am. Mineral.* **2005**, *90*, 1506-1517.
 17. Hulsbosh, N.; Thomas, R.; Boiron, M. C.; Dewaele, S.; Muchez, P. Direct observation of borosilicates melt composition: Insights from Raman spectroscopy of melt inclusions in pegmatitic tourmaline of the gatumba-gitarama area (Rwanda). *Canad. Mineral.* **2017**, *55*, 377-397.
 18. Kumar-Yaday, A.; Singh, P. A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy. *RSC. Adv.* **2015**, *5*, 67583-67609.
 19. Timchenko, P. E.; Timchenko, E. V.; Pisareva, E. V.; Vlasov, M. Y.; Red'kin, N. A.; Frolov, O. O. Spectral analysis of allogeneic hydroxyapatite powders. *J. Phys.* **2017**, *Conf. Series: 784-012060*.
 20. Gómez, D. A., Coello, J., MasPOCH, S. The influence of particle size on the intensity and reproducibility of Raman spectra of compacted samples. *Vib. Spectrosc.* **2019**, *100*, 48-56.
 21. West, A. R. Solid state chemistry and its applications. West, A. R., Ed.; John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom, 1984; pp 173-175.
 22. Hoefler, H., Strel, C., Wobrasuchek, P., Ovari, M., Zaray, G. Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim. Acta.* **2006**, *61B*, 1135-1140.
 23. AMCSD: American Mineralogist Crystal Structure Database. Link: <http://ruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>
 24. Pokroy, B.; Kapon, M.; Marin, F.; Adir, N.; Zolotoyabko, E. Protein-induced, previously unidentified twin form of calcite. *PNAS.* **2007**, *104*, 7337-7341.
 25. Bruno, M.; Massaro, F. R.; Rubbo, M.; Prencipe, M.; Aquilano, D. (10.4), (01.8), (01.2), and (00.1) twin laws of calcite (CaCO₃): Equilibrium geometry of the twin boundary interfaces and twinning energy. *Cryst. Growth. Des.* **2010**, *10*, 3102-3109.
 26. Byler, D. M.; Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers.* **1986**, *25*, 469-487.
 27. Kong, J.; Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549-559.
 28. De Meutter, J.; Goormaghtigh, E. FTIR imaging of protein microarrays for high throughput secondary structure determination. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 3733-3741.
 29. Krimm, S.; Bandekar, J. Vibrations spectroscopy and conformation of peptides polypeptides, and proteins. *Adv. Protein. Chem.* **1986**, *38*, 181-364.
 30. Venyaminov, S. Y.; Kalnin, N. N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers.* **1990**, *30*, 1243-1257.
 31. Venyaminov, S. Y.; Kalnin, N. N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous protein in α -, β -, and random coil conformations. *Biopolymers.* **1990**, *30*, 1259-1271.

6.3.4 Capítulo 4

1. Barret, P. M.; Canudo, J. I.; Coria, R. A.; Chiappe, L. M.; Galobart, Á.; Moratalla, J. J.; Pereda, X.; J. de Ricqlès, A.; Royo-Torres, R.; Sanz, J. L.; Weishampel, D. B.; Zhou, Z. Los dinosaurios en el siglo XX. Nuevas Respuestas al Inagotable Enigma de los Dinosaurios. Tusquets., Eds.; 2007, pp 74.
2. Romanoff, A. R.; Romanoff, A. J. The Avian Egg. John Wiley & Sons., Eds. New York. Second printing 1963.
3. Board, R.G. Properties of avian eggshells and their adaptative value. *Biol. Rev.* **1982**, 57, 1-28.
4. Russu, M. V.; Gheorghiu, S. Fractal-like Features of Dinosaur Eggshells. Fractals in Biology and Medicine. Losa, G. A., Merlini, D., Nonnenmacher, T. F., Weibel, E. R., Eds.; Springer, 2005; pp 245-256.
5. Peng, C.; Zou, C.; Yang, Y.; Zhang, G.; Wang, W. Fractal analysis of high rank coal from southeast Qinshui basin by using gas adsorption and mercury porosimetry. *J. Petrol. Sci. Eng.* **2017**, 156, 235-249.
6. Nair, G. G.; Nair, A. S. Fractality of numeric and symbolic sequences. *IEEE Potentials.* **2010**, 29, 36-39.
7. Liu, Y.; Chen, L.; Wang, H.; Jiang, L.; Zhagn, Y.; Zhao, J.; Wang, D.; Zhao, Y.; Song, Y. An improved differential box-counting method to estimate fractal dimension of gray-level images. *J. Vis. Commun. Image. R.* **2014**, 25, 1102-1111.
8. Karhana, M.; Kumar, R. A review on fractal antenna. *Int. J. Eng. Res. Technol.* **2017**, 5, 1-4.
9. Sala, N. Complexity Science, Living Systems, and Reflexing Interface: New Models and Perspectives. Chpt 14: Fractals, Computer Sciene and Beyonce. Orsucci, F., Sala, N., Eds. CRC Press: IGI Globsl, Premiere Reference Source, Hershey, 2012.
10. Graydon, O. A light ride to the stars. *Nature.* **2019**, 13, 227-228.
11. Fan, J. A.; Yeo, W, H.; Su, Y.; Hattori, Y.; Lee, W.; Jung, S. Y.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Falgout, L.; Bajema, M.; Coleman, T.; Gregoire, D.; Larsen, R. J.; Huang, Y.; Rogers, J. A. Fractal design concepts for stretchable electronics. *Nat. Commun.* **2014**, 5:3266.
12. Zhang, K.; Wang, S. Determination of the box-counting fractal dimension of pore distribution in eggshell based on scanning electron microscopy image analysis. *Adv. Mat. Res.* **2012**, 341-342, 776-779.
13. Bramowicz, M.; Kłysz, S. Application of atomic force microscopy (AFM) in the diagnosis of a surface layer. *Aviation Advances & Maintenance.* **2007**, 22, 167-174.
14. Smith, T. G. Jr.; Lange, G. D.; Marks, W. B. Fractal methods and results in cellular morphology – dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neuroscience Methods.* **1996**, 69, 123-136.
15. Yung-Kuan, C.; Yu-Siw, L.; Meng-Hsiun, T.; Mao-Hsiang, C. Vessel box counting dimension of chicken chorioallantoic images. *Int. J. Comput. Control.* **2016**, 5, 26-40.
16. Souza Lins Borba, F. K.; Loos Queiroz Felix, G.; Ventura Lola Costa, E.; Silva, L.; Dias, P. F.; Albuquerque Nogueira, R. Fractal analysis of extra-embryonic vessels of chick embryos under the effect of glucosamine and chondroitin sulfates. *Microvasc. Res.* **2016**, 105, 114-118.

17. Mancardi, D.; Varetto, G.; Bucci, E.; Maniero, F.; Guiot, C. Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. *Theor. Biol. Medical Model.* **2008**, *5*:12.
18. Mansoor, M. S.; Oghabian, M. A.; Homayoun, A.; Shahbabaie, A. Analysis of resting-state fMRI topological graph theory in methamphetamine drug users applying box-counting fractal dimension. *Basic Clin. Neurosci.* **2017**, *8*, 371-386.
19. Li, J.; Du, Q.; Sun, X. An improved box-counting method for image fractal dimension estimation. *Pattern Recognit.* **2009**, *42*, 2460-2469.
20. Bouda, M.; Caplan, J. S.; Sakers, J. E. Box-counting dimension revisited: Presenting an efficient method of minimizing quantization error and an assessment of the self-similarity of structural root systems. *Front. Plant. Sci.* **2016**, *7*, 1-15.
21. Blenkinsop, T. G. Applications of fractal geometry to mineral exploration. *SEG Predictive Mineral Discovery Under Cover.* **2004**, 158-161.
22. Soumya, S.; Swapna, M. S.; Raj, V.; Pillai, M.; Sankararaman, S. Fractal as a potential tool for surface morphology of thin films. *Eur. Phys. J. Plus.* **2017**, *132*, 551.
23. Mandelbrot, B. B. The fractal geometry of nature. Henry Holt & Company., Eds.; 2010.
24. Xia, Y.; Cai, J.; Wei, W.; Hu, X.; Wang, X.; Ge, X. A new method for calculating fractal dimensions of porous media based on pore size distribution. *Fractals.* **2018**, *26*, 12.
25. Carpenter Kenneth. Eggs, Nests, and Baby Dinosaurs. A look at Dinosaur Reproduction. Indiana University Press., Eds.; 1991.
26. Tarhan, L. G.; Hood, A. V. S.; Droser, M. L.; Gehling, J. G.; Briggs, D. E. G.; Gaines, R. R.; Robbins, L. J.; Planavsky, N. J. Petrological evidence supports the death mask model for the preservation of Ediacaran soft-bodied organism in South Australia. *Geology.* **2019**, *47*, e473.
27. Suarez, C. A.; Kohn, M. J. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: review. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **2019**, *268*, 277-295.
28. Kim, C. B.; Al-Aasm, I. S.; Ghazban, F.; Chang, H. W. Stable Isotopic composition of dinosaur eggshells and pedogenic carbonates in the upper cretaceous seonso formation, South Korea: Paleoenvironmental and diagenetic implications. *Cretac. Res.* **2019**, *30*, 93-99.
29. Sharp, Z. Principles of stable isotope geochemistry. Pearson Prentice Hall., Eds.; 2007; pp 344.

6.3.5 Capítulo 5

1. Addadi, L.; Weiner, S. Control, and design principles in biological mineralization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1992**, *31*, 153-169.
2. Hincke, M. T.; Nys, Y.; Gautron, J.; Mann, K.; Rodriguez-Navarro, A. B.; Mckee, M. D. The eggshell: structure, composition, and mineralization. *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 1266-1280.
3. Brionne, A.; Nys, Y.; Hennequet-Antier, C.; Gautron, J. Hen uterine gene expression profiling during eggshell formation reveals putative proteins involved in the supply of minerals or in the shell mineralization process. *BMC Genomics.* **2014**, *15*, 220.
4. Tullet, S. Eggshell formation and quality. (Wells, R. G. & Belyavin, C. G. Eds). Egg quality current problems and recent advances. Butterworth, London. **1987**, pp 123-146

5. Gautron, J.; Nys, Y. Funcion of eggshell matrix proteins. (Huopalahti, R.; López-Fandiño, R.; Anton, M.; Schade, R. Eds). *Bioactive egg compounds*. Springer, Berlin, Heidelberg. **2007**, pp 109-115.
6. Arias, L.; Mann, K.; Nys, Y.; Garcia-Ruiz, J. M.; Fernandez, M. S. (2008) Eggshell growth and matrix macromolecules. (Bäuerlein, E. Eds). In *Handbook of Biomineralization: Biological Aspects and Structure Formation*. Wiley-VCH: Weinheim, Germany. **2007**, pp. 309–327.
7. Mann, K.; Siedler, F. The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer. *Biochem. Mol. Biol. International*. **1999**, *47*, 997-1007.
8. Lakey, J. E.; Krebs, W. G.; Murray-Rust, J. Carbohydrate and glycoconjugates. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2022**, *12*, 565-566.
9. Drickamer, K. C-type lectin-like domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 585-590.
10. Alföldi, J.; Lindblad-Toh, K. Comparative genomics as a tool to understand evolution and disease. *Genome. Res.* **2013**, *23*, 1063-1068.
11. Van Der Heijden, R. T.; Snel, B.; Van Noort, V.; Huynen, M. A. Orthology prediction at scalable resolution by phylogenetic tree analysis. *BMC Bioinformatics*. **2007**, *8*, 83.
12. Henicke, S.; Livstone, M. S.; Lu, C.; Oughtred, R.; Kang, F.; Angiuoli, S. V.; White, O.; Botstein, D.; Dolinski, K. The Princetons protein orthology database (P-POD): a comparative genomics analysis tool for biologists. *PLoS One*. **2007**, *2*, e766.
13. Brinkman, F. S.; Leip, D. D. Phylogenetic analysis. *Methods. Biochem. Anal.* **2001**, *43*, 323-358.
14. Boocock, G. R. B.; Marit, M. R.; Rommens, J. M. Phylogeny, sequence conservation, and functional complementation of the SBDS protein family. *Genomics*. **2006**, *87*, 758-771.
15. Núñez, R. M.; Shi, J.; Mizuguchi, K. Protein fold recognition and comparative modeling using HOMSTRAND, JOY, and FUGUE. (Tsigelny, I. F. Eds). *Protein structure prediction: Bioinformatic approach*. International University Line, La Jolla, California. **2002**, pp 145-166.
16. Korf, I.; Yandell M.; Bedell, J. Blast: An essential guide to the basic local alignment search tool. (LeJeune, L. Eds). O'Reilly & Associates, Sebastopol, California. **2003**. 1st Edition.
17. Huson, D. H.; Richter, D. C.; Rausch, C.; DeZulian, T.; Franz, M.; Rupp, R. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*. **2007**, *8*, No. 460.
18. Hillis, D. M.; Bull, J. J. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **1993**, *42*, 182-192.
19. Virgen-Ortiz, J, J. Ibarra-Junquera, V.; Osuna-Casto, J. A.; Escalante-Minakata, P.; Mancilla-Margalli, N. A.; Ornelas-Paz, J, J. Method to Concentrate Protein Solutions Based on Dialysis-freezing-centrifugation: Enzyme Applications. *Anal. Biochem.* **2012**, *426*, 4–12.
20. Goujon, McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. A new bioinformatic analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 695-699.
21. Reyes-Grajeda, J. P.; Marín-García, L.; Stojanoff, V.; Moreno, A. Purification, crystallization, and preliminary X-ray analysis of Struthiocalcin-1 from ostrich (*Struthio camelus*) eggshell. *Acta. Crystallogr. F.* **2007**, *63*, 987-989.
22. Ruiz-Arellano, R. R. Procesos de biomineralización de carbonato de calcio y proteínas intraminerales de cascarón de huevo de aves. Tesis Doctoral. UNAM. **2014**.

23. Mann, K. Identification of the major proteins of the organic matrix of emu (*Dromaius novaehollandiae*) and rhea (*Rhea americana*) eggshell calcified layer. *Br. Poult. Sci.* **2004**, *45*, 483-490.
24. Kamble, A.; Srinivasan, S.; Singh, H. In-silico bioprospectin: Finding better enzymes. *Mol. Biotechnol.* **2018**, *61*, 53-59.
25. Jones, D. T.; Taylor, W. R.; Thornton, J. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* **1992**, *8*, 275-282.
26. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547-1549.

Capítulo 7.

Participación en Eventos y Artículos Publicados

7.1 PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

7.1.1 Cursos

- ***Crystallography in structural biology: How and dar what to obtain the crystal of a protein?*** Universidad de Buenos Aires, Argentina. Agosto 2018. Modalidad Presencial. Beca: CELFI (Argentina)
- ***FEBS Advanced course: Biomolecules in action II.*** DESY-European XFEL, Hamburgo, Alemania. Junio 2019. Modalidad Presencial. Beca: PAEP (UNAM) y FEBS (Alemania)
- ***INSTRUCT/PlaBEM-Theoretical and practical course: Integrative structural biology in Latin America.*** IBR-CONICET, Rosario, Argentina. Noviembre 2020. Modalidad Virtual

7.1.2 Congresos/Simposios

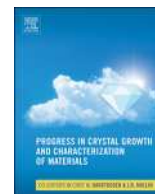
- ***VI Reunión Nacional de Difractometría. I Reunión Internacional de Radiación Sincrotrón. I Reunión de Usuarios Luz Sincrotrón.*** Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Noviembre 2019. Modalidad Presencial
- ***Simposio Virtual del Instituto de Química.*** Universidad Nacional Autónoma de México. Diciembre 2020. Modalidad Virtual
- ***IUCr 2021-XXV General Assembly and Congress of the International Union of Crystallography.*** Praga, Republica Checa. Septiembre 2021. Modalidad Virtual

7.2 ARTÍCULOS PUBLICADOS



Contents lists available at ScienceDirect

Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pcrysgrow

The role of silica and alkaline earth metals with biomolecules in the biomineralization processes: the eggshell's formation and the crystallization *in vivo* for x-ray crystallography

Nerith Rocío Elejalde-Cadena^a, Mayra Cuéllar-Cruz^b, Abel Moreno^{a,*}^a Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Alcaldía Coyoacán, Cd.Mx, 04510. México^b Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Noria Alta S/N, Col. Noria Alta, C.P. 36050, Guanajuato, Guanajuato, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Biomorphs
Silica/carbonate aggregates
Biomineralization
Eggshell
Mineralization of calcium carbonate
Intra-mineral proteins
Protein crystallization
in vivo protein crystallization
in cellulo protein crystallization
Biological crystallogenesis

ABSTRACT

This contribution is a scientific journey divided into three parts. In the first part, we review the role that silica biomorphs of alkaline earth metals have played in the formation of complex structures as a reminiscence of the chemistry of the primitive life on Earth. These biomorphs, and their variety of forms synthesized by simple chemical reactions, can nowadays be experimentally used to explain some mechanisms of biomineralization in living organisms. In the second part, we review the role of calcium carbonates in the formation of eggshells in avian. The mechanism of the mineral eggshell's formation of the biogenic calcite deposited on an organic matrix is revised. The competitive crystal growth mechanism of the mineralized part orientates these crystals preserving the semispherical shape of the egg. We are using these eggshell formations as a second model to understand the biomineralization processes in Nature. The third and final part is about the importance that biomineralization concepts have to produce hybrid materials for the future. This has allowed us to obtain tailored size control of complex morphologies by synthetic chemical procedures that give rise to these new materials' specific forms and ad hoc properties. We conclude this part with the advantage of knowing the biological mechanisms, based on molecular biology concepts, to obtain protein crystals *in vivo* and *in cellulo* techniques. Both methods use the cellular machinery of growing biocrystals in specialized cells that have evolved through millions of years. This new way of producing protein crystals has been trending topic for modern crystallography when using the facilities of the X-ray free-electron lasers (four generation of synchrotrons) for megahertz serial crystallography.

1. Similarities between the biomorphs and biomaterials/biominerals obtained by biomineralization processes

This is the year of the periodic table of the chemical elements, from that table there are 27 elements that play important roles in living organisms and that are catalogued as essentials for life. However, there are two chemical elements, very similar in their chemical properties, that played a central role to understand the chemical origin of life, and still do in present times. These two chemical elements were also important in the formation of complex structures such as in their structure-function relationship. One of these elements is carbon, which is the mainly constituent of membranes, proteins, nucleic acids, polysaccharides, cells, tissues, organs, among others. Carbon does not only have a strong tendency to form multiple bonds, but it is also capable of forming long chains like the biological macromolecules, and thus evolving in time to finally being the main component of cells, tissues,

organs, bodies and a wide variety of species distributed in the five known kingdoms. The second chemical element is silicon, which is one of the most important elements in Nature, and the most abundant chemical element on the crust of our planet as well as the oxygen. This chemical element has a limited tendency to form multiple bonds, which allows it to form hypervalent molecules. Nowadays, silicon is no longer part of the essential element of biological structures in living organisms, and it is only present in a few microorganisms like radiolarians (marine protozoans) and diatoms (unicellular algae), however, radiolarians and diatoms, both secrete siliceous skeletons [1,2], which are an alive reminiscence of the first fossils deposited on Earth million years ago (and found nowadays). Especially in the case of diatoms, the shell or frustule is composed of opaline silica, which is a very unstable form of silica that is transformed to a more stable minerals known as cherts (microcrystalline quartz). Marine sponges are the most ancient multicellular animals and they usually concentrate three mineral elements: iron,

* Corresponding author.

E-mail address: carcamo@unam.mx (A. Moreno).<https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2019.100473>

0960-8974/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

calcium and silicon. Iron occurs in the form of lepidocrocite, calcium in the form of calcium carbonate and silicon in the form of silica. Calcium carbonate and silica are involved in different skeletal structures and spicules. Amorphous silica is the most abundant inorganic skeletal compound in the phylum Porifera. It forms spicules of the hexactinellids, of the demosponges, and of the sclerosponges. Additionally, higher plants producing amorphous hydrated silica structures. Silica-based biostructures are biologically synthesized complex aggregates and usually show species-specific morphology. Their sizes usually are ranging from nanometer to meter scale in exceptional cases [3]. The ancestors of humans used silica for a variety of applications without knowing that it was made of silicon and oxygen. Furthermore, silica (SiO_2) is the main component of many technologically important materials of modern life like solar cells, or the microchips used in electronics, but it is also an important constituent of glasses, abrasives, building materials, among others. Amorphous silica ($\text{SiO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$) and the crystalline polymorphs (like quartz, coesite, stishovite, etc.) are solid materials at room temperature; but in liquid phase (like sodium metasilicate methyl or ethyl orthosilicate) mixed with carbonates and alkaline metal Earth's elements (at alkaline pH) form peculiar crystalline aggregates. These aggregates made of silica-carbonates of Ca, Ba or Sr display a variety of life-like morphologies, which can self-assemble forming complex structures [4]. These complex structures are usually called biomorphs. The biomorphs were firstly obtained when investigating osmotic pressures done by Alfonso Herrera in the middle of the nineteenth century and were rediscovered at the end of the seventies of the twentieth century by García-Ruiz and Amorós [5,6]. These biomorphs could be a reminiscence of the prebiotic chemistry of life [7–10]. Silica is able to auto-organize inorganic nanocrystalline structures, which emulate the living forms as well as the textures of many biominerals. Silica was an essential chemical component of the prebiotic life [11].

The different structural morphologies of living organisms have been emulated *in vitro* in a group of materials, called silica biomorphs or crystalline aggregates of induced morphology [11–16]. Since then, their morphologies have been described, as well as their chemical composition, synthesis methods and characterization techniques [11,12,17–23]. The mechanism of biomorph synthesis is relatively simple: they are formed from nanocrystals of carbonate deposited on a film of silica that are self-assembled, giving rise to highly ordered structures with a variety of complexity, ranging from micrometer to millimeter scales. These mechanisms usually mimic the architectures of organisms obtained through processes of biomineralization [11,16,21,24–26].

For the last four decades, several techniques for the synthesis of silico-carbonates biomorphs have been developed. All these methods require carbonate ions (synthesized from CO_2 gas), silicate solution, cations of alkaline earth elements, an alkaline pH at room temperature [5]. The first method for obtaining biomorphs was the technique called growth in solution, which consists of a mixture of sodium metasilicate solution at a concentration between 1000 to 5000 ppm, with barium chloride (BaCl_2 , 0.1 M) at room temperature and alkaline pH ranging from 8 to 11 [5,13] (see Fig. 1a). The structures of silico-carbonate biomorphs of alkaline Earth metals (mostly made of calcium, barium, strontium salts) are stable for months. The second method of synthesis of biomorphs is that called gel-growth based on diffusion-transport of ions along a silica hydrogel (Fig. 1b). The classic technique for synthesizing these biomorphs consists of a preparation of a silica gel at a pH of 10.5 (pH adjusted with 1M HCl) in a crystallization cell. Once the gel is formed, BaCl_2 (1.0 M) is added to the crystallization cell and the biomorphs are obtained at room temperature [11,13,27,28]. Subsequently, the biomorphs are firstly extracted from the crystallization cell with a kind of good expertise to be observed under the optical microscope, and secondly characterized by different techniques (X-ray diffraction or Scanning Electron Microscopy, RAMAN spectroscopy among others). An additional method, which is similar in the synthesis to the first methodology with certain variations (as shown in Fig. 1) uses

serpentinization. In this procedure the biomorphs are synthesized from alkaline natural water highly concentrated of silica mixed with alkaline earth metals [29]. A third method to obtain biomorphs is the one called gas-diffusion method (Fig. 2), in which the growth of silico-carbonate structures is regulated by the controlled diffusion of CO_2 and movement of ions in solution [30]. Regardless of the synthesis method, once the biomorphs are formed they have to be examined, and consequently characterized by optical microscopy, scanning/transmission electron microscopy, X-ray diffraction techniques and Raman spectroscopy [11,12,16,29,31,32]. All these methods have been recently reviewed [20,33]. The gas-diffusion method as that shown in Fig. 2 allows to obtain silico-carbonate biomorphs in a rather easy way, when some biological macromolecules are incorporated into the synthesis. This methodology requires small volumes of samples and it is appropriate when incorporating biological macromolecules to the synthetic process [32].

There is a variety of morphologies that have been observed in biomorphs as shown in Fig. 3, these are described as follows: cardioid structures (cardioid leaves), helical shapes (helical filaments), funnel-shaped aggregates (circular and conical), worm-shaped, braid structures, twisted curls, framboidal shapes, helical braiding, coral, fractal type, channel type, as well as structures similar to moths, snails, donuts, urns, dendrites, ferns and spheroids [4,11,12,17–20,34]. To explain the formation, and specifically the shape of this variety of biomorph forms, mathematical algorithms have been used [12]. Additionally, time-lapse video-microscopy have also been used to record the formation of biomorphs at the beginning of their growth. One of the biomorphs, whose growth has been observed by video-microscopy is that made of BaCO_3 [12]. From this, it was found that the initial nucleus of the different morphologies is the witherite, which originates pseudo-hexagonal twin-shaped prisms that grow along the c axis. The different morphologies are originated from the breaking of the crystalline symmetry of this nucleus formation [12].

In addition to the formation of BaCO_3 biomorphs, it has been reported that in a general way in these biomorphs, BaCO_3 particles are initially grown assisted by silica polymers (films). Biomorphs formed from calcium carbonate (CaCO_3), have been obtained from the combined crystals of CaCO_3 and amorphous silica, called mesocrystals. Another form of self-organization is that of hollow tubes formed by hydrated metal silicate membranes [12,16,34,35,36]. Interestingly, the biomorphs morphologies (see Fig. 3) are in most cases indistinguishable from the morphologies found in biomaterials/biominerals formed *in vivo* specifically in the Precambrian cherts [37].

A second similarity between the biomorphs and biomaterials/biominerals is their chemical composition as they are both formed by polymorphs of CaCO_3 , BaCO_3 or SrCO_3 . Interestingly due to their morphology and chemical composition, biomorphs are reminiscent of microfossils formed in the Precambrian era. These are known as cherts that could be the chemical basis of current microfossils found as the most ancestral prebiotic forms of life [11,37]. The synthesis of biomorphs as well as the biomineralization processes *in vivo* require multiple controlled steps. In this way the mineralization of skeletons is a biologically- and genetically controlled process done by biomolecules that control the size and morphology of these crystals. In the case of microorganisms, biomineralization has been reported to be carried out in two ways. The first is considered an active mechanism because the metabolic reactions of the microorganism are used to perform the biomineralization. The second mechanism is considered passive, since biomineralization takes place within an exopolymer matrix [38,39].

Fig. 4A shows calcite rhombohedra and bundles of aragonite obtained in the conventional aqueous-based procedure mixing soluble salt of calcium and carbonate ions at controlled temperatures. However, the same synthesis in the presence of hydrolyzed tetraethyl orthosilicate (TEOS) solutions these bundles suffer dramatic changes and form a coral-like self-assembled silico-carbonate biomorph of calcium (Fig. 4B). When it is compared with Fig. 5H (natural coral from the

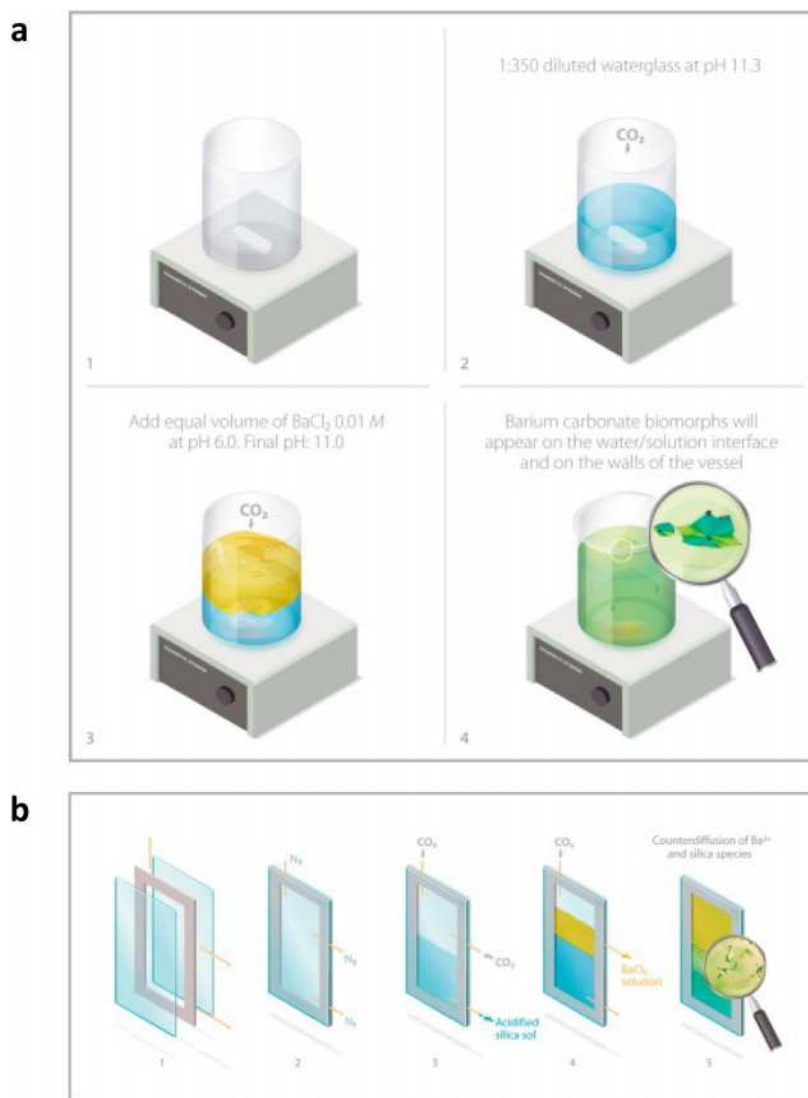


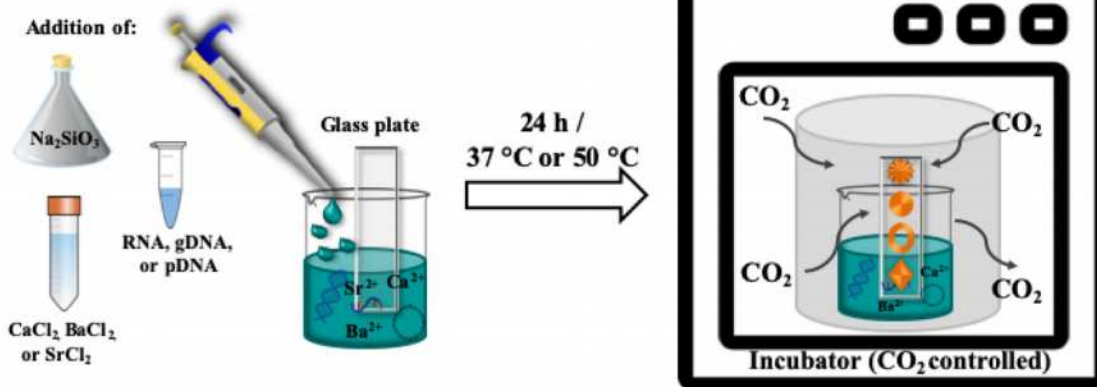
Fig. 1. (a) Sketch of the synthesis of biomorphs in dilute silica solutions. See text for explanations [33]; (b) schematic representation for the preparation of biomorphs in silica gels, utilizing custom-designed crystallization cassettes. The yellow lines indicate needles through which reagents can successively be injected. For further explanations, see text in [33]. With permission of ELSEVIER. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

southeastern Australian seaside) the similitude in the shape is unbelievable. There are some other examples when introducing genomic DNA in the synthesis of biomorphs some morphologies are similar to biological shapes like flowers, leaves, helices, diatoms or radiolarians [32].

Due to the similarities between biomorphs and biomaterials/biominerals, biomorphs are also important for their potential use in tissue regeneration and photonic microarchitectures [31,41,42]. For instance, the biomorphs of SrCO₃ have been used in certain types of biomedical coatings as a scaffold surface, which improves the adhesion of osteoblasts, regulates the activity of alkaline phosphatase and increases the production of collagen. There is also evidence that make clear the potential of biomorphs in tissue regeneration [41]. As described above, biomorphs are micro crystalline structures deposited in silica with unique characteristics that make them a trending topic of fascinating interest that usually opens very interesting scientific discussions. Therefore, even though biomorphs have been suggested to be reminiscent of Precambrian cherts, we can obtain diverse morphologies by several *in vitro* methods in order to use them as biomedical materials or biological markers [43,44]. It is still necessary to carry on exploring different approaches to the synthesis of biomorphs using combinations of

different inorganic compounds and organic molecules close to those existed in the early primitive life or even using clay minerals usually found in the planetary surfaces. The obtainment of these types of biomorphs with novel morphologies that together with the work already done, will unveil the complete formation mechanism of the Precambrian fossils and their similarity in shape and structure with these biomorphs, which has been proposed for several decades by the García-Ruiz's group. There are a number of questions that have not yet been fully elucidated: 1) why do biomorphs share the same characteristics as the biomaterials /biominerals that are part of the living organisms? and 2) why do all living organisms perform biomineralization processes which produce crystals with the characteristics of biomorphs? To address these questions, our working group has synthesized biomorphs in the presence of biomolecules (DNA, RNA) at low and high temperatures in order to get some answers about these questions. Based on this contribution, the characteristics adopted by biomorphs in the presence of nucleic acids, different alkaline Earth metals combinations at different temperatures have been recently published [32]. The obtainment of biomorphs under these conditions would be important because this would emulate, in part, the conditions that existed in the primitive Earth, where these first structures and chemical combinations gave rise

Synthesis



Characterization

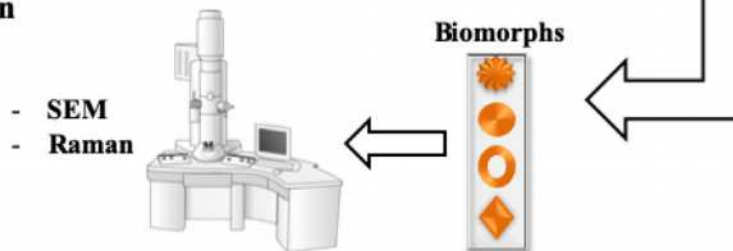


Fig. 2. The experimental set up using the gas-diffusion method. The obtainment of biomorphs is performed on glass plates, 5 mm in length, 5 mm in width, and 1 mm of thickness. The glass plate is placed inside a crystallization cell with a final volume of 200 μL . Biomorphs formation was allowed for 24 h. With permission of CRYSTALS MDPI [32].

to the first cell and the formation of complex biological structures [4,12].

1.1. Biomineralization mechanisms are shared between biomorphs and organisms

Biomineralization is the process where inorganic and organic solids are precipitated or synthesized in living organisms. This process can be pathologic when some anomalous precipitations are obtained like renal, gallbladder, pancreatic stones among others. These biominerals are formed due to high supersaturation of salts in some organs of animals, plants or even in some insects as a kind of crystalline toxins for protection. On the other hand, this biomineralization process is not pathological when bones, teeth, eggshells are formed. We have tried to understand the mechanisms of synthesis of biominerals as well as their relationship with the forms usually obtained in the synthesis of biomorphs at certain physical and chemical conditions.

The following approach has been based on the synthesis of silica-carbonate biomorphs using chemical combinations that the reaction can take place to form life-like forms from mixtures of silicate solutions with different alkaline earth elements, in the presence of biomolecules (nucleic acids) at different temperatures. The morphology of the biomorphs was evaluated using a scanning electron microscope (SEM). The biomorphs were synthesized by means of using the modified gas-diffusion method [30,32]. Briefly, the biomorphs were synthesized on glass plates of $5 \times 5 \times 1$ mm in height x width and thickness. A glass plate was introduced in a cell crystallization containing a solution of sodium metasilicate (1000 ppm), CaCl_2 , BaCl_2 or SrCl_2 (20 mM), 0.1 ng of RNA, genomic DNA or plasmid DNA, pH = 11.0. The extraction of nucleic acids for genomic DNA was performed with the same protocol described in reference [32]. Extraction of Plasmid DNA was performed according to the supplier's instructions of the PureLinkKit™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Finally, RNA was obtained using the modified Trizol technique recently described elsewhere [32]. The

biomorphs were observed under a TESCAN (Brno, Czech Republic) model VEGA3 SB, which has a secondary electron detector of 10 to 20 kV in high vacuum conditions (the working distance was 10 mm).

The combination which enabled biomorph formation was Ca^{2+} and Ba^{2+} (1: 1) at 37°C. As seen in Fig. 6, the observed morphology is a sphere formed of prism-shaped crystals, similar to the silica skeletons produced by radiolarians [45].

Specifically, this type of biomorph is pretty similar to the radiolarian *Actinomma antarcticum*, which is a species with a large, spherical cortical shell, with a rough surface due to small spines. The intermediate medullary sheath is spongy and with numerous beam-shaped projections that connect it to the cortical shell [45]. Interestingly, these spherical biomorphs are constructed by ordered blocks as shown in the microphotographs marked "a" to "e". In Step 1, as seen in the photomicrograph (Fig. 6a) in the lower part, the first block of crystals formed in a circular shape (Fig. 6b). In a second step, the following blocks of crystals are accommodated (Fig. 6c). Later the sphere is almost closed, and the layers of crystals are closing the empty space to complete the sphere (Fig. 6d). In the last step the sphere is completely closed (Fig. 6e). This orderly mechanism of biomorphic formation observed in the formation of spherical morphology, agrees with the synthesis methods reported for other biomorphs [11,12,46]. For example, in some of the biomorphs of BaCO_3 , crystallization begins with the nucleation of a crystal, which grows to a so-called dilation or dumbbell symmetry [46].

Other combinations that were used for the formation of biomorphs were $\text{Ca}^{2+}/\text{Be}^{2+}$, $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ and $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$. DNA or RNA nucleic acids were added to some of these mixtures. All the syntheses were carried out at 50°C, the temperature chosen for the purpose of emulating, as far as possible, one of the conditions of the Precambrian era (Fig. 7).

In the combination of $\text{Ca}^{2+}/\text{Be}^{2+}$, the morphology adopted by the biomorph was spherical with spicules (Fig. 7a). This morphology was also found for the same combination, but in the presence of DNA

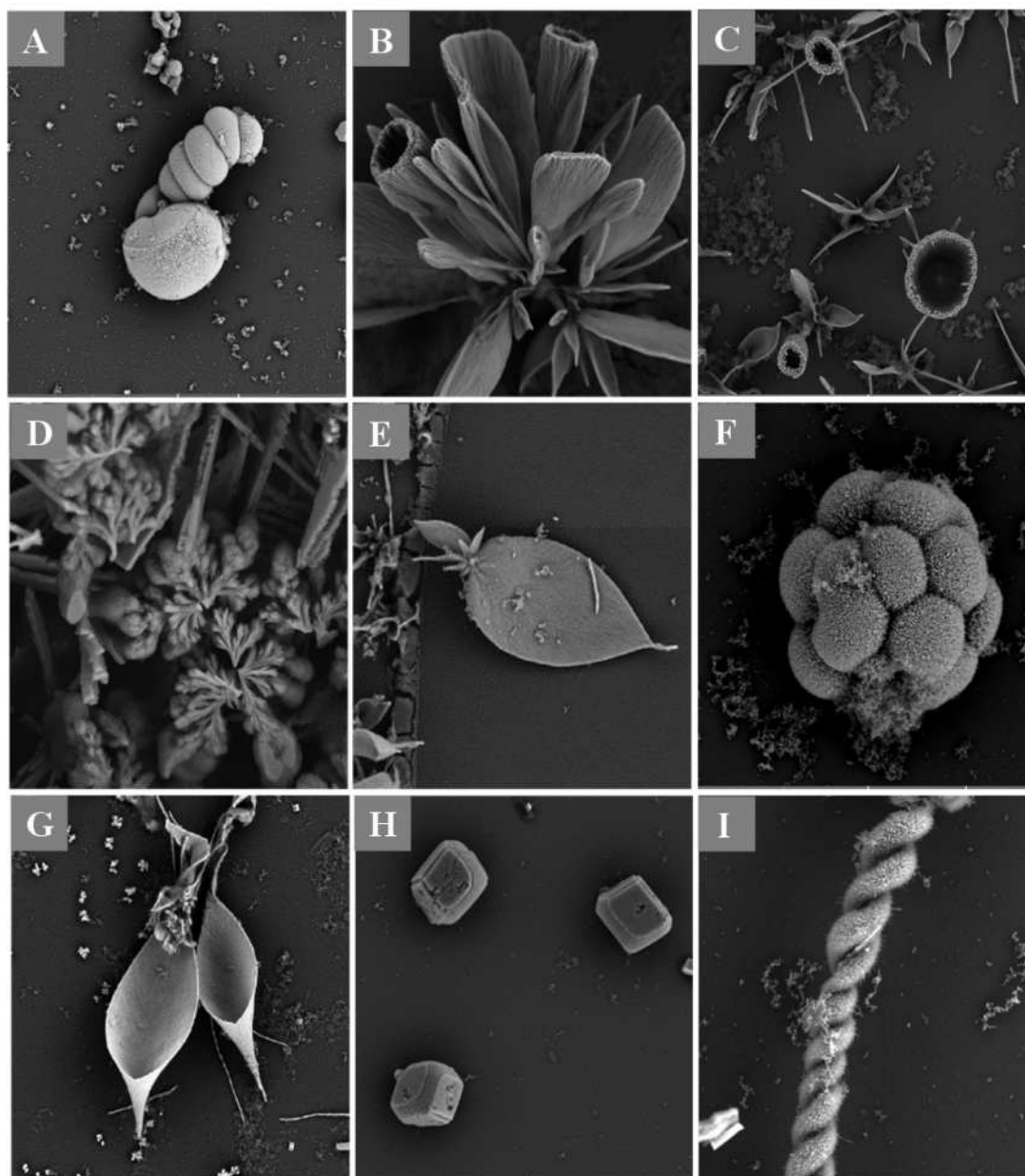


Fig. 3. A taste of the different biomorph morphologies discussed in this work; worms (A), trumpets and cones (B, C, G), coral-like floral spherulites (D), sheets (E), globular bunch (F), funnel-like leaf (G), rhombohedral calcite (H), alpha helix (I).

(Fig. 7b). The structure of the biomorphs adopted in both combinations is similar to the radiolarians *Acrosphaera spinosa* [47]. These radiolarians are a thin-walled spherical shell, with irregular pores, and large and medium-pointed spines [47]. These results are very interesting, because they subscribe in general to the hypothesis that the structures of the biomorphs were the basis for the later formation of organisms, such as radiolarians. Furthermore, the fact that the biomorphs obtained have a morphology similar to radiolarians, may be additional evidence that the radiolarians, having contained a structure resulting from a mechanism of biomineralization generated in the Precambrian era, these mechanisms have preserved the same process of biomineralization until now.

For the combination of $\text{Ca}^{2+} / \text{Be}^{2+}$ with RNA, an array of primarily orthorhombic crystals was found (Fig. 7c). This crystal morphology corresponds to the polymorph aragonite of CaCO_3 . Aragonite is the form of CaCO_3 present in the shells and skeletons of many groups of organisms.

This polymorph has been identified in the oldest known fossils, which correspond to the Paleozoic era [48]. These results, in conjunction with our result, indicate that the presence of aragonite may not be a product of a fortuitous event, but the result of a biomineralization product that was carried out by the first organism formed in the Precambrian, which has been preserved to the present time.

The combination of $\text{Ca}^{2+} / \text{Ba}^{2+}$ without DNA formed structures of multiple joined spheres (Fig. 7d). The biomorphs synthesized with the same elements, but with DNA (Fig. 7e) or RNA (Fig. 7f), had spherical morphology with a rough surface formed by crystals, like the radiolarian *Haliomma* spp. [49]. This radiolarian is formed by spherical forms characterized by a cortical skeleton, with circular pores located in polygonal cells. It has spines in the intersections and two piths joined by arms, some of which protrude like short conical spines. This species was recorded for the Lower Paleocene of New Zealand [50]. This result indicates that possibly calcium, like other alkaline earth elements, mainly Barium or Strontium, are those that governed the structure of

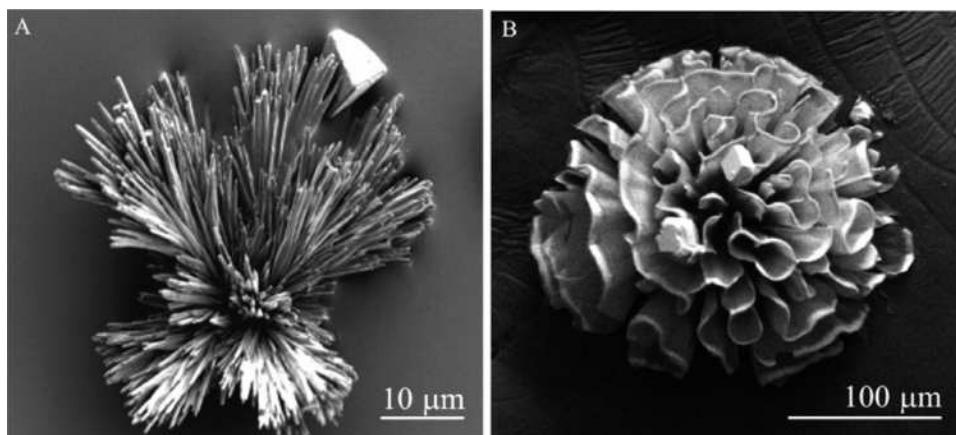


Fig. 4. SEM images of a cluster precipitate in the absence (A) and in the presence of silica sol (B). *Crystal Growth & Design* 2008, 8, No. 5, 1515-1521 with permission of the ACS [40].

living organisms from their origin. Those are the origin of the different morphologies as we currently know them.

A third combination that was interesting was $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$. The morphology of the synthesized biomorphs emulates a flower with leaves in the shape of spicules, or a coral. These are complex structures obtained far from equilibrium (Fig. 7g). This morphology that has been previously observed in other conditions of synthesis has been observed [51]. It has been reported that synthesis of this morphology can be carried out from aragonite seeds, which are incorporated on the substrate and in this way the coral-like shapes are obtained [52]. Another

mechanism of formation of this type of structure starts with the precursors called dumbbells, which become pitted spherical clusters. The stems of the bunches are elongated, and the petals begin to form. Finally, the helical extensions of the tips of the petals ends and the growth stops [53].

In combinations of $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ with DNA (Fig. 7h) this morphology is much more similar to a coral-shaped or RNA (Fig. 7i) biomorphs with spherical morphology were obtained, as was also observed for $\text{Ca}^{2+}/\text{Ba}^{2+}$ combinations with nucleic acids (Fig. 7e, 7f). The morphologies found in the biomorphs of $\text{Ca}^{2+}/\text{Sr}^{2+}$ with nucleic acids are like

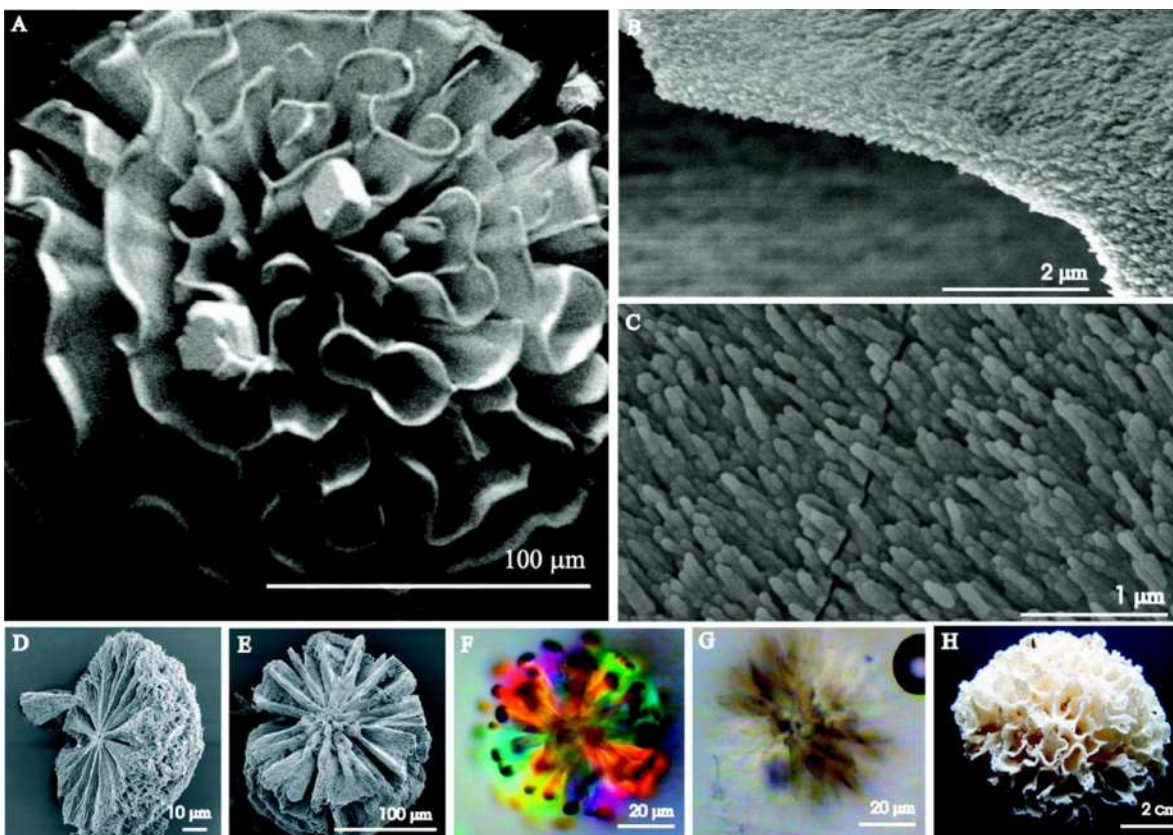


Fig. 5. (A) Self-assembled "coralline" silica-calcium carbonate biomorphs. (B, C) High-magnification image of "coralline" silica-calcium carbonate showing the orientational ordering of crystallites. (D, E) Different positions of the silica-carbonate composites showing the starting point of nucleation and the orientation of the sheets. (F) Optical micrograph of silica-calcium carbonate aggregates viewed between crossed polarizers. (G) Carbonate dissolution from the carbonate-silica material, leaving a silica "ghost". (H) Natural coral from the southeastern Australian seaside. *Crystal Growth & Design* 2008, 8, No. 5, 1515-1521. With permission of the ACS [40].

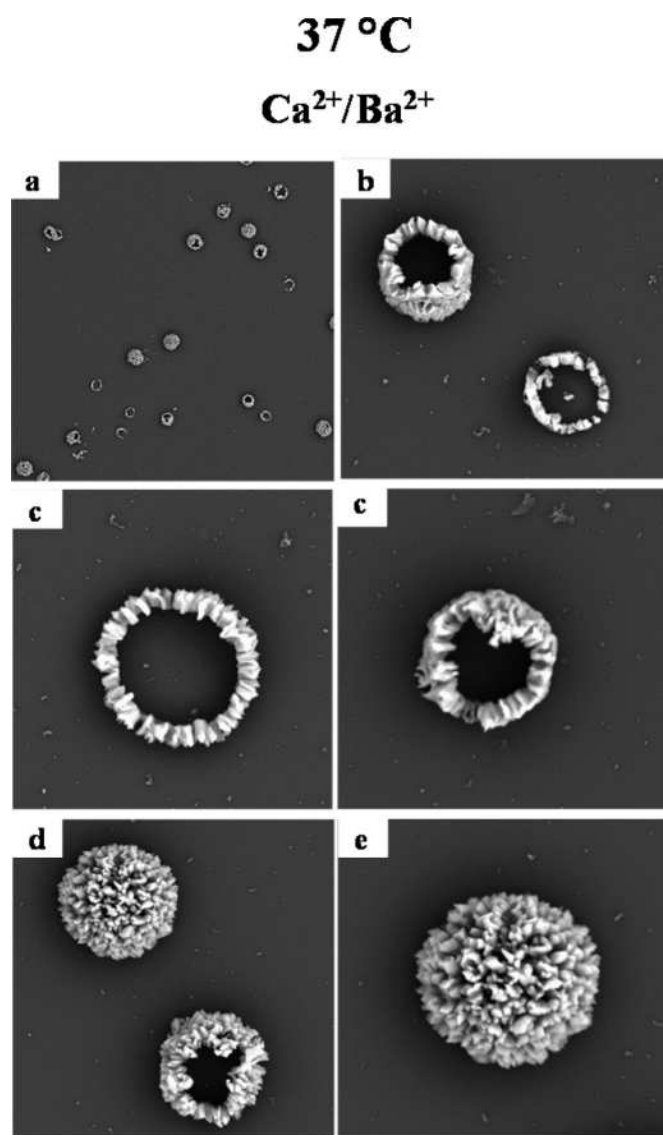


Fig. 6. SEM microphotographs of the sequential formation (a–e) of silica-calcium-barium carbonate biomorphs at 37 °C. Sequential steps formation of a spherical biomorph showing its hollow internal structure.

radiolarian or spherical diatom structures [45]. All the spherical morphologies of the biomorphs obtained in the different combinations of Ca²⁺ with some of the other alkaline earth elements (Fig. 7), follow a fractal growth, as reported by other work groups [4,54].

Interestingly, combinations of calcium with other alkaline earth elements show that they can give rise to biomorphs with morphology reminiscent of the first organisms formed in the Precambrian era. Therefore, hard structures are invaluable in order to understand both the evolution and the future of the species. Another alkaline earth element that can form biomorphs is barium. We combined barium with both Be²⁺ and Mg²⁺. For the first combination in which there was only Ba²⁺/Be²⁺, the morphology of the synthesized biomorphs had stems with leaves, emulating a fern (Fig. 8a).

This fern-type morphology has been previously reported by other authors also in the presence of Ba²⁺ [4]. The mechanism of formation of this type of fern-type morphology is fractal type. In this branching formation mechanism, the individual branches are physically separated from each other, and form structures like dendrites, which are connected to form a dendritic structure similar to a fern [4,54]. This fractal method by which the formation of independent branches has been described, is perhaps the method of biomineralization and formation of

the morphology that the plants present. In the case of the combination of Ba²⁺/Be²⁺ in the presence of DNA, the biomorphs presented morphology like an arrangement of thin cross-linked sheets (Fig. 8b).

This morphology is like the mineral arrangements of witherite or aragonite. This structure is possibly the one that can emulate the process of mineralization that minerals follow.

In the case of Ba²⁺/Be²⁺ in the presence of RNA, the morphology of the biomorphs is similar to bound leaves, covered with tiny wool (Fig. 8c). This growth mechanism can be a fractal type, with the difference that the leaves are not physically separate, as has been described for fern-type biomorphs (Fig. 8a). This morphology of leaves united with small hairs that cover it (Fig. 8c), is like plants of the species *Tradescantia sillamontana*. It is also similar to the shape of the clover leaves, but most precisely to the foraminifera *Streblus compactus* [55].

For the combination of Ba²⁺/Mg²⁺ biomorphs were formed in the presence of only these two elements (Fig. 8d). The biomorphs that were produced in this mixture were crystal arrangements like those found in rock minerals (Fig. 8d). This morphology is one of the preferred forms of minerals, since it may be the same process of thermodynamically more stable mineralization that the minerals of that time followed from the formation of the terrestrial layers, and it is the one that has been preserved to the present time. Meanwhile, for the combination of Ba²⁺/Mg²⁺ in the presence of DNA, biomorphs with a peculiar structure were found two spheroids joined by stems (Fig. 8e). This type of morphology is likely to be obtained by fractal growth, because it has been observed that biomorphs containing Ca²⁺ have a morphology where two dendrites are separated by a stem [4,54]. In the mixture of Ba²⁺/Mg²⁺ in the presence of RNA, biomorphs with spheroidal morphology were found (Fig. 8f). This type of morphology is carried out by means of a fractal growth that starts with the union of dendrites, followed by with crystal growth to generate a kind of broccoli flowers-like, to then change to framboidal forms, to finally produce spherical forms [4,54].

The third element with which biomorphs were synthesized was strontium. The first mixture analyzed was Sr²⁺/Be²⁺. In the combination without nucleic acids, a morphology of floral arrangements was observed, emulating the plants of *Tulipa* spp. (Fig. 9a).

This result is interesting because a biomorph with a morphology that is almost perfectly similar to a plant suggests, once more, that the mechanism of biomineralization that takes place in the biomorphs (Fig. 9a), may be the basis by which similar structures in plants or other organisms are generated. For example, it has been reported that there are organisms such as algae and invertebrate organisms that contain strontium in their structure [56]. This type of conical funnel or vessel type morphology has been induced by other research groups using the CO pulse technique [30]. Unlike our synthesis where the presence of another alkaline earth element such as Beryllium, induced the formation of glass type or conical funnel, but also with leaves and stems (Fig. 9a).

Another combination used to form biomorphs was Sr²⁺/Be²⁺ with DNA. In this mixture biomorphs were formed with a morphology of a flower with a cup (Fig. 9b), like some of the species of *Lilium candidum*. As mentioned for the case of the tulip-type biomorphs (Fig. 9a). These morphologies can be the basis of the structures of plants that we currently know, which are conserved in the presence of DNA (Fig. 9b). A third combination of strontium was Sr²⁺/Be²⁺ in the presence of RNA. In this mixture biomorphs with spherulitic morphology were found, though with a slight division in the center (Fig. 9c). It has been reported that this type of structure follows a fractal-growth mechanism. Specifically, they are biomorphs of the framboidal type [4]. This type of spherulitic biomorph with division in the center, emulates the foraminifera *Miliolinella subrotunda* [57], which has a circular contour shell, wide and rounded peripheral margin, smooth walls, occasionally with transverse grooves. This type of foraminifera is benthic from the Southeast Pacific [58], these organisms are taken as bio-indicators for copper pollution [59]. This result indicates that the shape and form of

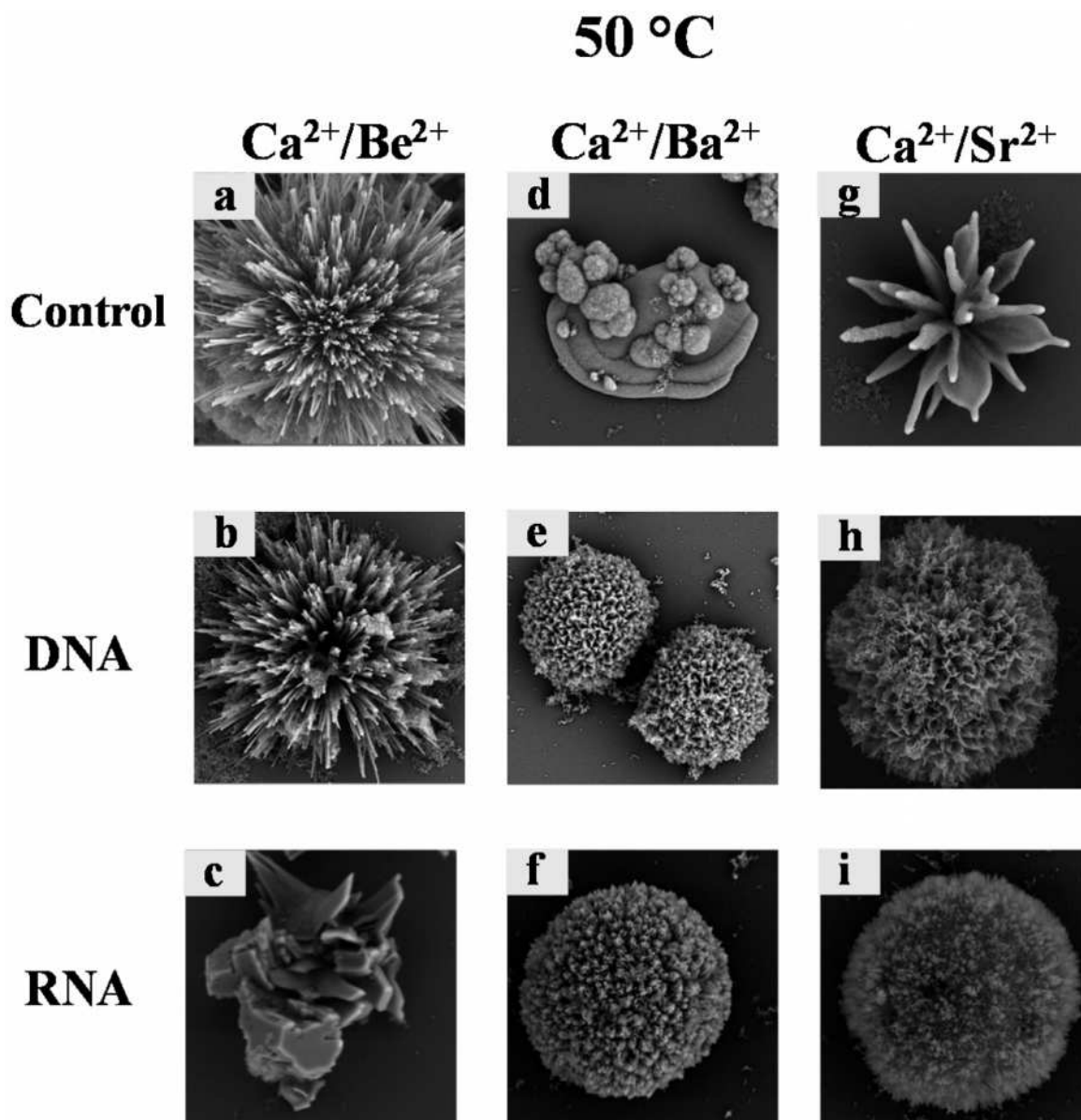


Fig. 7. SEM microphotographs of silica-calcium-barium and silica-calcium-strontium carbonate biomorphs obtained in different combinations.

the foraminifera was a biomineralization process that existed from the early stages of the earth.

The next combination in which the biomorphs were produced was Sr²⁺/Mg²⁺. In the mixture without nucleic acids, the morphology adopted by the biomorphs was a star or cross (Fig. 9d), like a common starfish. This type of structure is somewhat like other biomorphs that have been previously reported by [60,61], where the growth mechanism is also a fractal type. In the combination of Sr²⁺/Mg²⁺ in the presence of DNA, a globular (potatoes bunch) form was identified, formed by globular aggregates (Fig. 9e). This structure has been described for decades as a common morphology of biomorphs [5]. But unlike the structure reported previously [5], in our case, this type of globular morphology was obtained in the presence of DNA and two alkaline Earth elements (Fig. 9e).

A mixture of Sr²⁺/Mg²⁺ with RNA was also used for the synthesis of biomorphs. In this combination a spherulitic structure was again identified, but with the difference that there were small spheres in its interior (Fig. 9f). The formation of this structure in biomorphs is also done through fractal growth. This structure like the foraminifera *Trochammina sauce*, which is described as a planispiral-shell in its first

chambers, while the last chambers are globular and cemented with grains of sand. This result indicates, as in the other similar morphologies with foraminifera, that the different structures of the foraminifera are the product of a biomineralization process that existed from the earliest stages of the Earth that has been preserved to nowadays.

In addition to obtaining biomorphs in various combinations of alkaline earth elements in the presence or absence of a nucleic acid (DNA or RNA), we were also interested in knowing the morphologies that could be obtained in the presence of the two nucleic acids (DNA and RNA) in the presence of Ca²⁺, Ba²⁺ and Sr²⁺. The first experimental set up in order to prepare a set of combinations was by adding Ca²⁺ with DNA and RNA. The biomorphs obtained from this combination presented polycrystals of rhombohedral morphology (Fig. 10a).

The fact that the same biomorph structure is obtained both in the presence of DNA [32] and in the presence of DNA + RNA (Fig. 10a), indicates that DNA is the biomolecule that determines the morphology that the biomorph will adopt on RNA. This is interesting, because even though RNA was the first biomolecule that existed in the Precambrian era, DNA is the biomolecule that determines the morphology of the structures of living beings and is the key biomolecule for perpetuation

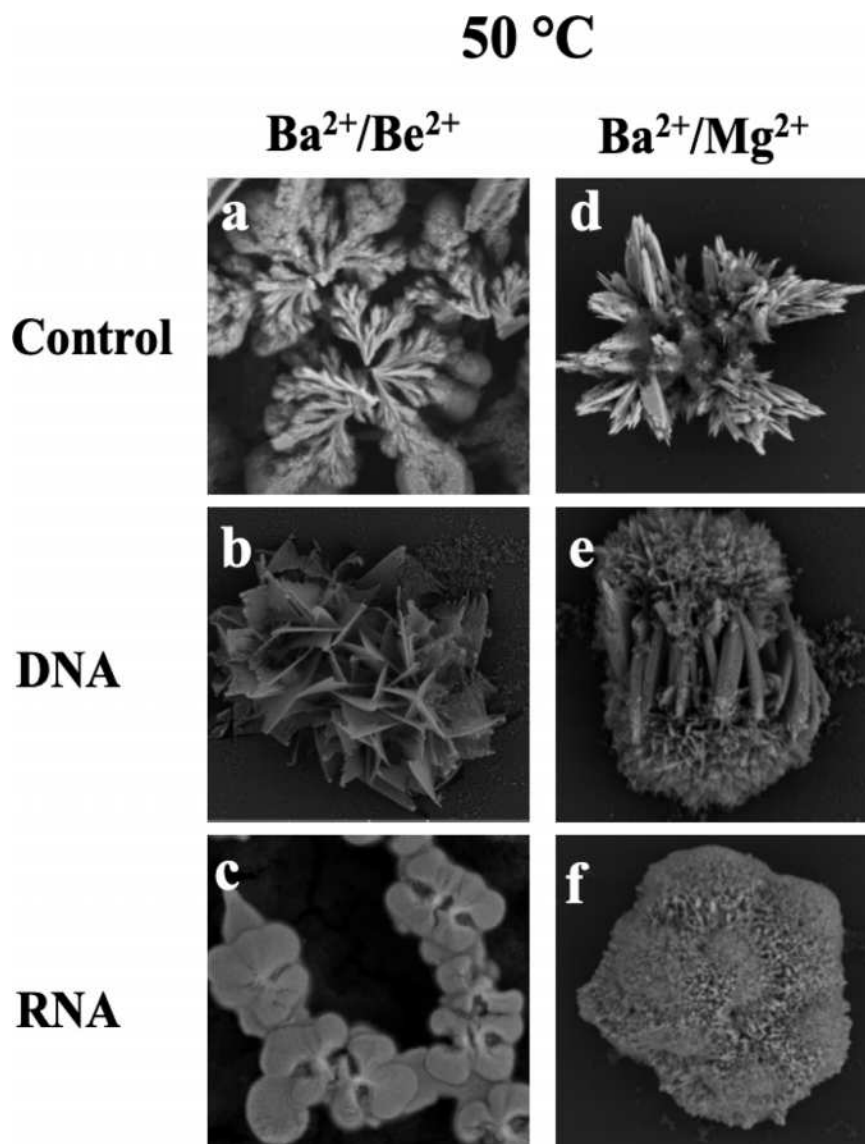


Fig. 8. Silica-barium-beryllium and silica-barium-magnesium carbonate biomorphs visualized through SEM.

of the species.

The next combination used to form biomorphs was DNA + RNA with Ba²⁺. The morphology of the biomorphs obtained for this mixture was that of a leaf attached to the substrate (Fig. 10b). This type of structure has also been reported by other working groups for witherite biomorphs [10,51].

The third combination used in the formation of biomorphs was DNA + RNA with Sr²⁺. The structure found in this mixture was spherulitic with some dividing lines (Fig. 10c). This morphology is similar to that obtained in the combination of Sr²⁺/Be²⁺ with RNA (Fig. 9c). As described above, it is a structure like the foraminifera *Miliolinella subrotunda* [57]. Finally, biomorphs were obtained with the mixture of Ca²⁺/Ba²⁺/Sr²⁺ and DNA + RNA, which presented a morphology of ellipsoid-like with crystals structures on the top (Fig. 10d). This morphology may be the basis of the structure of some organisms, as has been described in some species of algae, invertebrates and fish from the Irish Sea [56]. The different morphologies of the biomorphs obtained from different combinations of the alkaline earth elements (Figs. 6–10), with or without nucleic acids, indicate that the process of mineralization responsible for morphologies from microorganisms to higher organisms began in the primitive earth.

1.2. Biomineralization mechanisms and cases studies on calcium carbonate growth in eggshell's formation

Later, when the first biomolecule RNA was present, the mineralization process continued as a biomineralization process perpetuated through DNA and keeping some forms as reminiscence of the original combinations of inorganic chemicals. Since the skeletons of humans and all higher organisms that exist or existed (such as the skeletons of dinosaurs) and the structures of eggshells, diatoms, radiolarians, mollusks, shells, etc. are fundamental to life, the biomineralization process is perhaps the most important mechanism that generated life. These biomorphs can help to elucidate the chemical origin of life, since they are reminiscent of the first organisms that inhabited the Earth, they conserve the biomineralization mechanisms from the Precambrian era to the present era. While our results contribute to the understanding of this process, we are still far away from the total explanation of the formation of organisms and the origin of life. However, our group continues working to gain this knowledge. One example of these preserved mechanisms for instance is the formation of eggshells in different avian. In the eggshell's formation calcium carbonate crystals are epitaxially grown on the surface of an organic membrane (in a competitive mechanism of crystal growth). The preservation of some

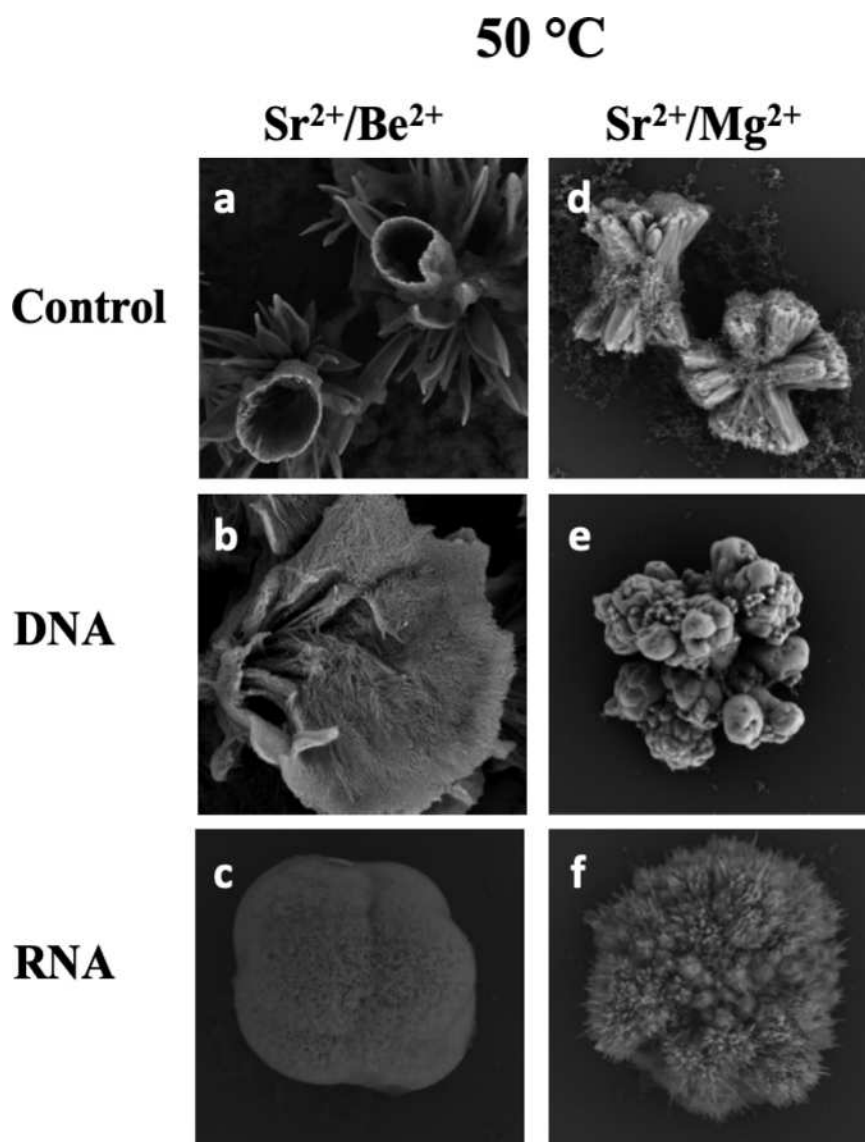


Fig. 9. SEM microphotographs of silica-strontium-beryllium and silica-strontium-magnesium carbonate biomorphs obtained at different combinations.

ancient biomineralization mechanisms in real cases have been published elsewhere [62-64]. For instance, the experimental simulations of the mineralization phenomena in avian eggshell's formation using silica biomorphs of witherite grown in an alkaline silica matrix. These mechanisms are preserved as shown in Fig. 11, where the surface of two biomorphs (dendrite-like (a) and laminar-type (b) of silica biomorph of witherite) was analyzed by using atomic force microscopy.

The same characterization was performed in the case of a real eggshells from *Gallus gallus domesticus* and *Pavo cristatus* as shown in Fig. 12. The orientation of crystals is exactly the same as those observed in the biomorphs of Fig. 11, but in this case, grown in a surface of an organic membrane (usually called organic matrix). In Fig. 11 the membrane was a silicate membrane (polysiloxane) obtained at alkaline pH where crystals of barium carbonate were epitaxially grown forming a classical silica biomorph is witherite. The difference is just the scale, the biomorphs are in the scale of microns, and the eggshells are in the scale of centimeters [62].

The beauty of Nature is precisely the existence of certain forms, which are present everywhere [37]. The curvature is the hallmark of living organisms, this is not observed in the classic crystals where right angle is one of their most common features, though there are also other types of angles. There are some correlations between the forms found in

living organisms and those forms found in the biomorphs that helps to understand the shapes in Nature: the sphere protects, the hexagon fulfills the space, the spiral is packing, the helix is used to support things, the right angle is used for penetration, the wave is used for communication, the parabola is the shape of emission and reception, the chain is for resistance and support, the fractals are a perfect model to understand the colonization.

2. Biomineralization of calcium carbonate in the formation of eggshells

In the previous section we already mentioned that the biomineralization is the biologically mediated process observed in Nature through which living organisms form amorphous or highly ordered crystalline structures with specific size, morphology, mechanical and biological properties [63,64]. These structures are composed of either inorganic (usually called biominerals) [65] or organic [66] materials, which drive the development of complex biological structures. These biominerals are obtained, via living organism through mineral phase deposition following processes of nucleation from the supersaturated solutions. This process is usually called biologically induced mineralization. The second type is performed by the direct regulatory control

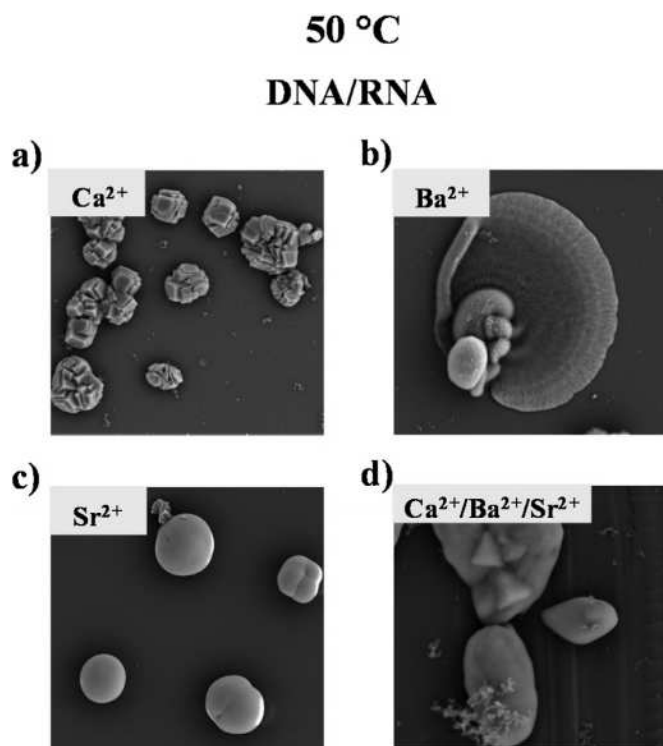


Fig. 10. SEM microphotographs of CaCO_3 , BaCO_3 , SrCO_3 and silica-calcium-barium-strontium carbonate biomorphs obtained in a combination of DNA + RNA.

of the organism, when highly organized protein and carbohydrate matrices work as templates for the nucleation and organization of nanostructured inorganic phases, this is called organic or matrix-mediated mineralization [67]. In different species the inorganic phase is not only composed of carbonates, but it can also be composed of phosphates, sulfates, oxalates, oxides, silicates, among others; associated with a phase known as the organic matrix that are often controlled by

biological macromolecules integrated in the mineral phase [68,69]. The organic matrix is composed of biological macromolecules such as acid proteins, phosphoproteins, glycoproteins, polysaccharides, lipids or a mixture of them. This matrix plays an important functional role in the control and growth of the mineralized structure [70,71].

Biomineralization in animals as well as in humans plays important biological functions such as mechanical strength, structural support and protection of soft tissues [72]. In humans though, the process of biomineralization has other important aspects like when, for example, mineral deposits, in abnormal and pathological conditions, affect blood vessels, muscles, tissues and, in some cases, internal organs. This process is called pathological or ectopic calcification which can cause morbidity or even mortality [73]. The pathological biomineralization is a highly regulated process resulting from aging though it can also be caused by several diseases, i.e; hypertension, dyslipidemia, obesity, etc. High concentrations of ions or molecules that reach high intracellular supersaturation values, for example, calcium, produce precipitations leading to the release of muscle cell matrix vesicles, formation of apoptotic bodies and remodeling of the matrix, contributing also to vascular calcification and formation of kidney and biliary stones [74,75].

On the other hand, non-pathological biomineralization is the process carried out under biological control [76] and this process can also be genetically controlled [3]. It consists in the formation of bones, teeth, shells in mollusks, and eggshells in birds that are exclusively found the polymorph of calcite [77,78]. Particularly, the patterns and shapes are strictly related to the interaction between biological macromolecules and biominerals [79].

In nature, there are a lot of biominerals that can present polymorphism which is the ability of solid materials to have different crystal symmetries and structures, while maintaining the same chemical composition (like calcite, aragonite and vaterite, as an example). A single crystal is a solid characterized by a unit cell, which is repeated periodically in three dimensions forming a homogeneous structure. The external shape of a crystal shows planar faces forming dihedral convex angles, while concave ones are exhibited by twins. According to crystallization conditions (existence of substrates, fluid-dynamic regimes, competition for crystallization space, etc.) aggregates of crystals can

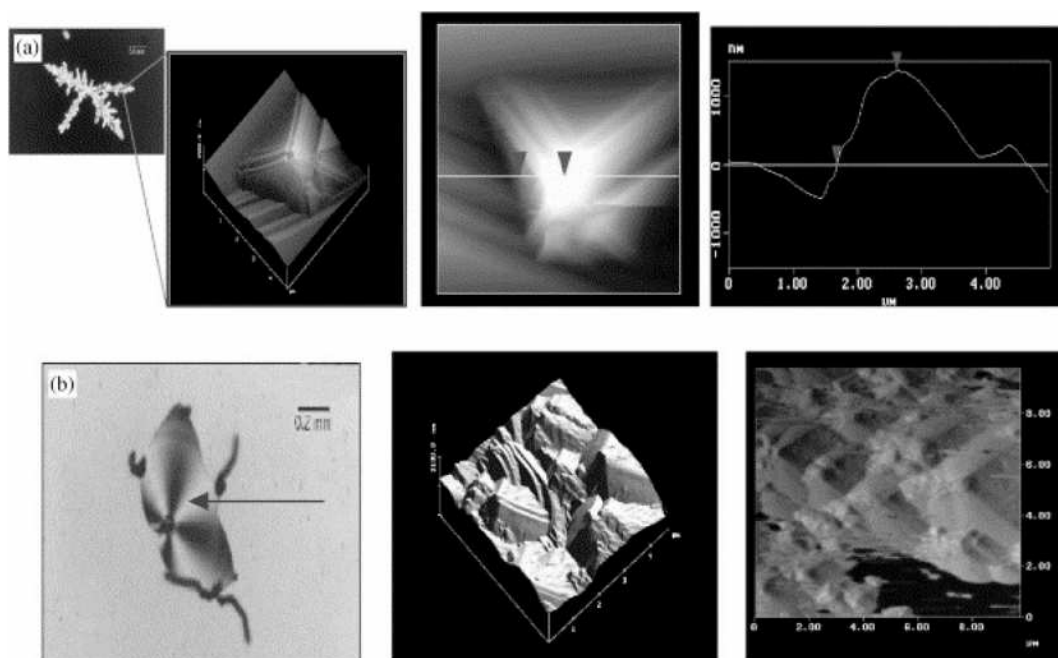


Fig. 11. Structural characterization using atomic force microscopy of the induced morphology crystalline aggregates for (a) dendrite-type crystalline aggregate and (b) lamina-type crystalline aggregate. With copyright permit [J. Crystal Growth 234(2002) 227-236] [62].

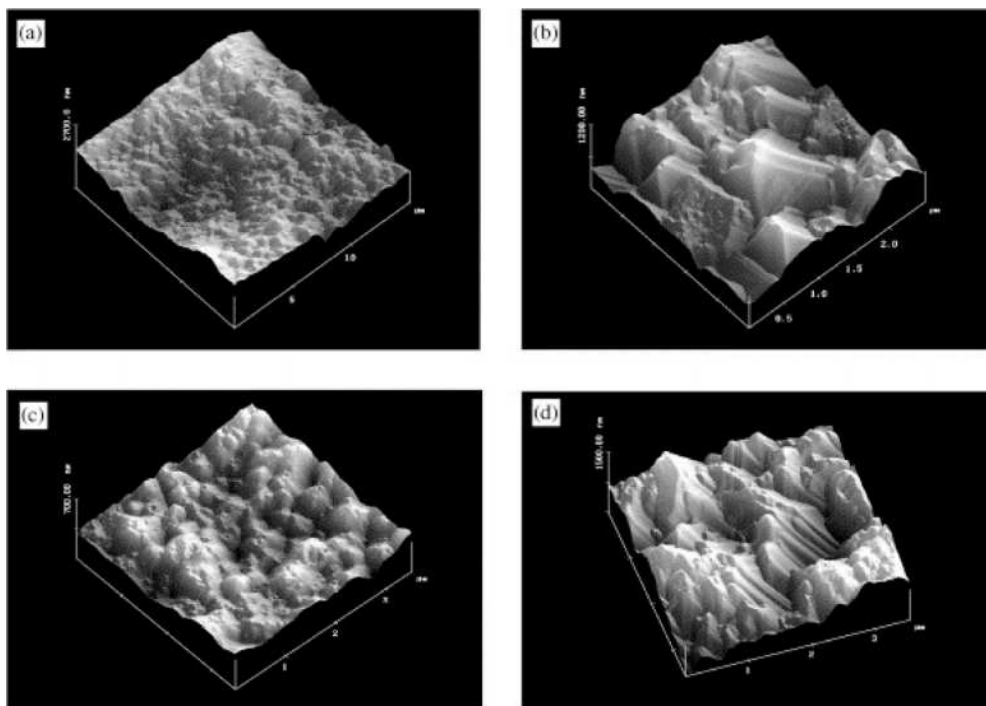


Fig. 12. Structural characterizations of avian eggshells using atomic force microscopy, images correspond to eggshell of hen (*Gallus gallus domesticus*): (a) with external membrane protection, (b) without external membrane protection. Eggshell of Turkey (*Pavo cristatus*) (c) with membrane protection and (d) without membrane protection. With copyright permit [J. Crystal Growth 234(2002) 227-236] [62].

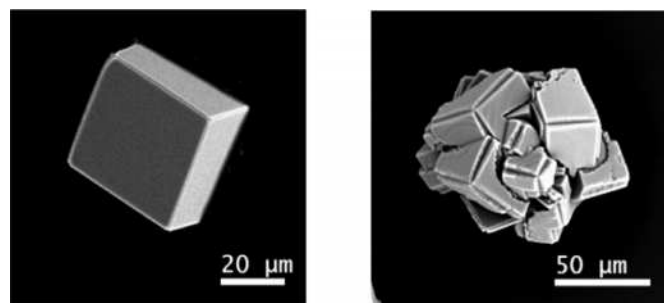


Fig. 13. Calcium carbonate crystal (calcite) synthetically obtained (left), and synthetic polycrystalline aggregate of calcium carbonate (right). Pictures obtained in scanning electron microscopy (SEM).

form without a pre-definite order [80]. A classic crystal with rhombohedral shape and a polycrystalline aggregate of the most occurring calcium carbonate polymorph (calcite) is shown in Fig. 13.

In general, the nucleation of a crystal is usually followed by an adsorption process onto the growing crystal surfaces, in a supersaturated mother phase. In other words, the variation of the free Gibbs energy of the system reaches a maximum (critical activation energy) and then nucleation takes place; then, growth of the nucleus spontaneously occurs through the deposit of new molecules on the just formed faces of the crystal [81,82]. In a supersaturated condition, the number of crystal growth units reaching the faces (adsorbed units) is greater than the number of growth units leaving the crystal surface (desorbed units). So, the crystal habit is determined by the different advancement rates of the different faces, due to character of the faces (flat, stepped, kinked) and to the value of the growth temperature and supersaturation of the mother phase (vapor, solution, melt) [83]. In Fig. 14, the formation of structural growth sites on a flat crystalline surface can be observed, where the adsorption sites on the terrace, edges, and kink positions are the most important ones for growth.

In Nature, calcium carbonate (CaCO_3) is one of the most abundant biominerals usually found in combination with biological macromolecules [67]. This is usually found in three most important polymorphic forms: calcite, aragonite, vaterite, but it is also found in the

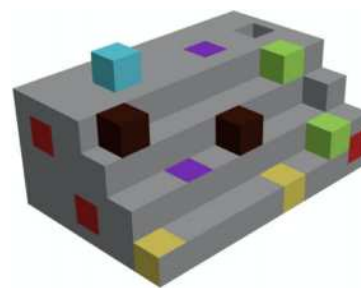


Fig. 14. Sites of growth that can be found in the crystal: red: side face; brown: filled adsorption site to the step; green: adsorbed to kink; purple: free adsorption site on the terrace; yellow: filled sites in a step ledge and on the surface; blue: filled adsorption site on the terrace. Image based on reference [84]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

three other less common and not-polymorphic crystal phases, like calcium carbonate hexahydrate, monohydrate and, finally, as an amorphous phase [85,86]. Among them, calcite is the most thermodynamically stable polymorph, followed by aragonite and vaterite. In aqueous solution at given pH values, vaterite transforms in the polymorph calcite at low temperature, whereas at a high temperature, it forms the polymorph aragonite, which is mainly found in corals [87,88]. It is very interesting to find calcium phosphates in most of the vertebrates, whereas calcium carbonate is found in mainly eggshells.

Particularly, the eggshell is a rigid part of the avian's egg with an oval structure that is suitable for gaseous exchange due to small pores size distribution in the structure that controls the transport of water, gases and ion exchange. The function of the pores is to provide the calcium used in the formation of the skeleton of the embryo, which is composed mainly of calcium carbonate and some biological macromolecules involved in the control of the nucleation, sites and growth of calcium carbonate crystals [89–91]. Depending on the species, the eggshells have different sizes, thickness, strengthen and even these mineralized shells usually show a very characteristic color. The coloration occurs in the final phase of the biomineralization and is produced by organic compounds called porphyrins such as proto-

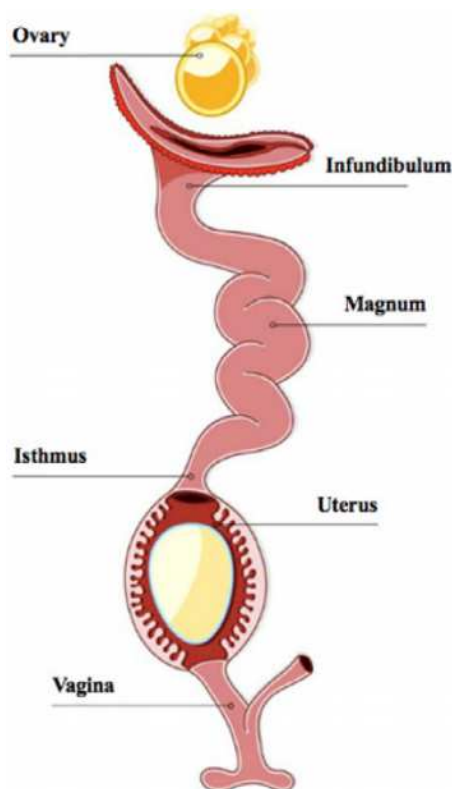


Fig. 15. Reproductive system of the hen. Reprinted from reference [98]. Copyright 2019 permission from Frontiers in Bioscience.

porphyrin, biliverdin and an organometallic compound such as the zinc biliverdin [92,93].

The eggshell of hen (*Gallus gallus*) is one of the better-known natural structures in which the biomineralization process is studied [94]. It is composed of calcium carbonate (95%) in the form of calcite, of an organic matrix (3.5%) and of water (1.5%) [95,96]. Biologically speaking, the egg is segregated and oviposited at intervals of approximately 24 hours. In the majority of reptiles, the pattern formation is different, it depends in the species and geolocation. At first, certain amount of eggs is formed. Along the oviduct the shell is synthesized in a single compartment of the oviduct. Then the last step is followed by the simultaneous ejection of the entire lien [97].

The eggshell formation follows different steps: At the beginning, the yolk is traveling through the oviduct, in this organ all the specific components are secreted for egg's formation (Fig. 15). The oviduct is divided into five regions: the infundibulum, which receives the ovule and where the vitelline membrane is deposited; the magnum (where albumin is secreted); the isthmus (it secretes the precursors of the membrane of the eggshells); the red isthmus (in this part the organic matrix is formed). In this latter, the formation of the organic matrix occurs when the organic components are deposited on the membrane of the outer shell [97–99], and finally, the uterus that adds calcium to the shell, forms the cuticle and increases the weight of the shell [96,97,100].

2.1. Stages of the biomineralization and composition of the eggshell

The avian eggshell is a highly complex structure, which contains five main components: cuticle, mineral palisade, internal mamillary buttons and membranes as shown in Fig. 16 [97]. The cuticle is the external layer of the shell composed mainly of organic matter and it is responsible for the coloring of the egg. It provides protection against microbial contamination in the first hours after oviposition [101]. The mineral palisade is composed mainly of biominerals (calcium

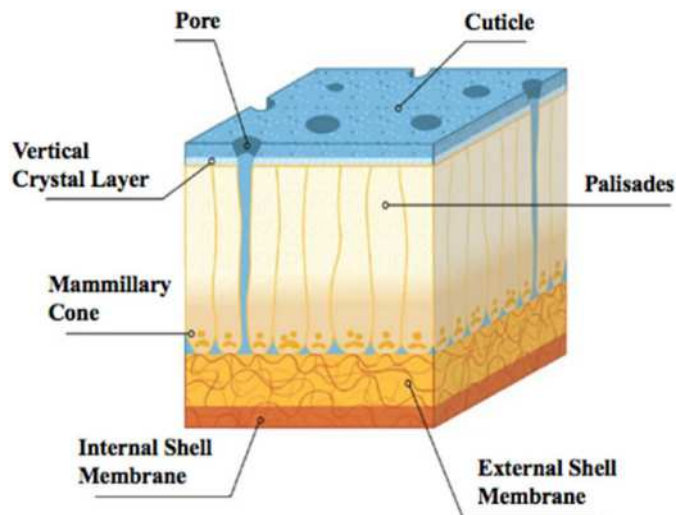


Fig. 16. Parts of hen eggshell. Reprinted from ref [98]. Copyright 2019 permit from Frontiers in Bioscience.

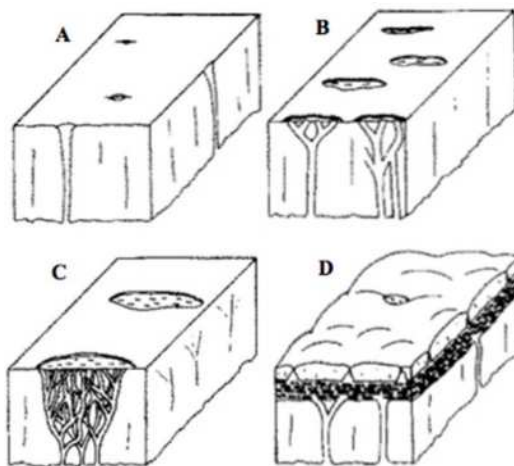


Fig. 17. Pore formation of different avian eggshells. (A): Form pore in most eggshells of birds; (B): pores of rhea eggshells; (C): pores of ostrich eggshell; D: pores of emu eggshell. Reprinted from ref [121]. Copyright 1984 Elsevier.

carbonate), a low proportion of organic matter (2–3%), and pores that allow the exchange of gases inside and outside the shell [102–104].

One of the most characteristic pores from a variety of pores found in eggshells of birds (Fig. 17) is the simple and unbranched funnel shape hole (Fig. 17A). The pores corresponding to rhea and ostrich, are more branched and wider on the surface of the shell (Fig. 17B and 17C, respectively), and in the case of emu, it has a simple branched and reticulate pore system (Fig. 17D). In this way, a structure of the crystals establishes a gradual growth with a preferred orientation. The crystals oriented perpendicularly to the substrate, keep growing in the outermost part of the layer. However, this tendency only happens if the growth of the crystals is anisotropic (greater in one direction) due to the inhibitions in the growth of certain surfaces, due to the interaction with the organic matrix [105,106].

The mamillary nuclei correspond to a layer deposited on the surface of the membrane. It is in this phase, where the formation of the nucleation sites takes place and where the calcium carbonate crystals grows; therefore, the initiation sites of the mineralization occurs and the formation of spherules around of the nuclei take place [107–109]. The membranes are composed mainly of proteins in a 95%, of lipids in a 3% and of hydrocarbons in a 2%. We know that it is a network of fine fibers what constitutes a membrane that connects the internal part of

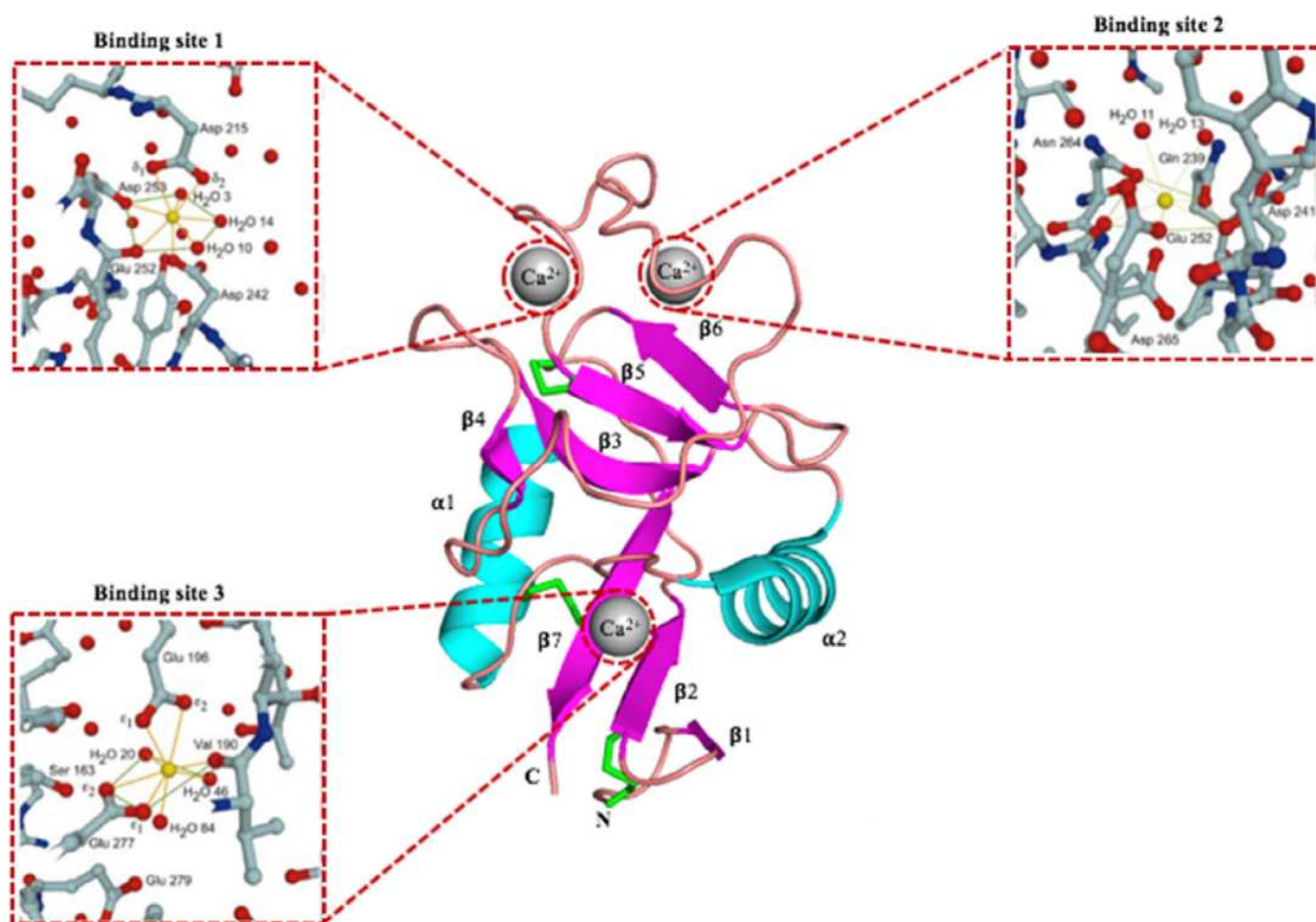


Fig. 18. Ribbon diagram of asialoglycoprotein receptor isolated from human (PDB: 1DV8) showing the calcium binding sites and their interaction with amino acids. Calcium ions are shown in gray and the dotted lines indicate the expansion of the interactions of the ions with the amino acids. Reprinted from ref [143]. Copyright 2000 Elsevier

the shell with the mineralized phase and an outer membrane. These membrane layers form a three-dimensional network of entangled fibers, parallel to the surface of the shell and play a secondary role in the mineralized layer [110–112].

During the mineralization of calcium carbonate to form the eggshell, the process used to take three stages: the first is called initiation, this starts in the testaceas membrane, which contains the mammillary nuclei composed of polysaccharides like glycosaminoglycans and keratan sulfate. These biological macromolecules give strength and hardness to the material formed by biomineralization; stabilizing the mineral surface and protecting it from dissolution; as well as maintaining the orientation of the formed crystal [113]. For the biomineralization process to be carried out, nucleation sites, supersaturation conditions and agents that propitiate the nucleation are needed [114]. The nucleation sites are composed mainly of an acidic protein capable of binding calcium ions, like acidic sulphated polysaccharides, sulphated proteins or carboxyl groups that requires the cooperativity of at least 2 or 3 ligands [115,116], where the concentration of calcium ions obtained from the bloodstream and carbonate ions are enough for crystal nucleation to take place in the mamillary buttons [70,117]. The second stage is related to linear growth, this starts with the crystal growth of calcite (rhombohedral) on the surface of a membrane with a well-defined crystalline face. This part called mineral palisade leads to the formation of pores size distribution that allow the egg to exchange gases mostly oxygen for breathing (Fig. 17) [118]. The last stage corresponds to finalization of the biomineralization process, it takes place in the cuticle, where the secreted uterine fluid (rich in calcium phosphate)

inhibits the calcium carbonate precipitation and biomineralization [119,120].

The most important component of the organic matrix for the eggshell's protection is the uterine fluid. This contains proteins with different important functions, such as the formation of proteoglycans, chaperone proteins, proteases/antiproteases, antibacterial agents [79,122] mineralization processes, nucleation, orientations and morphology of the biomineral [121–124]. It is composed of protein in a 70% and of proteoglycans and polysaccharides in a 11% [125]. All these proteins can be classified into three groups: ubiquitous proteins (type X collagen [126], osteopontin [127], and clusterin [128], are found in various tissues), egg white proteins (like albumin [129], ovotransferrin [130], and lysozyme [131]) and the third group contains all the shell-specific proteins, which are involved in the biomineralization process as we mention below [132].

2.2. Intramineral proteins and calcium binding sites

In the eggshell's formation there is a group called intramineral proteins or specific proteins. The secretion of these proteins is performed along a limited part of the oviduct (red isthmus) and in the uterus during the calcification of the egg forming a perfectly defined eggshell. From this group we can list: The ovocleidins (OC–17, OC–116) [89,133] and the ovocalixins (OCX–21, OCX–25, OCX–32 and OCX–36) [134,135]. Particularly, the ovocleidins are the main proteins of the eggshell matrix, they are present in the mineral palisade and abound in the uterus fluid during the calcification phase [90,132]. The

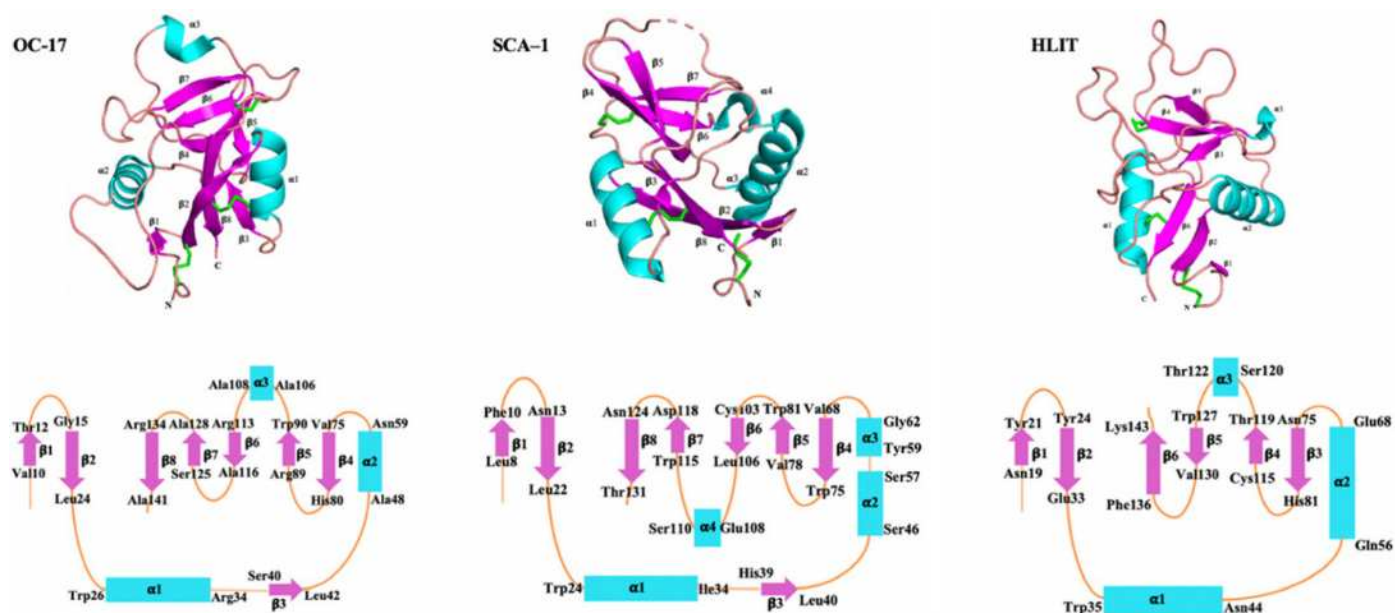


Fig. 19. UP: Ribbon representations of OC-17, SCA-1 and HLIT (human lithostathine) (PDB: 1GZZ, 4UWW, 1LIT). α -helices are shown in blue, β -strands in purple and the three disulfide bridges are in green. DOWN: a cartoon representation of the topology of the OC-17, SCA-1 and HLIT. The arrows indicate the direction of chain and the β -strands; the rectangles indicate the α -helices. Modified reference [139]. Copyright 1996 EMBOPres. Reprinted from reference [143]. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

ANCA	100							
SCA-1	62	100						
RCA-1	68	74	100					
DCA-1	65	70	77	100				
OC-17	34	36	38	39	100			
DCA-2	43	41	41	44	43	100		
SCA-2	43	40	42	44	44	83	100	
RCA-2	43	42	42	45	46	78	84	100

Fig. 20. ANCA: Anseocalcin; SCA: Struthiocalcin; RCA: Rheocalcin; DCA: Dromaiocalcin; OC: Ovocalcin. Obtained from Clustal-Omega software.

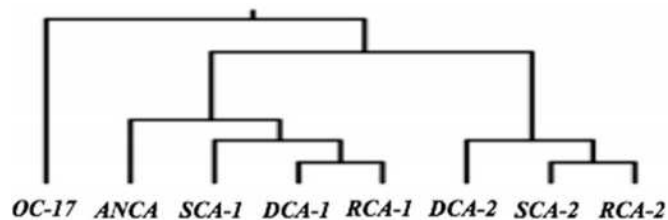


Fig. 21. Neighbor-joining phylogenetic tree, which distributes to proteins according to their distance based on the percentage of identity Obtained from Clustal-Omega software.

ovocalixins, present also in the eggshell, are known to be serine-protease inhibitors. One of the first intramineral proteins of the hen eggshell isolated and structurally characterized by X-ray diffraction was the ovocalcin-17 (OC-17) [89,136,137], with a molecular weight of 17 kDa and 142 amino acids. It is found in the tubular cell of the uterus and the expression occurs in the uterine fluid during the growth phase of the calcification of the eggshell [79,138].

Later on, human lithostathine (HLIT) was also isolated and biochemically characterized. This protein was found responsible for the inhibition of the formation of pancreatic stones [139]. The pancreatic,

renal or biliary stones are calculi that contain mainly calcium, phosphate, uric acid, magnesium or even mixtures with biomolecules formed by the precipitation of these minerals that are found in high concentrations through pathogenic biomineralization [75,140,141]. Another human protein related to calcium binding is the anialoglycoprotein receptor, this protein is responsible for the transport of molecules from the outer to inner parts of liver cells [142,143]. Structurally speaking this protein presents three calcium binding sites (Fig. 18) which are mainly linked to negatively charged amino acids such as glutamic and aspartic acids by coordination bonding. The calcium shows an octahedral geometry in coordination with water molecules. In the first binding site calcium is connected to three aspartic acids (Asp 215, Asp242 and Asp253), one glutamic acid (Glu252), and two water molecules. The second binding site has similar coordination to the site 1, which is a coordinate with glutamic acid (Glu252), glutamine (Gln239), asparagine (Asn264), aspartic acid (Asp265), two water molecules, aspartic acid and tryptophan molecules that act as highly conserved contributor to the hydrophilic and hydrophobic core, whereas site 3 interacts with valine (Val190), glutamic acid (Glu196, Glu277), three water molecules, and a serine (Ser163) that helps to stabilize the region [144].

This superfamily shares conserved regions of amino acids with their similar members, all these proteins have 110 to 140 highly conserved residues. They consistently present three disulfide bridges and some globular domains. These domains consist of two to three α -helices, six to eight β -strands and a prominent loop that form the core of the protein, as seen in Fig. 18, though their function is always to link the calcium [145,146]. From the crystallographic point of view all members have an intramolecular disulfide bond at N-terminal, but with different location of the other structure factors. Particularly, the OC-17 presents a relationship of 2-1-1-1-2-1-3 with eight β -sheets and three α -helices. The SCA-1 has a relation of 2-1-1-2-3-1-2, with one more α -helix than OC-17, while the HLIT has six β -sheets (two less than the previous one) and three α -helices like OC-17, with a relation of 2-2-2-1-2. Fig. 19 shows the comparison of OC-17 with other similar intramineral proteins like SCA-1(struthiocalcin-1) and HLIT (Human Lithostathine).

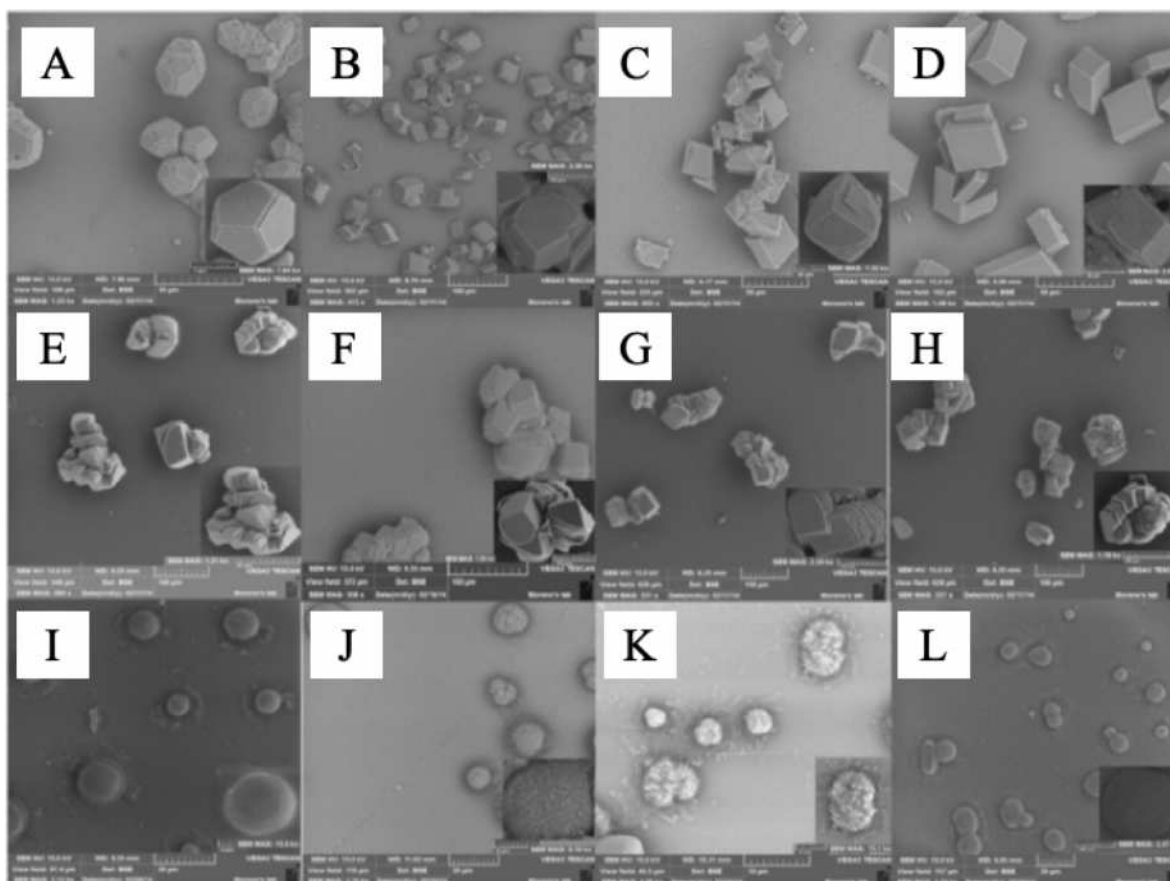


Fig. 22. Morphological changes in calcite crystals in presence of different proteins. At 50 µg/mL, (A): SCA-1, (B): SCA-2, (C): DCA-1, D: DCA-2. At 75 µg/mL, (E): SCA-1, (F): SCA-2, G: DCA-1, (H): DCA-2. At 100 µg/mL, I: SCA-1, J: SCA-2, K: DCA-1, L: DCA-2. Reprinted from ref [79]. Copyright 2014 ACS Publications.

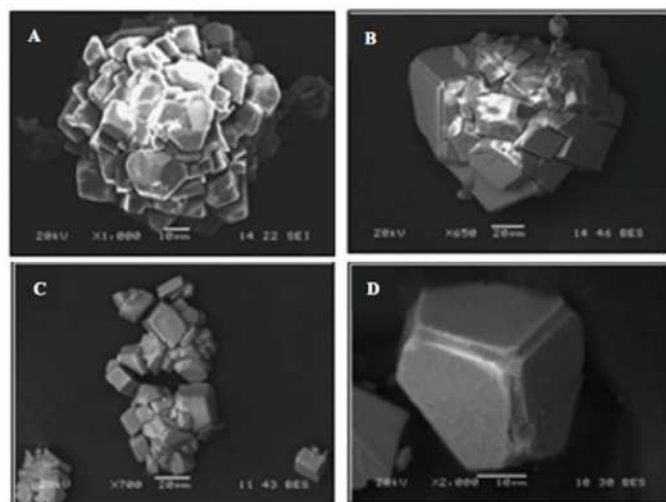


Fig. 23. Morphological changes in calcite crystals in presence of OC-17. (A): 200 µg/mL; (B): 100 µg/mL; (C): 50 µg/mL; (D): 5 µg/mL. Reprinted from ref [137]. Copyright 2004 American Society of Biochemistry and Molecular Biology.

2.3. Phylogenetic relationship between homologous proteins

The ratite birds like Ostrich (*Struthio camelus*), the greater rhea (*rhea Americana*) and emu (*Dromaios novahollandiae*) belong to the Palaeognathae superorder. On the other hand, the hen (*Gallus gallus*), the goose (*Anser anser*) correspond to the order Neonagthae. The

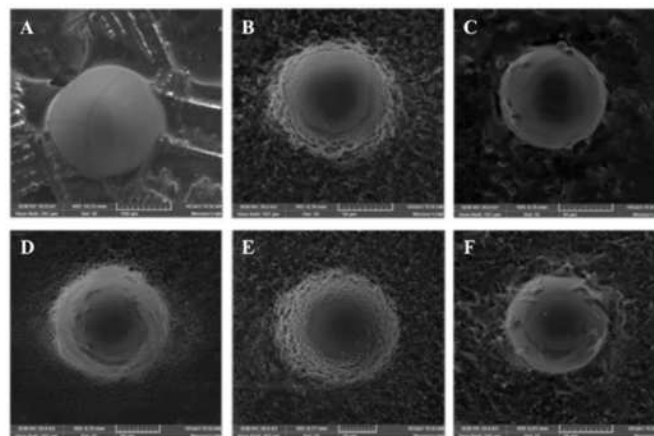


Fig. 24. Morphological changes in calcite crystals in presence of CCA-1 (A-C) and CCA-2 (D-F). A, D: 100 µg/mL; B, E: 250 µg/mL; C, F: 500 µg/mL. Reprinted from ref [147]. Copyright 2018 American Chemical Society.

sequence presented in the identity are 34%-46%. Percentage identity between homologous proteins is shown in Fig. 20.

The most characteristic feature of the Palaeognate superorder is that the eggshell usually contains 2 proteins called CTLD, which is the acronym of Lectin-like type domain. Nowadays, we could easily classify these proteins into two groups: The first group includes the protein isolated type 1 with ANCA, which presents a high degree of identity. The second group called type 2 includes OC-17, which has an identity of 43-46%. While the protein of the group 2 have an identity of 78-84%. The identity obtained by using phylogenetic tree (see Fig. 21) can be

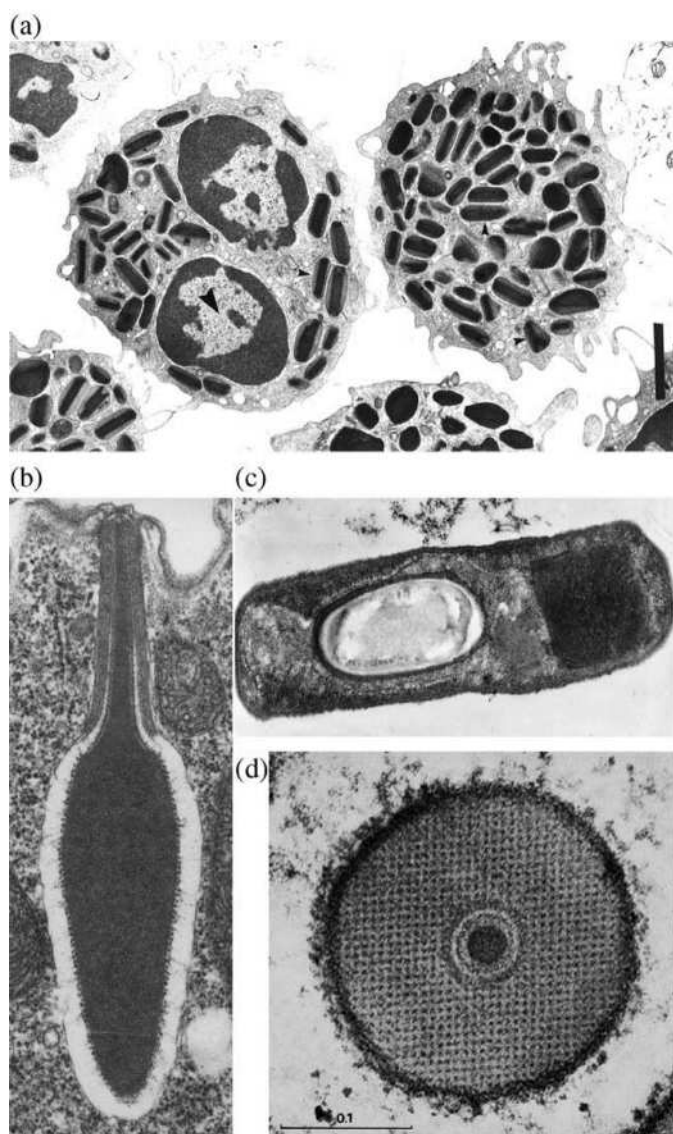


Fig. 25. (a) Eosinophils showing granules containing dark rectangular crystals of EMBP. (b) A trichocyst attached to the outer membrane of Paramecium. (c) A protein toxin crystal within *Bacillus thuringiensis*. (d) An encapsulated virus rod of the granulosis virus of *Plodia interpunctella*. Scale bars correspond to (a) 1 μm and (d) 0.1 μm . Reproduced with permission from reference [159]. *Curr. Opin. in Colloid & Interface Science* 11(2006) 40–46.

genetically demonstrated with distances based on a multiple sequence alignment which shows the same type of grouping. In the case of proteins belonging to the Palaeognathae superorder, demonstrating that proteins are homologous in different species. In relation to the interaction we can assume that negatively charges of the waste of acidic amino acids and the positively charges of the basic residues in proteins, interact with calcium carbonate ions, respectively.

A very characteristic of the Palaeognathae superorder is that the eggshells used to have two proteins of this type, whereas the rest of the birds have only one. From all the above, we can infer that the ancestral species of the birds of the superorder Neognathae lost one of the proteins with a CTLD, however, the ANCA proteins have greater identify with the group 1 of the Paleognathae proteins, while the OC-17 has a greater identify with group 2, which leads two events of loss of proteins with a CTLD and to think that they perform similar functions within the formation of the shell.

It has been recently found that reptiles such as crocodile, species taxonomically related with birds, have homologous proteins with CTLD

similar to those reported in the ratite's birds. Crococalcin (CCA-1 and CCA-2) were isolated from the crocodile shell (*Crocodylus moreletti*) [147], which are morphologically distinct from birds' shells.

To know the identity of the proteins that have CTLD in the eggshell of birds a multiple aligned sequences (MAS) was performed as shown in the Fig. 1S (Supplementary material). According to the sequences, ANCA presents a repeated sequence of charged amino acids EEDD, KKR and DDDE that are not preserved in OC-17. These sequences are also found in proteins present in the shell of the Palaeognathae superorder. Particularly, in the case of SCA-1 has amino acids EEEEE, KKH and DDDD, and SCA-2 has EEE, EEEAGEE and RRR. The RCA-1 has DDD, and RCA-2 has EEE, EEE, RRH and RRR. The DCA-1 has EEEE and DDDE, and DCA-2 has EEE, EEE and RRR. These amino acids sequences may indicate that they could be associated with an electrostatic interaction with calcium carbonate.

In addition, Mann [148] indicates that these proteins have post-translational modifications such as phosphorylation of serines, exclusively in group 2. For this reason, the OC-17 presents an identity with the proteins of group 2, since it presents two serine amino acids, where the phosphorylation takes place as the Ser⁶¹ and Ser⁶⁸. In the case of SCA-2, RCA-2 and DCA-2, presents three phosphorylation sites Ser⁶¹, Ser⁶⁵ and Ser⁶⁸. The mechanism of phosphorylation for specific residues play an important role in biomineralization together with interacting with calcium ions [149], even by inhibiting the deposition calcium carbonate [150,151].

2.4. Morphology and habit of calcite crystals in the presence of proteins

The influence of intramineral proteins on the growth of calcite crystals has been reported: such as those fractions of proteins with different isoelectric point [152], the uterine fluid of the hen [120,153], lysozyme [154] and recently of intramineral proteins like OC-17 [137], SCA and DCA [122,155].

Calcite crystals have a rhombohedral morphology as seen in Fig. 13, however, in the presence of SCA and DCA, it is observed that the morphology of the crystals is dependent on the concentration of the protein, varying from a dodecahedron-like with rounded vertices to spherical or ellipsoidal polycrystalline aggregates. From Fig. 22 (A-L), it can be identified that the SCA-1 protein has the greatest effect on the morphology of the crystals, causing them to grow with a dodecahedron-like (Fig. 22A) morphology up to spheres (Fig. 22I). Subsequently, the proteins SCA-2, DCA-1 and DCA-2 have a lower influence forming polycrystalline aggregates in the form of polycrystalline ingrowth (Fig. 22F, G and H), as well as OC-17 (Fig. 23). At higher concentrations, the main morphology of the crystals is completely lost, growing spherical aggregates with an indistinguishable surface.

The adsorption of proteins on different faces of the crystal used to affect the crystalline habit as shown in Fig. 23. The formation of spherical aggregates indicates that this adsorption is not specific since it deposits on the surface of the crystal block the growth of calcite for all the faces. The influence of the protein OC-17 has the same behavior as the previous proteins, but without significant changes with the increase of the protein concentration (Fig. 23) In this way, we can infer that calcite interacts more with the proteins from the Palaeognathae superorder than that obtained from the Neognathae superorder.

The difference between the tests carried out with proteins isolated from bird's shells and the tests carried out with crocodile eggshells is that, the latter, show a greater alteration in the growth of calcite crystals at low concentrations (Fig. 24A to D), observing a spherical morphology, which is observed in the other tests at higher concentrations. Currently there is not any structural explanation that can explain this experimental result. However, the semispherical shape is evolutionary selected because such containers of the new life are most stable mechanically - eggs that may have other shapes are easily broken, which results in missing offspring. Therefore, such species are extinct.

So far, we have understood that Nature is always using the same

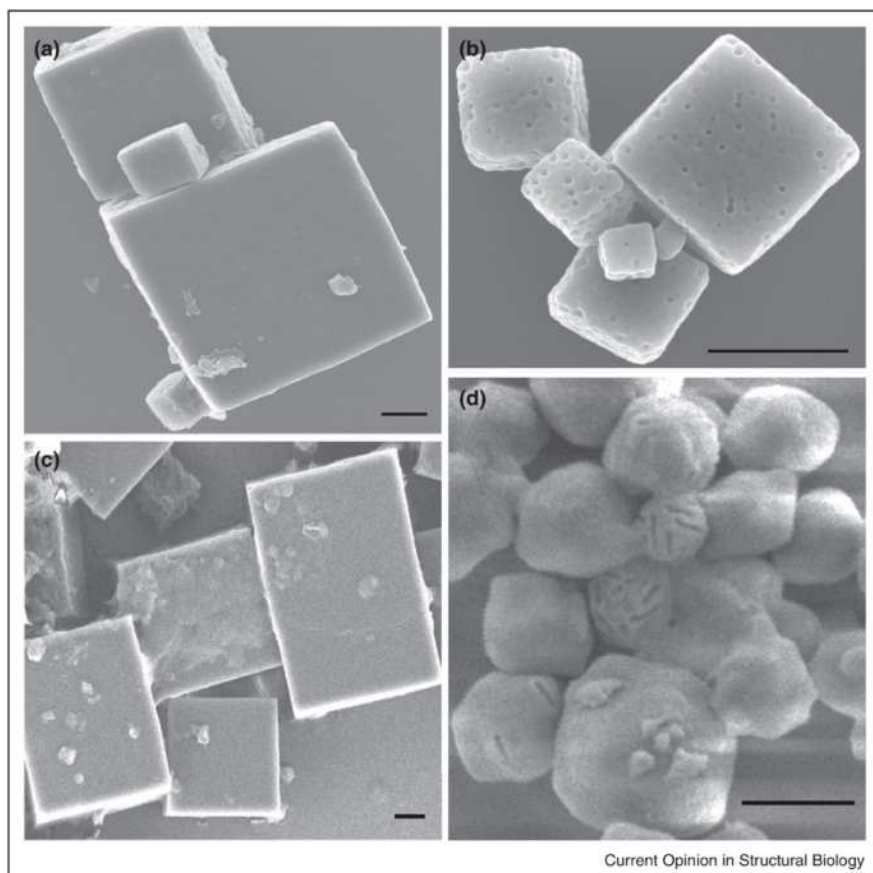


Fig. 26. Examples of cypovirus and baculovirus polyhedra. Scanning electron micrographs of (a) recombinant BmCPV-H29S polyhedra, (b) wild-type BmCPV polyhedra, (c) recombinant AcMNPV-G25D polyhedra, and (d) wild-type AcMNPV polyhedra. The cavities visible on the surface of wild type polyhedra are presumed to have been previously occupied by virus particles. The scale bars represent 1 μm . With copyright permit of Ref. [170] Elaine Chiu, Coulibaly Fasséli, Peter Metcalf, Current Opinion in Structural Biology 22 (2012), 234–240.

mechanisms of crystal growth either to form complex forms like biomorphs or eggshell's formation in birds. We have accumulated sufficient knowledge to get advantages and use the molecular biology techniques and overexpression of proteins to grow crystals of biological macromolecules *In vivo*. This new way of producing protein crystals is a modern topic in serial crystallography, when using the synchrotron facilities. Nowadays, small crystals in the size scale of microns and nanometers or highly pure solutions of proteins are used to get the 3D structure in the synchrotrons of the fourth generation. This last part of the contribution will show how a new generation of crystallographers need to be trained not only in the physics of crystal growth and X-ray diffraction, but also in molecular biology techniques. This is important to understand that in our current days, crystallography has met the nanotechnology and big data analyses (using the modern X-ray facilities), these are challenging issues to be faced in the near future.

3. Crystallization *in vivo* for x-ray crystallography

The understanding of most of the biomineralization processes as well as the mechanisms of crystallization and crystal growth has a lot of applications in materials science and in life sciences [155,156]. Recently, most of the novel contributions have been concentrated on using biomineralization concepts to synthesize new bioinspired functional hybrid materials. During this synthesis there is a control on specific size, on the obtainment of complex morphologies, as well as on the composition and structure, even in these materials the self-assembly processes driving the biomorphs growth allow to obtain and to design hierarchically ordered materials with specific optical, chemical and physical properties [18,157]. These designed structures usually proceed through the synthetic route using functions of some molecules [158]. However, few efforts have been done in developing strategies to synthesize and to grow crystals of proteins using the biological machineries

of living organisms evolved during millions of years as shown in Fig. 25 [159].

The existence of high technologies developed for the characterization of small protein crystals (via X-ray free-electron lasers, XFEL) has allowed to obtain a modern megahertz serial crystallography. This has changed the concept of availability of big crystals to know the high-resolution structures of proteins, DNA, RNA or their macromolecular complexes. Nowadays, X-FEL techniques allow to obtain structures of bio-macromolecular complexes in the scale of nanocrystals and using X-ray pulses with a megahertz inter-pulse spacing [160,161].

The advantages of obtaining protein crystals (in the size ranging from nanometers to micrometers) directly in specialized micro-organism cells has been poorly explored. The first formal approach of characterizing proteinaceous crystals obtained in *Bacillus cereus* was published by Toumanoff in 1953 investigating the bacterial toxin that paralyze the silkworm larvae [162]. The use of *Bacillus thuringiensis* to produce toxin crystals was done by Angus in 1954 [163]. Later on, investigations on the metabolism of *Bacillus thuringiensis* contributed to the understanding the relationship between spore and crystal formation *in vivo* [164]. The role of pathological crystals for applications in materials science in terms of anomalous crystallization in a human body leads to the application of this knowledge for several diseases [165]. The synthesis of a variety of crystals mediated by proteins in different biological organisms has been recently reviewed applied to inorganics and organics [166].

On the other hand, the *in vivo* protein crystallization is a promising strategy to obtain biological macromolecules crystals grown in specialized cells. There are photo-convertible fluorescent proteins found in corals from *Favia fava* that have been studied demonstrating the usefulness of the engineered high-lighter. This concept has been applied to biological samples validating the structure via site-directed mutagenesis to obtain fluorescent protein as an optical tool [167]. The

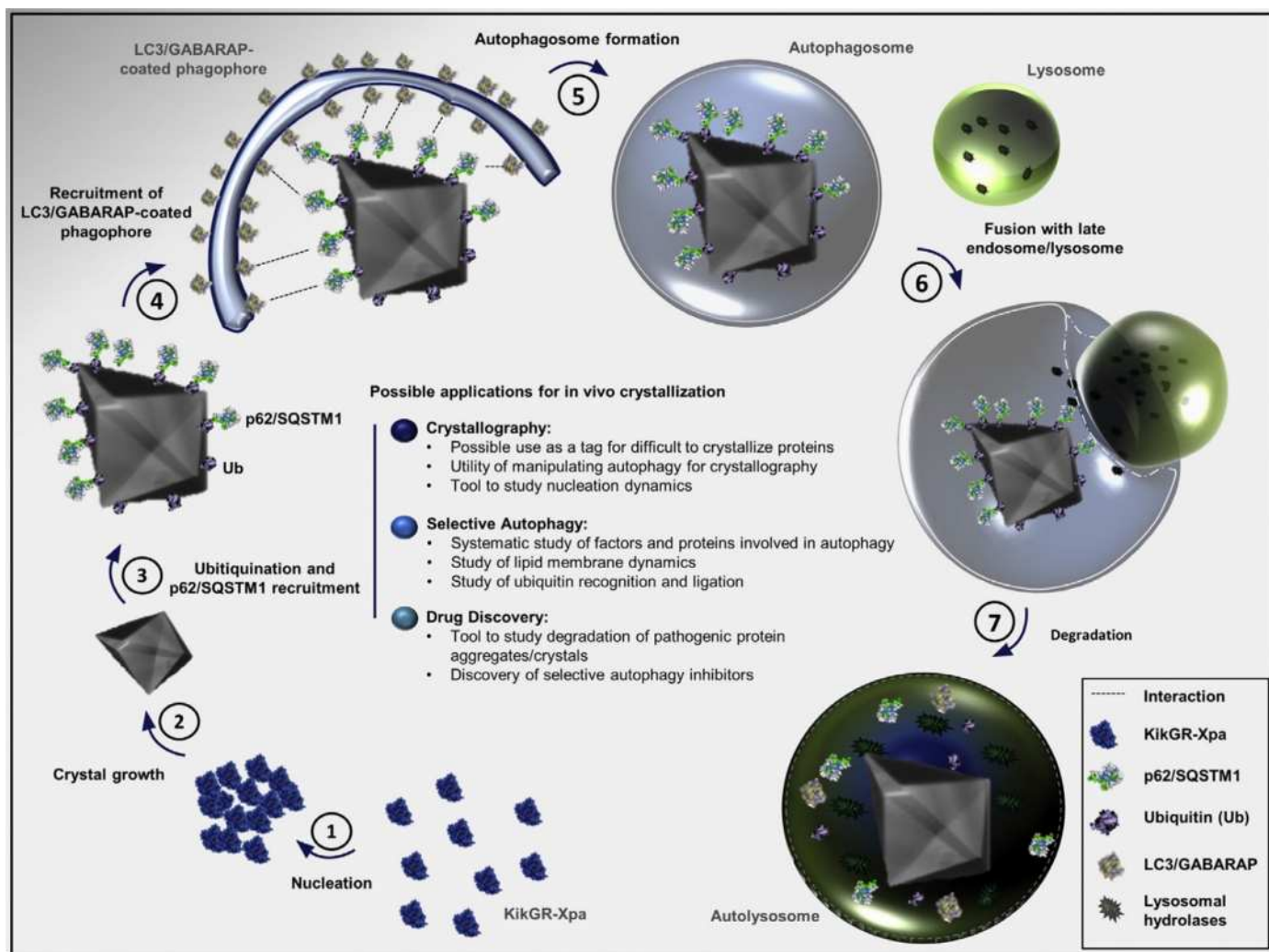


Fig. 27. *In vivo* crystallization of KikGR-Xpa and the Autophagic Response of the Cell Upon transient expression of KikGR-Xpa, a crystal is formed in the cytosol of the transfected cell (Steps 1,2) (note: nuclear crystals also form but are not shown for simplicity). With copyright permit from [174] Hanisov and Kirkin Molecular Cell 2015:58:5–7.

microfluidic technologies were based on the growth of inorganic and organic crystals in living organisms emulating the idioblasts, which are usually a highly specialized cells that have several functions such as storage of chemicals, excretory materials or deposit of biominerals concentrated by supersaturation processes. These microfluidic technologies allow to grow crystals based on free-interface diffusion mechanisms [168].

The crystallization of human IgG via the endoplasmic reticulum in ovary cells has shown the potential of the protein crystallization *in vivo* [169]. By using this method in insects, a viral polyhedra intracellular protein crystals were produced and solved by X-ray diffraction at atomic resolution (Fig. 26). These were the smallest protein *in vivo* crystals used for the novo structure determination [170].

Novel strategies to obtain crystals using the *in vivo* crystallization have opened the opportunities for structural analysis in a variety of biological systems [171,172]. Recent publications have applied in situ data analysis using dynamic light scattering and data collection using XFEL to microcrystals of firefly luciferase and green fluorescent protein-tagged reovirus micro-NS. In this contribution the authors applied live-cell imaging techniques to investigate the dynamic crystallization mechanisms in cells [173]. The crystallization of protein called (kikGR-Xpa) as well as the autophaging cell's response showed the plausible applications of the *in vivo* protein crystallization (Fig. 27). This investigation demonstrated that these strategies are feasible for proteins,

which are difficult to crystallize. It is a practical tool to study nucleation dynamics [174]. The same concept was applied to coral fluorescent protein, grown *in vivo* encapsulated by the autophagosomal membranes, lysosomal lumen, and inside the cellular nucleus [175] Figure 28.

The free-electron laser used to collect full datasets; it was applied to alcohol oxidase microcrystals. These crystals were initially grown in the native cellular organelle. This procedure of growing crystals did show the potential of the crystallization *in vivo* [176]. The crystals of the *Bombyx mori* polyhedron as a model system diffracted up to 1.5Å; the strategy took approximately eight days from the overexpression to the obtainment of the X-ray crystallographic structure [177].

The *in vivo* crystallization using *Bacillus thuringiensis* has been recently reviewed, and it has been applied to Three Domain Cry Toxins, which make these proteins a perfect model for the *in vivo* crystallization research and production of biopesticides [178].

The specific obstruction of certain steps along the *in vivo* crystallization by using a specific drug based on biochemical and physiological strategies was done against the insect *Rhodnius prolixus*. This strategy dysregulated the heme-redox homeostasis and disrupted the vector/parasite ultimately with a positive effect on Chagas disease [179]. This methodology establishes intracellular protein crystallization for the construction of a novel platform for recombinant proteins [180].

A general overview on protein crystallogenesis describing what is

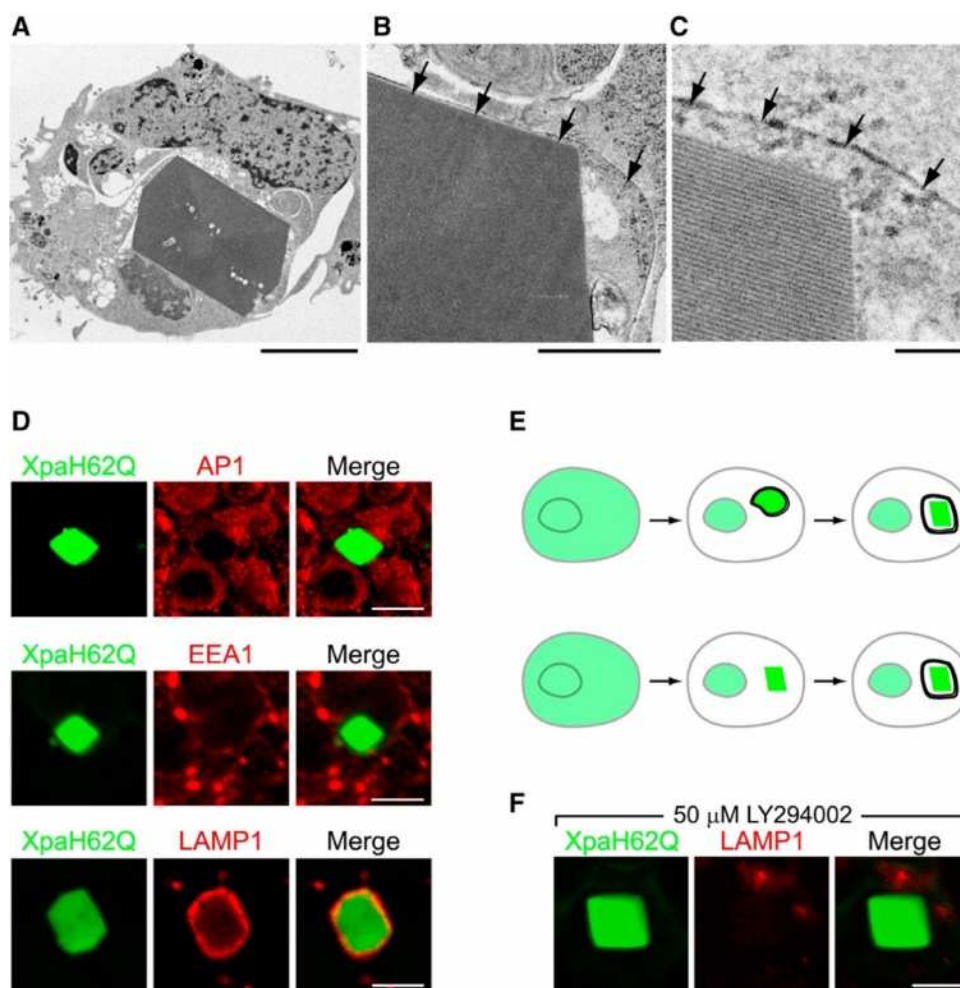


Fig. 28. Autophagic Responses to a Protein Crystal Grown within the Cell

(A–C) TEM micrographs of an HEK293 cell bearing a Xpa crystal. The membrane structure that surrounds the crystal is indicated by arrowheads. Scale bars = 5 μm (A), 200 nm (B), 100 nm (C). Pitch of the observed lattice pattern was 7–8 nm. We did not identify the origin of the observed lattice but viewing from the *b*-axis is anticipated to provide an aligned stripe pattern. (D) Cells bearing XpaH62Q crystals were subjected to immunocytochemical analysis using anti-AP1, anti-EEA1, and anti-LAMP-1 antibodies. (E) Two models of the formation of a Xpa(H62Q) crystal. Top: non-selective autophagy. Bottom: selective autophagy. Lysosomal membranes are indicated by thick black lines. (F) LAMP-1 immunocytochemistry of an XpaH62Q crystal grown in the presence of 50 mM LY294002, a PI3-kinase inhibitor. Scale bars (D and F) = 10 μm. The images (D and F) each are representative of more than four different cells. Fig. 2 with copyright permit from [175] Molecular Cell 58 (2015) 186–193.

needed in the future for a precise crystallographic work has been published elsewhere [181]. In that contribution there is a historical journey from the crystallogenes from the physiology time as well as from the classic development of chemistry, passing through the history of methods of protein crystallization up to modern techniques to solve three dimensional structures at very high-resolution using the modern SFX and XFEL techniques at the synchrotrons of four generation.

Concluding remarks

This manuscript summarizes valuable information concerning important aspect of bio-mimicking crystallization and biomineralization/biocrystallization. To elucidate the biological roots of the biomineralization, the role that silica and alkaline earth metals have played in the formation of life-like structures (so-called biomorphs) was considered firstly. The biochemical aspects of eggshells formation *in vivo* were elucidated in the second part of this contribution. The role of calcium carbonate in creation of avian eggshells was revised thoroughly. We concluded the third part with the advantage of knowing the biological mechanisms based on molecular biology concepts, to obtain protein crystals *in vivo* and *in cellulo* techniques. Both methods use the cellular machinery of growing biocrystals in specialized cells that have evolved through millions of years. This new way of producing protein crystals is a trending topic for modern crystallography when using the facilities of the X-ray free-electron lasers (four generation of synchrotrons) for megahertz serial crystallography. We hope that these three topics connected by crystal growth mechanisms will help the readers to understand the magnificence of the biomineralization processed in Nature.

Acknowledgments

One of the authors N.R. E-C thanks CONACYT (Registration no. 889262) for a scholarship for the Ph.D. program in Chemistry Sciences of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). A.M. & M. C-C acknowledge to DGAPA for the support of the project PAPIIT No. IG200218.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.pcrysgrow.2019.100473](https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2019.100473).

References

- [1] J.R. Blueford, J.J. Gonzales, K. van Scoy, Comparing radiolarian and diatom diversity and abundance from the northeast pacific, *Mar. Micropaleontol.* 15 (1990), [https://doi.org/10.1016/0377-8398\(90\)90012-B](https://doi.org/10.1016/0377-8398(90)90012-B) 219–132.
- [2] S. Kachovich, J. Sheng, J.C. Aitchison, Adding a new dimension to investigations of early radiolarian evolution, *Sci. Rep.* 9 (2019) 6450, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42771-0>.
- [3] A. Arakaki, K. Shimizu, M. Oda, T. Sakamoto, T. Nishimura, T. Kato, Biomineralization-inspired synthesis of functional organic/inorganic hybrid materials: organic molecular control of self-organization of hybrids, *Org. Biomol. Chem.* 13 (2015) 974–989, <https://doi.org/10.1039/C4OB01796J>.
- [4] J. Rouillard, J.M. García-Ruiz, J. Gong, M.A. van Zuilen, A morphogram for silica-witherite biomorphs and its application to microfossil identification in the early earth rock record, *Geobiology* 16 (2018) 279–296, <https://doi.org/10.1111/gbi.12278>.
- [5] J.M. García-Ruiz, J.L. Amorós, *Crecimiento de cristales en geles, II. Nueva variante*, *Boletín Real Sociedad Española de Historia Natural, Sección Geológica* 77 (1979) 101–119.
- [6] J.M. García-Ruiz, J.L. Amorós, Morphological aspects of some symmetrical crystal

- aggregates grown by silica gel technique, *J. Cryst. Growth* 55 (1981) 379–383, [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(81\)90038-5](https://doi.org/10.1016/0022-0248(81)90038-5).
- [7] R. Lillie S., E. Johnston N., *Precipitation-structures simulating organic growth II*, *Biological Bulletin* 36 (4) (1909) 225–273.
- [8] Mary A. et A., Observations sur la morphogénèse en Plasmologie, *Memoires Soc. Sci. "Antonio Alzate"* 29 (1909-1910) (n.d.) 242–250.
- [9] A. Herrera L., A New Theory of the Origin and Nature of Life, *Science* 96 (2479) (1942) 14, <https://doi.org/10.1126/science.96.2479.14>.
- [10] A. Lazcano, S.L. Miller, The origin and early evolution of life: Prebiotic chemistry, the pre-RNA world, and time, *Cell* 85 (1996) 793–798, [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81263-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81263-5).
- [11] J.M. García-Ruiz, S.T. Hyde, A.M. Carnerup, A.G. Christy, M.J. van Kranendonk, N.J. Welham, Self-assembled silica carbonate structures and detection of ancient microfossils, *Science* 302 (2003) 1194–1197, <https://doi.org/10.1126/science.1090163>.
- [12] J.M. García-Ruiz, E. Melero-García, S.T. Hyde, Morphogenesis of self-assembled nanocrystalline materials of barium carbonate and silica, *Science* 362 (2009) 362–365, <https://doi.org/10.1126/science.1165349>.
- [13] J.M. García-Ruiz, Carbonate precipitation into alkaline silica-rich environments, *Geology* 26 (1998) 843–846, [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1998\)026<0843:CPIASR>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1998)026<0843:CPIASR>2.3.CO;2).
- [14] D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen, Stable prenucleation calcium carbonate clusters, *Science* 322 (2008) 1819–1822, <https://doi.org/10.1126/science.1164271>.
- [15] D. Gebauer, H. Cölfen, A. Verch, M. Antonietti, The multiple roles of additives in CaCO₃ crystallization: a quantitative case study, *Adv. Mater.* 21 (2009) 435–439, <https://doi.org/10.1002/adma.200801614>.
- [16] J. Eiblmeier, U. Schürmann, L. Kienle, D. Gebauer, W. Kunz, M. Kellermeier, New insights into the early stages of silica-controlled barium carbonate crystallisation, *Nanoscale* 6 (2014) 14939–14949, <https://doi.org/10.1039/c4nr05436a>.
- [17] G. Zhang, J. Morales, J.M. García-Ruiz, Growth behavior of silica/carbonate nanocrystalline composites of calcite and aragonite, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 1658–1663, <https://doi.org/10.1039/C6TB02612E>.
- [18] J. Opel, F.P. Wimmer, M. Kellermeier, H. Cölfen, Functionalisation of silica-carbonate biomorphs, *Nanoscale Horiz.* 1 (2016) 144–149, <https://doi.org/10.1039/C5NH00094G>.
- [19] A.E. Voinescu, M. Kellermeier, A.M. Carnerup, Ann-Kristin Larsson, D. Touraud, T. Hyde, W. Kunz, Co-precipitation of silica and alkaline-earth carbonates using TEOS as silica source, *J. Cryst. Growth* 306 (2007) 152–158, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2007.03.060>.
- [20] E. Nakouzi, O. Steinbock, Self-organization in precipitation reactions far from the equilibrium, *Sci. Adv.* 2 (2016) e1601144, <https://doi.org/10.1126/sciadv.1601144>.
- [21] J. Eiblmeier, M. Kellermeier, D. Rengstl, J.M. García-Ruiz, W. Kunz, Effect of bulk pH and supersaturation on the growth behavior of silica biomorphs in alkaline solutions, *CrystEngComm* 15 (2013) 43–53, <https://doi.org/10.1039/c2ce26132d>.
- [22] M. Montalti, G. Zhang, D. Genovese, J. Morales, M. Kellermeier, J.M. García-Ruiz, Local pH oscillations witness autocatalytic self-organization of biomorphic nanostructures, *Nat. Comm.* 8 (2016) 14427, <https://doi.org/10.1038/ncomms14427>.
- [23] J. Open, J. Brunner, R. Zimmermanns, T. Steegmans, E. Sturn, M. Kellermeier, H. Coelfen, J.M. García-Ruiz, Symbiosis of silica biomorphs and magnetite mesocrystals, *Adv. Funct. Mater.* 29 (2019) 1902047, <https://doi.org/10.1002/adfm.201902047>.
- [24] S.H. Yu, H. Cölfen, K. Tauer, M. Antonietti, Tectonic arrangement of BaCO₃ nanocrystals into helices induced by a racemic block copolymer, *Nat. Mater.* 4 (2005) 51–55, <https://doi.org/10.1038/nmat1268>.
- [25] T. Wang, A.W. Xu, H. Cölfen, Formation of self-organized dynamic structure patterns of barium carbonate crystals in polymer-controlled crystallization, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 4451–4455, <https://doi.org/10.1002/anie.200601038>.
- [26] U. Tritschler, I. Zlotnikov, P. Zaslansky, P. Fratzl, H. Schlaad, H. Cölfen, Hierarchically structured vanadium pentoxide-polymer hybrid material, *ACS Nano* 8 (2014) 5089–5104, <https://doi.org/10.1021/nn501153u>.
- [27] H.K. Henisch, *Crystal Growth in Gels*, Pennsylvania University Press, 1970 *Crystals in Gels and Liesegang Rings*. Cambridge University Press. Cambridge. 1988.
- [28] M. Kellermeier, H. Cölfen, J.M. García-Ruiz, Silica biomorphs: Complex biomimetic hybrid materials from “sand and chalk”, *Eur. J. Inorg. Chem.* 32 (2012) 5123–5144, <https://doi.org/10.1002/eqvic.201201029>.
- [29] J.M. García-Ruiz, E. Nakouzi, E. Kotopoulou, L. Tamborrino, O. Steinbock, Biomimetic mineral self-organization From silica-rich spring waters, *Sci. Adv.* 3 (2017) e1602285, <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602285>.
- [30] W.L. Noorduin, A. Grinthal, L. Mahadevan, J. Aizenberg, Rationally designed complex, hierarchical microarchitectures, *Science* 340 (2013) 832–837, <https://doi.org/10.1126/science.1234621>.
- [31] G. Zhang, C. Verdugo-Escamilla, D. Choquesillo-Lazarte, J.M. García-Ruiz, Thermal assisted self-organization of calcium carbonate, *Nat. Commun.* 9 (2018) 5221–5228, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07658-0>.
- [32] M. Cuéllar-Cruz, A. Moreno, The role of calcium and strontium as the most dominant elements during combinations of different alkaline Earth metals in the synthesis of crystalline silica-carbonate biomorphs, *Crystals* 9 (2019) 1–19, <https://doi.org/10.3390/cryst9080381>.
- [33] M. Kellermeier, F. Glaab, E. Melero-García, J.M. García-Ruiz, Experimental techniques for the growth and characterization of silica biomorphs and silica gardens, *Method. Enzymol.* 532 (2013) 225–256, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416617-2.00011-4>.
- [34] E. Bittarello, D. Aquilano, Self-assembled nanocrystals of barium carbonate in biomineral-like structures, *Eur. J. Min.* 19 (2007) 345–351, <https://doi.org/10.1127/0935-1221/2007/0019-1730>.
- [35] J.M. García-Ruiz, On the formation of induced morphology crystal aggregates, *J. Cryst. Growth* 73 (1985) 251–262, [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(85\)90301-X](https://doi.org/10.1016/0022-0248(85)90301-X).
- [36] M. Kellermeier, F. Glaab, A.M. Carnerup, M. Drechsler, B. Gossler, S.T. Hyde, W. Kunz, *J. Cryst. Growth* 311 (2009) 2530–2541, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2009.02.044>.
- [37] J.M. García-Ruiz, A. Carnerup, A.G. Christy, N.J. Welham, S.T. Hyde, Morphology: An ambiguous indicator of biogenicity, *Astrobiology* 2 (2002) 353–369, <https://doi.org/10.1089/153110702762027925> doi. org/.
- [38] I.M. Weiss, F. Marin, The role of enzymes in biomineralization processes, *Met. Ions. Life. Sci.* 4 (2008) 71–126.
- [39] C. Dupraz, P.T. Visscher, Interactions in the geo-biosphere: processes of carbonate precipitation in microbial mats american geophysical union, *Proceedings of the Fall Meeting, 2009 abstract #B21A-0313*. 2009.
- [40] A.E. Voinescu, M. Kellermeier, B. Bartel, A.M. Carnerup, A.K. Larsson, D. Touraud, W. Kunz, L. Kienle, A. Pfitzner, S.T. Hyde, Inorganic self-organized silica aragonite biomorphic composites, *Cryst. Growth. Des.* 8 (2008) 1515–1521, <https://doi.org/10.1021/cg700692t>.
- [41] G. Wang, X. Zhao, M. Möller, S.E. Moya, Interfacial reaction-driven formation of silica carbonate biomorphs with subcellular topographical features and their biological activity, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 7 (2015) 23412–23417, <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08493>.
- [42] C.N. Kaplan, W.L. Noorduin, L. Li, R. Sadza, L. Folkertsma, J. Aizenberg, L. Mahadeva, Controlled growth and form of precipitating microsculptures, *Science* 355 (2017) 1395–1399, <https://doi.org/10.1126/science.aah6350>.
- [43] J.J. Brocks, G.A. Logan, R. Buick, R.E. Summons, Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes, *Science* 285 (1999) 1033–1036, <https://doi.org/10.1126/science.285.5430.1033>.
- [44] E. Bittarello, F.R. Massaro, D. Aquilano, The epitaxial role of silica groups in promoting the formation of silica/carbonate biomorphs: a first hypothesis, *J. Cryst. Growth* 312 (2010) 402–412, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2009.11.004>.
- [45] E. Haeckel, Report on radiolaria collected by HMS *Challenger* during the years 1873–76, *Rep. Voyage HMS Challenger*. Zool. 1 (1887) 81–1803.
- [46] O. Steinbock, Complexity from precipitation reactions, *PNAS* 111 (2014) 17346–17347.
- [47] E. Haeckel, *Fernere abbildungen und Diagnosen Neurgattungen und Arten Von Lebenden Radiolarien des Mittelmeeres*, Kgl. Preuss. Akad. Wiss, Berlin, Monatsber., Jahre, 1860, pp. 835–845.
- [48] A. Hall, W.J. Kennedy, J.H. Taylor, Aragonite in fossils, *Proc. Roy. Soc. B* 168 (1967) 377–412, <https://doi.org/10.1098/rspb.1967.0071>.
- [49] C.G. Ehrenberg, 2 Neue Lager Von Gebirgsmassen aus Infusorien als Meeres-Absatz in Nord-Amerika und Eine Vergleichung Derselben MIT den Organischen Kreide-Gebilden in Europa und Afrika, Kgl. Preuss. Akad. Wiss. Berlin, 1984, pp. 57–97.
- [50] C.J. Hollis, Cretaceous-Paleocene radiolaria from Eastern Marlborough, New Zealand, *N. Z. Geol. Surv. Paleontol. Bull.* 73 (1997) 152.
- [51] P. Noll, O. Steinbock, Inorganic reactions self-organize life like microstructures far from equilibrium, *Israel J. Chem.* 58 (2018) 682–692, <https://doi.org/10.1002/ijch.201700136>.
- [52] H. Imai, T. Terada, T. Miura, S. Yamabi, Self-organized formation of porous aragonite with silicate, *J. Cryst. Growth* 244 (2002) 200–205, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(02\)01616-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(02)01616-0).
- [53] T. Terada, S. Yamabi, H. Imai, Formation process of sheets and helical forms consisting of strontium carbonate fibrous crystals with silicate, *J. Cryst. Growth* 253 (2003) 435–444, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(03\)01008-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(03)01008-X).
- [54] P. Noll, O. Steinbock, Particle aggregation modifies crystallization: Extending the hierarchical order of a polycrystalline material to the macroscale, *J. Phys. Chem.* 122 (2018) 23554–23563, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.8b07212>.
- [55] J. Hofker, Foraminifera from the tidal zone in the Netherlands Antilles and other West Indian Islands, *Stud. Fauna Curacao Caribb. Isl.* 21 (1964) 1–119.
- [56] J. Mauchline, W.L. Templeton, Strontium, calcium and barium in marine organisms from the Irish Sea, *ICES. J. Mar. Sci.* 30 (1966) 161–170, <https://doi.org/10.1093/icesjms/30.2.161>.
- [57] G. Montagu, *Testacea Britannica, or natural history of British shells, marine, land, and fresh-water, including the most minute: systematically arranged and embellished with figures*, J. White Lond. 1 and 2 (1803) 1–606.
- [58] L. Fernández, J. Zapata, Registro tafonómico de Ammonia beccarii (Linné, 1758) (Protozoa: Foraminiferida) en la marisma Quillaque (41°32'S; 72°44'O), Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 38 (2010) 286–291 10.3856/vol38-issue2-fulntext-15.
- [59] L. Bergamin, E. Romano, M.G. Finoia, F. Venti, J. Bianchi, A. Colasanti, A. Ausli, Pollution monitoring of Bagnoli Bay (Tyrrhenian Sea, Naples, Italy), a sedimentological, chemical and ecological approach, *Aquat. Ecosyst. Health* 8 (2005) 293–302.
- [60] J.L. Amorós, J.M. García-Ruiz, J.M. Agregados cristalinos de morfología inducida, *Investigación y Ciencia* 71 (1982) 6–15.
- [61] E. Bittarello, *Microcristalli di Carbonato di Bario con tessitura biominerale*, Thesis University of Torino, 2005, p. 221.
- [62] J.P. Reyes-Grajeda, D. Jáuregui-Zúñiga, N. Batina, M. Salmón-Salazar, A. Moreno, Experimental simulations of the biomineralization phenomena in avian eggshells using BaCO₃ aggregates grown inside an alkaline silica matrix, *J. Cryst. Growth* 234 (2002) 227–236, [https://doi.org/10.1016/S0022-0248\(01\)01638-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0248(01)01638-4).

- [63] C. Aparicio, M.P. Ginebra, *Biomaterialization and Biomaterials*, Woodhead Publishing, UK, 2016 Chapter 1 Section 1.5.
- [64] F.C. Meldrum, H. Cölfen, Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4332–4432, <https://doi.org/10.1021/cr80002856>.
- [65] J.D. Hopwood, S. Mann, Synthesis of barium sulfate nanoparticles and nanofilaments in reverse micelles and microemulsions, *Chem. Mater.* 9 (1997) 1819–1828, <https://doi.org/10.1021/cm970113q>.
- [66] M. Albéric, E.N. Caspi, M. Bennet, W. Ajili, N. Nassif, T. Azais, A. Berner, P. Fratzi, E. Zolotoyabko, L. Bertinetti, Interplay between calcite, amorphous calcium carbonate, and intracrystalline organics in sea urchin skeletal elements, *Cryst. Growth Des.* 18 (2018) 2189–2201, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01622>.
- [67] M.J. Uriz, Mineral skeletogenesis in sponges, *Can. J. Zool.* 84 (2006) 322–356, <https://doi.org/10.1139/z06-032>.
- [68] S. Weiner, P.M. Dove, An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect, *Rev. Min. Geochem.* 54 (2003) 1–29, <https://doi.org/10.2113/0540001>.
- [69] S. Weiner, Biomineralization: a structural perspective, *J. Struct. Biol.* 163 (2008) 229–234, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.02.001>.
- [70] L. Addadi, S. Weiner, Biomineralization: mineral formation by organisms, *Phys. Scr* 89 (2014) 1–13, <https://doi.org/10.1088/0031-8949/89/9/098003>.
- [71] S. Weiner, W. Traub, Macromolecules in mollusc shells and their functions in biomineralization, *Philos. Trans. R. Soc. Biol. Sci.* 304 (1984) 425–434, <https://doi.org/10.1098/rstb.1984.0036>.
- [72] A. Veis, A. Perry, The phosphoprotein of the dentin matrix, *Biochemistry* 6 (1967) 2409–2416, <https://doi.org/10.1021/bi00860a017>.
- [73] L. Addadi, S. Weiner, Design strategies in mineralized biological materials, *J. Mater. Chem.* 7 (1997) 689–702, <https://doi.org/10.1039/A604512J>.
- [74] L.B. Gower, Biomimetic model systems for investigating the amorphous precursor, *Chem. Rev.* 108 (2008) 4551–4627, <https://doi.org/10.1021/cr800443h>.
- [75] H.A. Lowenstam, S. Weiner, Mineralization by organisms and the evolution of biomineralization, *Biominer. Biol. Met. Accumul. Biol. Geol. Perspect.* (1983) 191–203, https://doi.org/10.1007/978-94-009-7944-4_17.
- [76] N. Kröger, N. Poulsen, Diatoms-From Cell Wall Biogenesis to Nanotechnology, *Ann. Rev. Genet.* 42 (2008) 83–107, <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.13010>.
- [77] S. Mann, Mineralization in biological systems, *Inorg. Elem. Biochem.* 54 (1983) 125–174, <https://doi.org/10.1007/BFb0111320>.
- [78] S. Mann, Molecular recognition in biomineralization, *Nature* 332 (1988) 119–124, <https://doi.org/10.1038/332119a0>.
- [79] R.R. Ruiz-Arellano, A. Moreno, Obtaining of spherica-shaped calcite crystals induced by intramineral proteins isolated from eggshells of ostrich and emu, *Cryst. Growth. Des.* 14 (2014) 5137–5143, <https://doi.org/10.1021/cg5008389>.
- [80] J.D. Termine, A.B. Belcourt, K.M. Conn, H.K. Kleinman, Mineral and collagen-binding proteins of fetal calf bone, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 10403–10408.
- [81] E.V. Sturm, H. Cölfen, Mesocrystals: Structural and morphogenetic aspects, *Chem. Soc. Rev.* 45 (2016) 5821–5833, <https://doi.org/10.1039/C6CS00208K>.
- [82] M. Moret, S. Rizzato, Crystallization behavior of coordination polymers. 2. Surface micro-morphology and growth mechanisms of $[\text{Cu}(\text{Bpp})_3\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ by *in situ* atomic force microscopy, *Cryst. Growth. Des.* 9 (2009) 5035–5042, <https://doi.org/10.1021/cg900987r>.
- [83] L. Carlucci, G. Ciani, J.M. Garcia-Ruiz, M. Moret, D.M. Proserpio, S. Rizzato, Crystallization behavior of coordination polymers. 1. Kinetic and thermodynamic features of 1,3-Bis(4-Pyridyl)Propane/ MCl_2 systems, *Cryst. Growth. Des.* 9 (2009) 5024–5034, <https://doi.org/10.1021/cg900985w>.
- [84] T. Nishinaga, Second Edition, “Handbook of Crystal Growth, Fundamentals: Thermodynamics and Kinetics I Elsevier, Amsterdam, 2015 Editor-in-Chief Tadata Nishinaga.
- [85] J.J. Métois, J.C. Heyraud, Mechanisms of morphological chance during the establishment of the equilibrium shape; Lead on graphite, *J. Cryst. Growth* 57 (1982) 487–492, [https://doi.org/10.1016/0022-0248\(82\)90063-X](https://doi.org/10.1016/0022-0248(82)90063-X).
- [86] Y. Wang, M. Zeng, F.C. Meldrum, H.K. Christenson, Using confinement to study the crystallization pathway of calcium carbonate, *Cryst. Growth. Des.* 17 (2017) 6787–6792, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.7b01359>.
- [87] N.K. Dhami, M.S. Reddy, M.S. Mukherjee, Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review, *Front. Microbiol.* 4 (2013) 1–13, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00314>.
- [88] M.J. Olszta, X. Cheng, S.S. Jee, R. Kumar, Y.Y. Kim, M.J. Kaufman, E.P. Douglas, L.B. Gower, Bone structure and formation: a new perspective, *Mater. Sci. Eng. R. Reports* 58 (2007) 77–116, <https://doi.org/10.1016/j.mser.2007.05.001>.
- [89] H.A. Lowenstam, D.P. Abbott, Vaterite: a mineralization product of the hard tissues of a marine organism (Ascidacea), *Science* 188 (1975) 363–365, <https://doi.org/10.1126/science.1118730>.
- [90] M.T. Hincke, C.P.W. Tsang, M. Courtney, V. Hill, R. Narbaitz, Purification and immunochemistry of a soluble matrix protein of the chicken eggshell (ovocleidin 17), *Calcif. Tissue. Int* 56 (1995) 578–583, <https://doi.org/10.1007/BF00298593>.
- [91] M. Panheleux, M. Bain, M.S. Fernandez, I. Morales, J. Gautron, J.L. Arias, S.E. Solomon, M. Hincke, Y. Nys, Organic matrix composition and ultrastructure of eggshell: a comparative study, *Br. Poult. Sci.* 40 (1999) 240–252, <https://doi.org/10.1080/00071669987665>.
- [92] Y. Nys, J. Gautron, M.D. McKee, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke, Biochemical and functional characterization of eggshell matrix proteins in hens, *Worlds. Poult. Sci. J.* 57 (2001) 401–413, <https://doi.org/10.1079/WPS20010029>.
- [93] I. Mikšik, V. Holáň, Z. Deyl, Avian eggshell pigments and their variability, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 113 (1996) 607–612, [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)02073-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)02073-X).
- [94] R. Zhao, G.Y. Xu, Z.Z. Liu, J.Y. Li, N. Yang, A study of eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens, *Poult. Sci.* 85 (2006) 546–549, <https://doi.org/10.1093/ps/85.3.546>.
- [95] L. Lavelin, N. Meiri, M. Pines, New insight in eggshell formation, *Poult. Sci.* 79 (2000) 1014–1017, <https://doi.org/10.1093/ps/79.7.1014>.
- [96] J.L. Arias, M.S. Fernández, Biomimetic processes through the study of mineralized shells, *Mater. Charact.* 50 (2003) 189–195, [https://doi.org/10.1016/S1044-5803\(03\)00088-3](https://doi.org/10.1016/S1044-5803(03)00088-3).
- [97] J.L. Arias, M.S. Fernandez, Role of extracellular matrix molecules in shell formation and structure, *Worlds. Poult. Sci. J.* 57 (2001) 349–357, <https://doi.org/10.1079/WPS20010024>.
- [98] M.T. Hincke, Y. Nys, J. Gautron, K. Mann, A.B. Rodriguez-Navarro, M.D. McKee, The eggshell: structure, composition and mineralization, *Front. Biosci.* 17 (2012) 1266–1280, <https://doi.org/10.2741/3985>.
- [99] M.L.H. Rose, M.T. Hincke, Protein constituents of the eggshell: eggshell-specific matrix proteins, *Cell. Mol. Life. Sci.* 66 (2009) 2707–2719, <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0046-y>.
- [100] M.S. Fernandez, M. Araya, J.L. Arias, Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules, *Matrix. Biol.* 16 (1997) 13–20, [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(97\)90112-8](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(97)90112-8).
- [101] M.S. Fernandez, K. Passalacqua, J.I. Arias, J.L. Arias, Partial biomimetic reconstruction of avian eggshell formation, *J. Struct. Biol.* 148 (2004) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.05.003>.
- [102] Y. Nys, J. Zawadzki, J. Gautron, A.D. Mills, Whitening of brown-shelled eggs: mineral composition of uterine fluid and rate of protoporphyrin deposition, *Poult. Sci.* 70 (1991) 1236–1245, <https://doi.org/10.3382/ps.0701236>.
- [103] R.M. Sharp, H. Silyn-Roberts, Development of preferred orientation in the eggshell of the domestic fowl, *Biophys. J.* 46 (1984) 175–180, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(84\)84010-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(84)84010-2).
- [104] J.L. Arias, D.J. Fink, S.Q. Xiao, A.H. Heuer, A.I. Caplad, Biomineralization and eggshells: Cell-mediated acellular compartments of mineralized extracellular matrix, *Int. Rev. Cytol.* 145 (1993) 217–250, [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60428-3](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60428-3).
- [105] A. Rodriguez-Navarro, O. Kalin, Y. Nys, J.M. Garcia-Ruiz, Influence of the micro-structure on the shell strength of eggs laid by hens of different ages, *Br. Poult. Sci.* 43 (2003) 395–403, <https://doi.org/10.1080/00071660120103675>.
- [106] J.H. Becking, The ultrastructure of the avian eggshell, *IBIS* 117 (1975) 143–151, <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1975.tb04201.x>.
- [107] A.C. Fraser, M. Bain, S.E. Solomon, Organic matrix morphology and distribution in the palisade layer of eggshells sampled at selected periods during lay, *Br. Poult. Sci.* 39 (1998) 225–228, <https://doi.org/10.1080/00071669889169>.
- [108] D.S. Robinson, N.R. King, Carbonic anhydrase and formation of the hen's eggshell, *Nature* 199 (1963) 497–498, <https://doi.org/10.1038/199497a0>.
- [109] B.H. Stemberger, W.J. Mueller, R.M. Leach Jr, Microscopic study of the initial stages of eggshell calcification, *Poult. Sci.* 56 (1977) 537–543, <https://doi.org/10.3382/ps.0560537>.
- [110] S. Baumgartner, D.J. Brown, E. Salevsky, R.M. Leach, Copper deficiency in the laying hen, *J. Nutr.* 108 (1978) 804–811, <https://doi.org/10.1093/jn/108.5.804>.
- [111] S.D. Chowdhury, Shell membrane protein system in relation to lathrogen toxicity and copper deficiency, *Worlds. Poult. Sci. J.* 46 (2005) 153–169, <https://doi.org/10.1079/WPS19900018>.
- [112] J.L. Arias, M. Cataldo, M.S. Fernandez, E. Kessi, Effect of beta-aminopropionitrile on eggshell formation, *Br. Poult. Sci.* 38 (1997) 349–354, <https://doi.org/10.1080/00071669708418001>.
- [113] M.J. Bunk, S.L. Balloun, Structure and relationship of the mammillary core to membrane fibres and initial calcification of the avian, *Br. Poult. Sci.* 18 (1977) 617–621, <https://doi.org/10.1080/00071667708416411>.
- [114] A. Hernández-Hernández, M.L. Vidal, J. Gómez-Morales, A. Rodríguez-Navarro, V. Labas, J. Gautron, Y. Nys, J.M. García-Ruiz, Influence of eggshell matrix proteins on the precipitation of calcium carbonate (CaCO_3), *J. Cryst. Growth* 310 (2008) 1754–1759, <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgro.2007.11.170>.
- [115] W.G. Robertson, The solubility concept, *Biol. Miner. Deminer* (1982) 5–21, https://doi.org/10.1007/978-3-642-68574-3_2.
- [116] J.D. Termine, H.K. Kleinman, S.W. Whitson, K.M. Conn, M.L. McGarvey, G.R. Martin, Osteonectin, A bone-specific protein linking mineral to collagen, *Cell* 26 (1981) 99–105, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90037-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90037-4).
- [117] K.E. Chave, Physics and chemistry of biomineralization, *Annu. Rev. Earth. Planet. Sci.* 12 (1984) 293–305, <https://doi.org/10.1146/annurev.ea.12.050184.001453>.
- [118] S. Weiner, L. Hood, Soluble protein of the organic matrix of mollusk shells: a potential template for shell formation, *Science* 190 (1975) 987–989, <https://doi.org/10.1126/science.1188379>.
- [119] N. Watabe, Crystal growth of calcium carbonate in the invertebrates, *Prog. Cryst. Growth. Char.* 4 (1981) 99–147, [https://doi.org/10.1016/0146-3535\(81\)90050-2](https://doi.org/10.1016/0146-3535(81)90050-2).
- [120] J.M. Dominguez-Vera, J. Gautron, J.M. García-Ruiz, Y. Nys, The effect of avian uterine fluid on the growth behavior of calcite crystals, *Poult. Sci.* 79 (2000) 901–907, <https://doi.org/10.1093/ps/79.6.901>.
- [121] J. Gautron, M. Bain, S. Solomon, Y. Nys, Soluble matrix of hen's eggshells extracted changes *in vitro* the rate of calcium carbonate precipitation and crystal morphology, *Br. Poult. Sci.* 37 (1996) 853–866, <https://doi.org/10.1080/00071669608417914>.
- [122] S.G. Tullet, Minireview the porosity of avian eggshells, *Comp. Biochem. Physiol.* 78A (1984) 5–13, [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(84\)90083-5](https://doi.org/10.1016/0300-9629(84)90083-5).
- [123] J. Gautron, M. Hincke, Y. Nys, Precursor matrix proteins in the uterine fluid change with stages of eggshell formation in hens, *Connect. Tissue. Res.* 36 (1997) 195–210, <https://doi.org/10.3109/03008209709160220>.

- [124] Y. Dauphin, J.P. Cuif, M. Salomé, J. Susini, C.T. Williams, Microstructure and chemical composition of giant avian eggshell, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1761–1771, <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0784-8>.
- [125] Y. Nys, J. Gautron, J.M. Garcia-Ruiz, M.T. Hincke, Avian eggshell mineralization: Biochemical and functional characterization of matrix proteins, *Comptes Rendus. Palevol* 3 (2004) 549–562, <https://doi.org/10.1016/j.crpv.2004.08.002>.
- [126] A.P.L. Kwan, I.R. Dickson, A.J. Freemont, M.E. Grant, Comparative studies of type X collagen expression in normal and rachitic chicken epiphyseal cartilage, *J. Cell. Biol.* 109 (1989) 1849–1856, <https://doi.org/10.1083/jcb.109.4.1849>.
- [127] J. Sodek, B. Ganss, M.D. McKee, Osteopontin, *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 11 (2000) 279–303, <https://doi.org/10.1177/10454411000110030101>.
- [128] S.E. Jones, C. Jomary, Clusterin, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34 (2002) 427–431, [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00155-8).
- [129] K. Yamashita, I. Ueda, A. Kobata, Sulfated asparagine-linked sugar chains of hen egg albumin, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14144–14147.
- [130] A.C. Awadé, S. Moreau, D. Mollé, G. Brulé, J.L. Maubois, Two-step chromatographic procedure for the purification of hen egg white ovomucin, lysozyme, ovotransferrin and ovalbumin and characterization of purified proteins, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 279–288, [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80156-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80156-8).
- [131] L. Campbell, V. Raikos, S.R. Euston, Modification of functional properties of egg-white proteins, *Nahrung. Food* 47 (2003) 369–376, <https://doi.org/10.1002/food.200390084>.
- [132] Y. Nys, M.T. Hincke, J.L. Arias, J.M. Garcia-Ruiz, S.E. Solomon, Avian eggshell mineralization, *Poult. Avian. Rev.* 10 (1999) 143–166.
- [133] M.T. Hincke, J. Gautron, C.P.W. Tsang, M.D. McKee, Y. Nys, Molecular cloning and ultrastructural localization of the core protein of an eggshell matrix proteoglycan, ovocleidin-116, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 32915–32923, <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32915>.
- [134] J. Gautron, M.T. Hincke, K. Mann, M. Panhéleux, M. Bain, M.D. KcKee, S.E. Solomon, Y. Nys, Ovocalyxin-32, a novel chicken eggshell matrix protein, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 39243–39252, <https://doi.org/10.1074/jbc.M104543200>.
- [135] J. Gautron, E. Murayama, A. Vignal, M. Morisson, M.D. McKee, S. Réhault, V. Labas, M. Belghazi, M.L. Vidal, Y. Nys, Cloning of ovocalyxin-36, a novel chicken eggshell protein related to lipopolysaccharide-binding proteins, bactericidal permeability-increasing proteins, and plunk family proteins, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 5273–5286, <https://doi.org/10.1074/jbc.M610294200>.
- [136] K. Mann, F. Siedler, The amino acid sequence of ovocleidin 17, a major protein of the avian eggshell calcified layer, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 47 (1999) 997–1007, <https://doi.org/10.1080/15216549900202123>.
- [137] J.P. Reyes-Grajeda, A. Moreno, A. Romero, Crystal structure of ovocleidin-17, a major protein of the calcified Gallus gallus eggshell, *J. Biol. Chem.* 279 (2004), <https://doi.org/10.1074/jbc.M406033200> 40976–40881.
- [138] P.K. Ajikumar, R. Lakshminarayanan, B.T. Ong, S. Valiyaveetil, R. Manjunathakini, Eggshell matrix protein mimics: designer peptides to induce the nucleation of calcite crystal aggregation in solution, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1321–1326, <https://doi.org/10.1021/bm034101b>.
- [139] J.A. Bertrand, D. Pignol, J.P. Bernard, J.M. Verdier, J.C. Dagorn, J.C. Fontcilla-Camps, Crystal structure of human lithostathin, the pancreatic inhibitor of stone formation, *EMBO J.* 15 (1996) 2678–2684.
- [140] A.M. Cao, G.D. Eslick, Epidemiology and pathogenesis of gallstones, *Pharm. J.* 274 (2005) 123–126, <https://doi.org/10.1007/bf02938132>.
- [141] C.A. Kurts, Crystal-clear mechanism of chronic kidney disease, *Kidney. Int.* 84 (2013) 859–861, <https://doi.org/10.1038/ki.2013.251>.
- [142] M. Spiess, The asialoglycoprotein receptor: A model for endocytic transport receptors, *Biochemistry* 29 (1990) 10009–10017, <https://doi.org/10.1021/bi00495a001>.
- [143] M. Meier, M.D. Bider, V.N. Malashkevich, M. Spiess, P. Burkhard, Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 857–865, <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.3853>.
- [144] J.L. Iovanna, J.C. Dagorn, The multifunctional family of secreted proteins containing a C-type lectin-like domain linked to a short N-terminal peptide, *Biochem. Biophys. Acta* 1723 (2005) 8–18, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.01.002>.
- [145] A.N. Zelensky, J.E. Gready, The C-type lectin-like domain superfamily, *FEBS J.* 272 (2005) 6179–6217, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>.
- [146] K. Drickamer, Ca²⁺-dependent carbohydrate-recognition domains in animal proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993) 393–400, [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(05\)80112-5](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(05)80112-5).
- [147] A. Legorreta-Flores, A. Davila-Tejeda, O. Velásquez-González, E. Ortega, A. Ponce, H. Castillo-Michel, J.P. Reyes-Grajeda, R. Hernández-Rivera, M. Cuéllar-Cruz, A. Moreno, Calcium carbonate crystal shapes mediated by intramineral proteins from eggshells of ratite birds and crocodiles. Implications to the eggshell's formation of a dinosaur of 70 million years old, *Cryst. Growth. Des.* 18 (2018) 5663–5673, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b01020>.
- [148] K. Mann, F. Siedler, Ostrich (*Struthio camelus*) eggshell matrix contains two different C-type lectin-like proteins. Isolation, amino acid sequence, and post-translational modifications, *Biochim. Biophys. Acta – Proteins. Proteom.* 1696 (2004) 41–50, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.09.006>.
- [149] A. Hecker, O. Testenièrre, F. Marin, G. Luquet, Phosphorylation of serine residues is fundamental for the calcium-binding ability of orchestin, a soluble matrix protein from crustacean calcium storage structures, *FEBS Lett.* 535 (2003) 49–54, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03856-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03856-5).
- [150] K. Mann, J.V. Olsen, B. Macek, F. Gnäd, M. Mann, Phosphoproteins of the chicken eggshell calcified layer, *Proteomics* 7 (2007) 106–115, <https://doi.org/10.1002/pmic.200600635>.
- [151] K. Mann, F. Siedler, Amino acid sequence and phosphorylation sites of emu and rhea eggshell C-type lectin-like proteins, *Comp. Biochem. Physiol. B* 143 (2006) 160–170, <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.11.003>.
- [152] A. Hernández-Hernández, A.B. Rodríguez-Navarro, J. Gómez-Morales, C. Jiménez-Lopez, Y. Nys, J.M. Garcia-Ruiz, Influence of model globular proteins with different isoelectric points on the precipitation of calcium carbonate, *Cryst. Growth. Des.* 8 (2008) 1495–1502, <https://doi.org/10.1021/cg070512q>.
- [153] C. Jimenez-Lopez, A. Rodríguez-Navarro, J.M. Dominguez-Vera, J.M. Garcia-Ruiz, Influence of lysozyme on the precipitation of calcium carbonate: A kinetic and morphological study, *Geochim. Cosmochim. Acta* 67 (2003) 1667–1676, [https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)01275-9](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01275-9).
- [154] R.R. Ruiz-Arellano, F.J. Medrano, A. Moreno, A. Romero, Structure of struthio-calcin-1, an intramineral protein from *Struthio camelus* eggshell, in two crystal forms, *Acta. Crystallogr. Sect. D. Biol. Crystallogr.* D71 (2015) 809–818, <https://doi.org/10.1107/S139900471500125X>.
- [155] H. Coelfen, Biominalization a crystal-clear view, *Nat. Mater.* 9 (2010) 960–961, <https://doi.org/10.1038/nmat2911>.
- [156] A. Gao, Q. Wu, D. Wang, Y. Ha, Z. Chen, P. Yang, A superhydrophobic surface templated by protein self-assembly and emerging application toward protein crystallization, *Adv. Mater.* 28 (2016) 579–587, <https://doi.org/10.1002/adma.201504769>.
- [157] P. Knoll, O. Steinbock, Nanodot-to-rod transition and particle attachment in self-organized polycrystalline aggregates, *Cryst. Growth Des.* 19 (2019) 4218–4223, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00085>.
- [158] J. Opel, N. Unglaube, M. Woerner, M. Kellermeier, H. Coelfen, J.M. Garcia-Ruiz, Hybrid biomimetic materials from silica/carbonate biomorphs, *Crystals* 9 (2019), <https://doi.org/10.3390/cryst9030157> 157–1/157–8.
- [159] J.P.K. Doye, W.C.K. Poon, Protein crystallization in vivo, *Curr. Opin. Colloid. Interface. Sci.* 11 (2006) 40–46, <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.10.002>.
- [160] F.X. Gallat, N. Matsugaki, N.P. Coussens, K.J. Yagi, M. Boudes, T. Higashi, D. Tsuji, Y. Tatano, M. Suzuki, E. Mizohata, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, J. Park, C. Song, T. Hatsui, M. Yabashi, E. Nango, K. Itoh, F. Coulibaly, S. Tobe, S. Ramaswamy, B. Stay, S. Iwata, L.M. Chavas, In vivo crystallography at X-ray free-electron lasers: the next generation of structural biology? *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.* 369 (2014) 20130497, <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0497>.
- [161] M.O. Wiedom, D. Oberthür, R. Bean, R. Schubert, N. Werner, B. Abbey, M. Aepfelbacher, L. Adriano, A. Allahgholi, N. Al-Qudami, J. Andreasson, S. Aplin, S. Awel, K. Ayyer, S. Bajt, I. Barák, S. Bari, J. Bielecki, S. Botha, D. Boukhelef, W. Brehm, S. Brockhauser, I. Cheviakov, M.A. Coleman, F. Cruz-Mazo, C. Danilevski, C. Darmanin, R.B. Doak, M. Domaracky, K. Dörner, Y. Du, H. Fangohr, H. Fleckenstein, M. Frank, P. Fromme, A.M. Gañán-Calvo, Y. Gevorkov, K. Giewekemeyer, H.M. Ginn, H. Graafsma, R. Graceffa, D. Greiffenberg, L. Gumprecht, P. Göttlicher, J. Hajdu, S. Hauf, M. Heymann, S. Holmes, D.A. Horke, M.S. Hunter, S. Imlau, A. Kaukher, Y. Kim, A. Klyuev, J. Knoška, B. Kobe, M. Kuhn, C. Kupitz, J. Küpper, J.M. Lahey-Rudolph, T. Laurus, K. Le Cong, R. Letrun, P.L. Xavier, L. Maia, F.R.N.C. Maia, V. Mariani, M. Messerschmidt, M. Metz, D. Mezza, T. Michelat, G. Mills, D.C.F. Monteiro, A. Morgan, K. Mühlig, A. Munke, A. Münlich, J. Nette, K.A. Nugent, T. Nuguid, A.M. Orville, S. Pandey, G. Pena, P. Villanueva-Perez, J. Poehlsner, G. Previtali, L. Redecke, W.M. Riekehr, H. Rohde, A. Round, T. Safenreiter, I. Sarrou, T. Sato, M. Schmidt, B. Schmitt, R. Schönerr, J. Schulz, J.A. Sellberg, M.M. Seibert, C. Seuring, M.L. Shelby, R.L. Shoeman, M. Sikorski, A. Silenzi, C.A. Stan, X. Shi, S. Stern, J. Sztuk-Dambietz, J. Szuba, A. Tolstikova, M. Trebbin, U. Trunk, P. Vagovic, T. Ve, B. Weinhausen, T.A. White, K. Wrona, C. Xu, O. Yefanov, N. Zatspein, J. Zhang, M. Perbandt, A.P. Mancuso, C. Betzel, H. Chapman, A. Barty, Megahertz serial crystallography, *Nat. Comm.* 9 (2018) 4025, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06156-7>.
- [162] C. Toumanoff, C. Vago, Histopathological study of silkworm with *Bacillus cereus*, *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 1953, *Fen* 84 (1953) 376–385.
- [163] T.A. Angus, A Bacterial Toxin Paralyzing Silkworm Larvae, *Nature* 173 (1954) 545–546, <https://doi.org/10.1038/173545a0>.
- [164] A.A. Yousten, M.H. Rogoff, Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation, *J. Bacteriol.* 100 (1969) 1229–1236.
- [165] N.L. Poloni, M.D. Ward, The materials science of pathological crystals, *Chem. Mater.* 26 (2014) 477–495, <https://doi.org/10.1021/cm402552v>.
- [166] M. Cuéllar-Cruz, Synthesis of inorganic and organic crystals mediated by proteins in different biological organisms. A mechanism of biomimetalization conserved throughout evolution in all living species, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* 63 (2017) 94–103, <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2017.07.001>.
- [167] H. Tsutsui, S. Karasawa, H. Shimizu, N. Nukina, A. Miyawaki, Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter, *EMBO Rep.* 6 (2005) 233–238, <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400361>.
- [168] L. Li, R.F. Ismagilov, Protein crystallization using microfluidic technologies based on valves, droplets, and slipchips, *Annu. Rev. Biophys.* 39 (2010) 139–158, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133630>.
- [169] H. Hasegawa, J. Wendling, F. He, E. Trilisky, R. Stevenson, H. Franey, F. Kinderman, G. Li, D.M. Piedmonte, T. Osslund, M. Shen, R.R. Ketchum, In vivo crystallization of human IgG in the endoplasmic reticulum of engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 19917–19931, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.204362>.
- [170] E. Chiu, F. Coulibaly, P. Metcalf, Insect virus polyhedral, infectious protein crystals that contain virus particles, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22 (2012) 234–240, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.02.003>.
- [171] R. Koopmann, K. Cupelli, L. Redecke, K. Nass, D.P. DePonte, T.A. White, F. Stellato, D. Rehders, M. Liang, J. Andreasson, A. Aquila, S. Bajt, M. Barthelmeß,

- A. Barty, M.J. Bogan, C. Bostedt, Se. Boutet, J.D. Bozek, C. Caleman, N. Coppola, J. Davidsson, R.B. Doak, T. Ekeberg, S.W. Epp, B. Erk, H. Fleckenstein, L. Foucar, H. Graafsma, L. Gumprecht, J. Hajdu, C.Y. Hampton, A. Hartmann, R. Hartmann, G. Hauser, H. Hirsemann, P. Holl, M.S. Hunter, S. Kassemeyer, R.A. Kirian, L. Lomb, F.R.N.C. Maia, N. Kimmel, A.V. Martin, M. Messerschmidt, C. Reich, D. Rolles, B. Rudek, A. Rudenko, I. Schlichting, J. Schulz, M.M. Seibert, R.L. Shoeman, R.G. Sierra, H. Soltan, S. Stern, L. Strüder, N. Timneanu, J. Ullrich, X. Wang, G. Weidenspointner, U. Weierstall, G.J. Williams, C.B. Wunderer, P. Fromme, J.C.H. Spence, T. Stehle, H.N. Chapman, C. Betzel, M. Duszhenko, *In vivo* protein crystallization opens new routes in structural biology, *Nat. Methods* 9 (2012) 259–264, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1859>.
- [172] M. Duszhenko, L. Redecke, C.M. Mudogo, B.P. Sommer, S. Mogk, D. Oberthuer, C. Betzel, *In vivo* protein crystallization in combination with highly brilliant radiation sources offers novel opportunities for the structural analysis of post-translationally modified eukaryotic proteins, *Acta F71* (2015) 929–937, <https://doi.org/10.1107/S2053230X15011450>.
- [173] R. Schoenherr, M. Klinge, J.M. Rudolph, K. Fita, D. Rehders, F. Luebber, S. Schneegans, I.V. Majoul, M. Duszhenko, C. Betzel, A. Brandariz-Nuñez, J. Martinez-Costas, R. Duden, L. Redecke, Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells, *Struct. Dyn.* 2 (2015) 041712, <https://doi.org/10.1063/1.4921591>.
- [174] S. Habisov, V. Kirkin, Caging the elephant: Selective autophagy tackles giant intracellular protein crystals, *Mol. Cell* 58 (2015) 5–7, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.03.022>.
- [175] H. Tsutsui, Y. Jinno, K. Shoda, A. Tomita, M. Matsuda, E. Yamashita, H. Katayama, A. Nakagawa, A. Miyawaki, A diffraction-quality protein crystal processed as an autophagic cargo, *Mol. Cell* 58 (2015) 186–193, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.007>.
- [176] A.J. Jakobi, D.M. Passon, K. Knoops, F. Stellato, M. Liang, T.A. White, T. Seine, M. Messerschmidt, H.N. Chapman, M. Wilmanns, *In cellulo* serial crystallography of alcohol oxidase crystals inside yeast cells, *IUCrJ* 3 (2016) 88–95, <https://doi.org/10.1107/S2052252515022927>.
- [177] M. Boudes, D. Garriga, A. Fryga, T. Caradoc-Davies, F. Coulibaly, A pipeline for structure determination of *in vivo*-grown crystal using *in cellulo* diffraction, *Acta Crystallogr. D72* (2016) 576–585, <https://doi.org/10.1107/S2059798316002369>.
- [178] R. Adalat, F. Saleem, N. Crickmore, S. Naz, A.R. Shakoori, *In vivo* crystallization of three-domain cry toxins, *Toxins* 9 (2017), <https://doi.org/10.3390/toxins9030080> 80–1/80–13.
- [179] C.M. Ferreira, R. Stiebler, F.F. Saraiva, G.C. Lechuga, A.B. Walter-Nuno, S.C. Bourguignon, M.S. Gonzales, P. Azambuja, A.C.P. Gandara, R.F.S. Menna-Barreto, G.O. Paiva-Silva, M.C. Paess, M.F. Oliveira, Heme crystallization in a Chagas disease vector acts as a redox-protective mechanism to allow insect reproduction and parasite infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (2018) e0006661, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006661>.
- [180] H. Hasegawa, Simultaneous induction of distinct protein phase separation events in multiple subcellular compartments of a single cell, *Exp. Cell. Res.* 379 (2019) 92–109, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.03.010>.
- [181] R. Giegé, What macromolecular crystallogensis tells us – what is needed in the future, *IUCrJ* 4 (2017) 340–349, <https://doi.org/10.1107/S2052252517006595>.

Searching for a Clue to Characterize a Crystalline Dinosaur's Eggshell of Baja California, Mexico

Nerith R. Elejalde-Cadena, Jonathan S. Cabrera-Hernández, René Hernández-Rivera, and Abel Moreno*



Cite This: *ACS Omega* 2020, 5, 25936–25946



Read Online

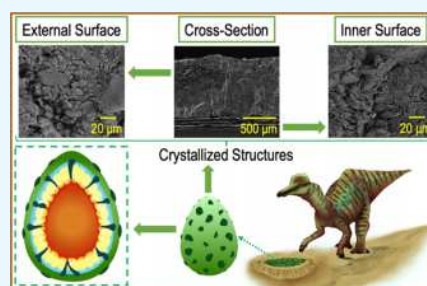
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: This work presents a detailed structural and morphological analysis of different dinosaur eggshells such as *Spheroolithus* (sample 1, 2), lambeosaurinae, *Prismatoolithus*, and one unidentified ootaxon performed by high-resolution scanning electron microscopy (HRSEM). These ancient eggshells of Late Cretaceous dinosaurs were collected in the coastal area of El Rosario, Baja California in Mexico. Additionally, a thorough study was performed on the elements present in the samples by different techniques such as energy-dispersive spectroscopy (EDS), X-ray fluorescence (XRF), and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The XPS technique was performed to make an accurate identification of the compounds of two different types of eggshells (*Spheroolithus* sample 1 and *Prismatoolithus*). This contribution compares the surface of five different dinosaur eggshells of 74 Ma and their inner section to determine the morphology, distribution of the chemical elements present, as well as their relationship. The observed morphology of the ornithomimid eggshells of the herbivorous species shows that the mammillary cones are in the form of columns with microaggregates and irregular pores. In contrast, in the theropod eggshells, the mammillary cones are observed in different forms with wider pores. Finally, the chemical components present in the structures of each of the samples were estimated using the information obtained from SEM-EDS, evidencing the presence of calcite, quartz, and albite in each of the samples. The composition reveals that eggshells contain Si, P, S, K, Ca, Mn, Fe, and Sr and trace elements such as Cr, Cu, and Zn. The presence of heavy metals may be an indication that the eggshells presented diagenetic alterations.



INTRODUCTION

Dinosaurs were one of the most enigmatic and interesting species of animals that have existed on earth. They lived in a variety of environments that ranged from forest to arid land, including the coast around the oceans.^{1,2} Of these species, the first dinosaur was the *Megalosaurus* discovered and described by William Buckland at the end of the 18th century.^{3,4} Later, Mary Ann Mantell identified the *Iguanodon* and the *ankylosaurus Hylaeosaurus* that presented great differences in the shape of bones, posture, and teeth compared to the first discovery.⁴ In the second half of the 19th century, William Parker-Foulke found the first duckbill dinosaur fossil *Hadrosaur fouldkii*.^{5,6} The *Hadrosaurus* species belong to the Hadrosauridae family. They are a group of herbivores that lived approximately 80–66 million years ago during the Late Cretaceous period.⁷ Subsequently, the theropod *Cryolophosaurus ellioti* belonging to the Tetanurae family was discovered in the Antarctica.⁸ This family belongs to the carnivorous species called maniraptoran that lived between the Late Jurassic and Late Cretaceous period (160–66 million years back).⁹

All of the dinosaurs mentioned above faced a period of extinction along the earth, with the fossils found in different parts of the world being the only evidences of their existence. Information from the paleoenvironmental conditions, as well as diagenetic and thermal changes were investigated for fossils

comprising bones, skeleton, tracks, skin impressions, gastroliths, coprolites,¹⁰ nets,¹¹ and eggs or eggshells.^{12,13} Since the sensational discovery of dinosaur eggs in Gobi desert by the Central Asiatic Expedition of the American Museum of Natural History in the early 1920s, the remains of fossil eggshells, eggs, and nest have been found in all of the continent and all Mesozoic deposits, most of them from the upper Cretaceous.^{14,15} Just in North America alone, there exist at least 40 localities with fossils of eggs and eggshells distributed between Canada, the United States, and Mexico.¹⁶

Most of the works on the classification of fossil eggshells are based on their different characteristics such as the general morphology, pore shape, and thickness, but mainly the biocrystalline arrangement.^{17–20} A few works focus on the element and the isotopic analysis that we carried out. These were done to find information about the possible body

Received: July 11, 2020

Accepted: September 16, 2020

Published: September 30, 2020



temperature of some of the dinosaur groups,²¹ but above all, we wanted to infer their paleoenvironmental conditions.^{22,23}

Regardless of its size, morphology, and shape, the eggshell provides the embryo a stable and adequate medium called the homeostatic medium.¹⁵ The egg is composed of two phases: an organic phase constituted of sugars, lipids, and proteins, and an inorganic phase mainly composed of calcium carbonate (CaCO_3) that corresponds to the mineral part of the eggshell (Figure 1). The function of the eggshell (based on its architecture) is to protect the embryo against external environmental agents that affect its development.^{24,25}

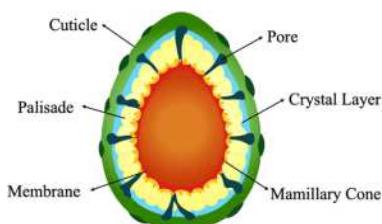


Figure 1. Schematic illustration of the parts of the avian eggshell.

A great diversity of Late Cretaceous dinosaurs has been discovered²⁶ in Mexico, where, at present, there only exist two localities with egg and eggshell fossil records: Cerro El Pueblo Formation at the south of Coahuila²⁷ and El Gallo Formation in Baja California.²⁸ Those discoveries lead to the studies of paleopathology,²⁹ ignites,³⁰ teeth,³¹ and the paleoenvironment³² of different species, with the Hadrosauridae family the most reported in the scientific literature.³³ These works, like most of them, are focused on the classification of eggshells; however, there is no information about the elemental composition of fossil eggshells found in this country. Therefore, we have studied the elemental composition and their distribution in different areas using different dinosaur eggshells. We have also studied the change they have undergone due to the paleoenvironmental and diagenetic conditions that caused the formation of exogenous inorganic sediments in these eggshells.

The majority of dinosaurs' eggshells found in old nests in different parts of the world are proved enough of their existence. The following questions arise: How were they originated? How did these species disappear? But most of all, how can we characterize the one unknown sample if it does not correspond to the others in the nest? None of these questions have a simple answer as we cannot travel back in time to be the

direct observers of how that happened. Nor are there any living witnesses alive. However, some testimonies have been found recorded on the surface of Earth's rocks or fossilized samples in the best cases, but this information is, most of the time, hard to decode and rests there hidden. However, we have some techniques that can help us to unravel some of the mysteries that lie there hidden, such as spectroscopic and microscopic techniques.³⁴ These were performed to study the surface and cross-sectional morphology as well as the elemental composition of the external and internal surfaces of the eggshells of five samples: *Spheroolithus* (samples 1 and 2), Lambeosaurinae, *Prismatoolithus*, and one unidentified ootaxon. The aim of this research was to perform strategies to analyze the eggshell of the unidentified ootaxon to determine whether it belonged to either herbivorous (ornithomorph) or carnivorous (theropod) dinosaurs.

The eggshell samples assigned to the oogenus *Spheroolithus* and *Prismatoolithus* were described and identified in a previous work.²⁸ However, based on the El Gallo Formation fossil record, it is believed that these eggshells were laid by ornithomorph hadrosaur (Figure 2A) in the case of *Spheroolithus* eggshells, and by a theropod troodontid in the case of the *Prismatoolithus* eggshell (Figure 2B).²⁷ The Lambeosaurinae eggshell is assigned to this taxon thanks to association founded in the site. The unidentified sample is too damaged to identify and to classify into an oofamily.

All of these analyses aimed at giving information about the elemental composition of the dinosaur eggshells collected in Mexico contributing therefore to the paleontological research in the Americas, in the same way that has already been done in other continents.

Geographical Location of the Dinosaur Eggshells.

The samples were collected in the El Gallo Formation (Late Campanian) in the town of El Rosario, Baja California. The Lambeosaurinae eggshells (II) were 3.4 km from El Rosario ($30^{\circ}3'25''\text{N}$ $115^{\circ}45'37''\text{W}$) (Figure 3); those of the *Prismatoolithus* eggshells (IV) and the unidentified ootaxon (V) were 1.2 km from point II ($30^{\circ}3'50''\text{N}$ $115^{\circ}46'12''\text{W}$), while the two *Spheroolithus* eggshells (I and III) were 2.1 km from point II ($30^{\circ}3'58''\text{N}$ $115^{\circ}46'45''\text{W}$).

RESULTS AND DISCUSSION

The samples studied were donated from the Institute of Geology from the National Autonomous University of Mexico (UNAM). These eggshells were dated and classified according to the classic protocols used in paleontology. However, there was not any approach or methodology to characterize these

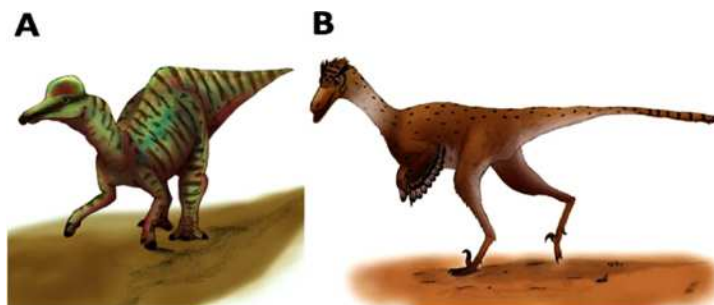


Figure 2. Illustrations of (A) ornithomorph (herbivorous) and (B) theropod (carnivorous) dinosaurs belonging to the Hadrosauridae and Troodontidae families.

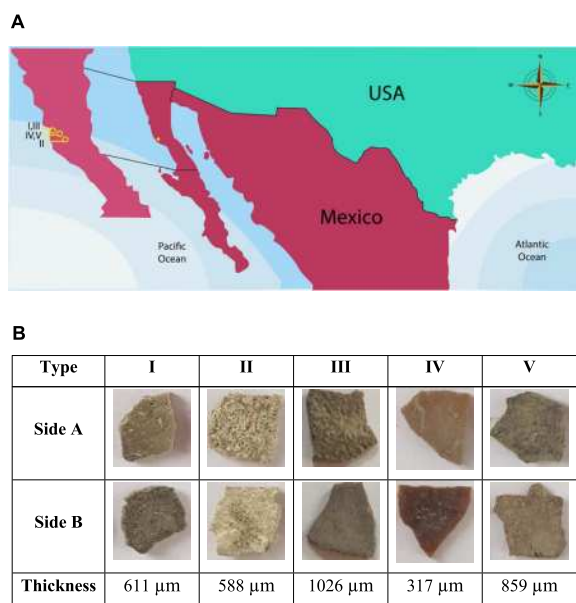


Figure 3. (a) Map of the precise location where the eggshells were collected: (I) *Spheroolithus* sample 1; (II) Lambeosaurinae eggshell; (III) *Spheroolithus* sample 1; (IV) *Prismatoolithus*; and (V) unidentified ootaxon. The inset on the left-hand side is the amplified zone of the north part of the Baja California peninsula, where these samples were found. (b) Eggshells of the five types of dinosaurs: (I) *Spheroolithus* sample 1; (II) Lambeosaurinae eggshell; (III) *Spheroolithus* sample 2; (IV) *Prismatoolithus*; and (V) unidentified ootaxon. Side A. External surface; Side B. Inner surface.

samples by spectroscopic and structural methods. Figure 3 shows the optical photos of five dinosaur eggshells discussed in this work. They present dimensions of approximately 0.5 cm \times 0.5 cm. We were able to appreciate that the theropod eggshell (IV) has a reddish coloration and smooth surface, while the ornithopod eggshells (I, II, and III) have opaque colors such as gray and light yellow with rough surfaces.

According to the images in Figure 3, the eggshells of the unidentified ootaxon (V) are similar to the eggshells corresponding to the ornithopod (I and III) in terms of roughness and thickness.

Morphological Characterization by Scanning Electron Microscopy (SEM). An intrinsic characteristic of the ornithopods' eggshells is that they present tubular calcite crystals. The phases are usually merged, making it difficult to discern them, and in some cases, present ornamentation in the outer layer.^{14,15} The characteristic of *Prismatoolithus* eggshells from theropods, on the other hand, presents at least two structural layers in the eggshell, a mammillary layer in the lower part of the eggshell with a radial-tubular structure, followed by a prismatic layer in the upper part with a tubular or columnar structure. In addition, they have a smooth external surface as ornamentation.^{35,36}

From the external and internal surfaces (Figure 4A,B), we can observe large deposition of granules forming larger aggregates, thus preventing the visibility of smaller particles due to the fusion of adjacent units. The inner surface of the ornithopod eggshells (Figure 4, types IB, IIB, and IIIB) presents units with fibrous structures similar to those observed in titanosaurid dinosaur eggshells,³⁷ which were probably

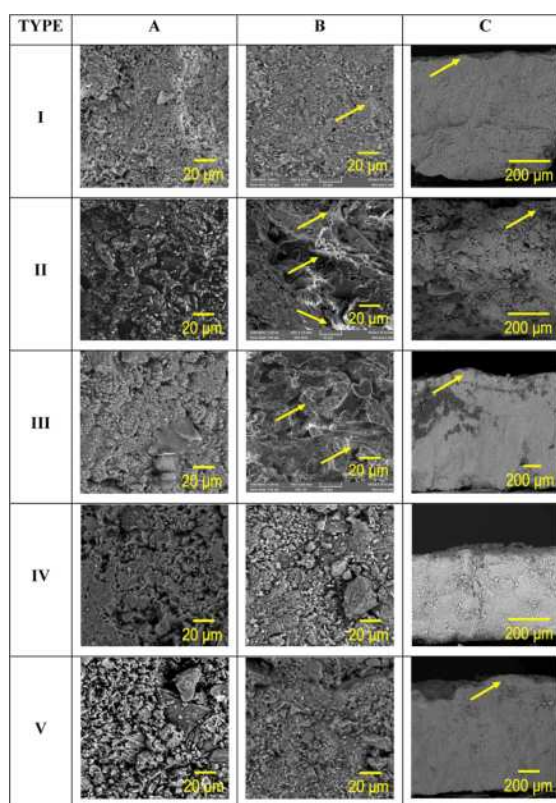


Figure 4. SEM images of the five dinosaur eggshells. (A) External surface; (B) inner surface; (C) cross section: (I) *Spheroolithus* sample 1, (II) Lambeosaurinae eggshell, (III) *Spheroolithus* sample 2, (IV) *Prismatoolithus*, and (V) unidentified ootaxon. The ornamentation (IC-VC) and fibrous structures (IB) are indicated by the yellow arrow.

formed due to the presence of the membrana testacea (indicated by the yellow arrow in Figure 4B). As for the theropod eggshells (Figure 4, type IVB), they present granular structures of different shapes and sizes distinct from those observed in the nonidentified ootaxon (Figure 4, type VB), which has microaggregates scattered over the entire internal surface, giving a soft and fibrous appearance in some areas of the eggshell.

However, the theropod eggshell (Figure 4, type IVC) presents a smooth appearance, without protuberance on the surface. Dinosaur eggshells have different ornamentation forms such as nodes, valleys, or ridges³⁸ distributed over the entire outer surface of the eggshell.¹⁸ *Spheroolithus* eggshells (Figure 4, types IC and IIIC) present nodes distributed at different distances (this is indicated by the yellow arrow in Figure 4C), similar to those found in the unidentified ootaxon (Figure 4, type VC). In the case of the Lambeosaurinae eggshell (Figure 4, type IIC), we were unable to identify any ornamentations due to the wear that the eggshell presents. We could, however, observe a thin lamina in some areas of the surface, which probably corresponds to structures formed by the diagenetic processes. Apart from all of these characteristics, the ornithopods eggshells also present a calcite diagenetic layer of approximately $\sim 100 \mu\text{m}$ thickness, which makes the visibility of the ornamentation difficult.

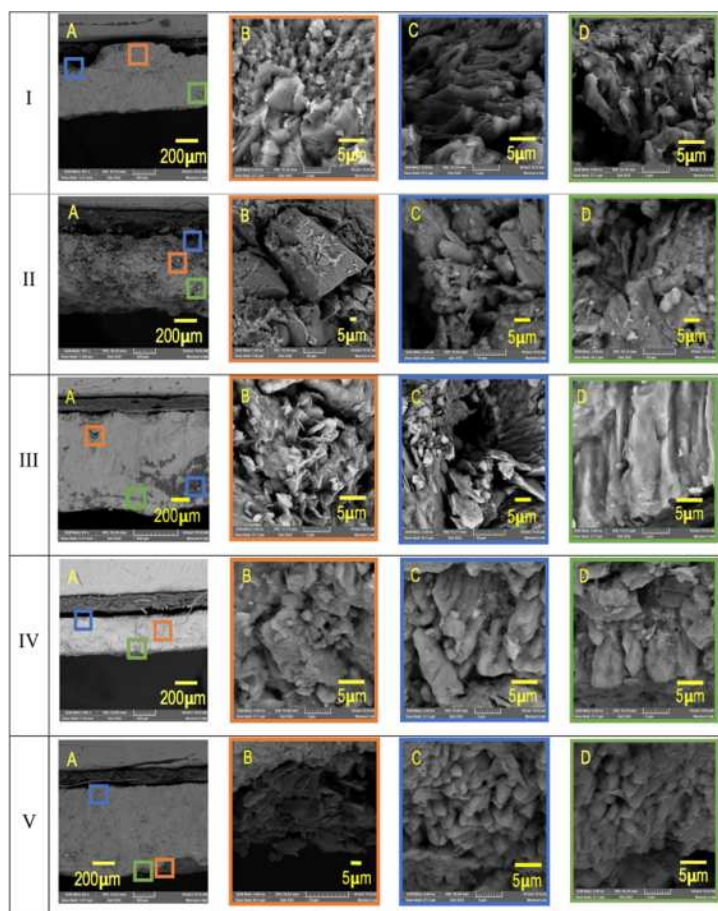


Figure 5. SEM images of the cross section of the five dinosaur eggshells. (A) Cross section; (B) structures observed in the cross section in different zones; (C) mammillary cones; (D) structures present in the cuticle: (I) *Spheroolithus* sample 1, (II) Lambeosaurinae eggshell, (III) *Spheroolithus* sample 2, (IV) *Prismoolithus*, and (V) unidentified ootaxon. The outer surface is at the bottom of each image.

The structural morphology observed in the eggshells varies depending on the area of analysis. The *Spheroolithus* sample 1 (Figure 5, type I) is composed of layers of different morphologies not very well faceted (Figure 5, type IA) and of irregular structures with sizes ranging from 0.5 to 5 μm (Figure 5, type IB). The first layer of the eggshell fulfills the function of the base carrying out the process of crystallization and formation of the mammillary cones. This layer grows epitaxially, with a cone appearance (Figure 5, type IC), giving way to the formation of the mineral palisade composed mainly of calcium carbonate (CaCO_3), which is responsible for the hardness and shape of the eggshell.³⁹ We were able to observe the outer layer formed by a sheet of crystals arranged in parallel (Figure 5, type ID). A similar observation was also made in the eggshell of the *Spheroolithus*, sample 2 (type III), where the layers are presented in different morphologies (Figure 5, type IIIA). Here, we were able to appreciate more clearly a polycrystalline growth (Figure 5, type IIIB), mammillary cones growing out of the membrane (Figure 5, type IIIC), and a well-defined calcite diagenetic layer (Figure 5, type IIID).

The *Spheroolithus* eggshells belonging to ornithopod dinosaur, as does the Lambeosaurinae family eggshell (Figure 5, type IIA), present different structures with well-defined facets with sizes greater than 5 μm (some even ranging from 20

to 50 μm). This is what causes an increase in the roughness of the sample that can be easily spotted under an optical microscope. This roughness prevents the observation of the eggshell layers. However, the mammillary cones are shorter and separated from each other (Figure 5, type IIC); they present columnar structures in the outer layer of the eggshell (Figure 5, type IID), as those observed in the previous species (Figure 5, type ID).

The eggshells of the ornithopod dinosaurs present thin and elongated mammillary cones with a rounded termination arranged in parallel, very different from those observed in the *Prismoolithus* eggshell (Figure 5, type IVC). The mammillary cones form clusters with broad juxtaposed bilayered structures that have an unrounded and columnar termination in the outer surface (Figure 5, type IVD). In addition, they have structures with sizes ranging from 0.5 to 10 μm (Figure 5, type IVB), while the nonidentified ootaxon presents a high similarity with the eggshells of ornithopods in terms of crystal size and appearance (Figure 5, type VB). We were able to distinguish a polycrystalline growth identical to the one observed in the *Spheroolithus* eggshell sample 2 (Figure 5, type IIIB), with thin mammillary cones and closely spherical structures (Figure 5, type VC), forming small columns located in the last layer of the eggshell (Figure 5, type VD) and thus adding more

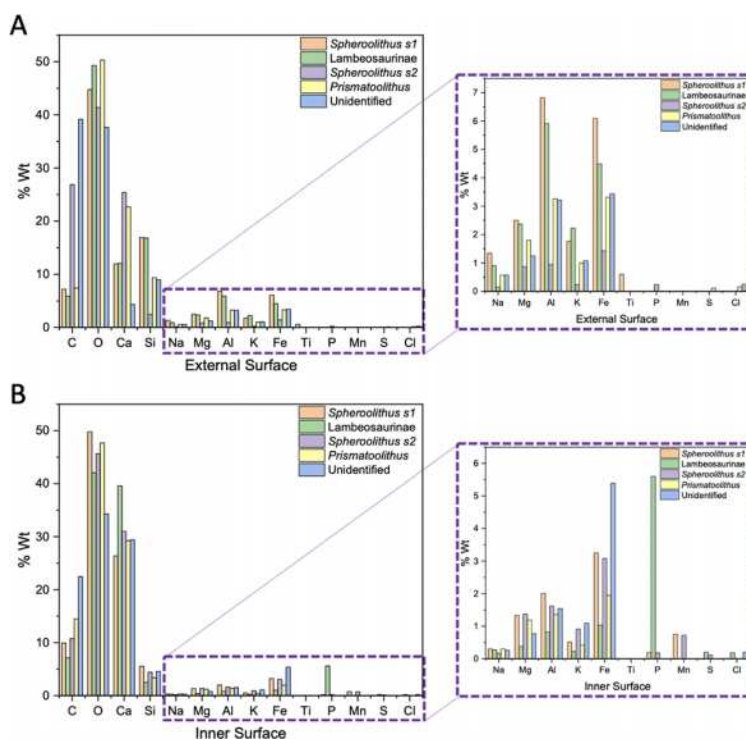


Figure 6. Elemental composition in the percentage of molecular weight of the eggshells of the five dinosaurs. (A) External surface; (B) inner surface; orange: *Spheroolithus* sample 1, green: Lambeosaurinae eggshell, yellow: *Spheroolithus* sample 2, purple: *Prismatoolithus*, blue: unidentified ootaxon. The inset shows a zoom over the area where the percentage value of the elements present in the tables is very low.

evidence to the idea of the eggshell belonging to ornithomimid dinosaurs corresponding probably to the Hadrosauridae family.

Elemental Analysis by Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS). EDS analysis was performed on both sides of the eggshells. Here, the presence of calcium (Ca), oxygen (O), silicon (Si), and carbon (C) was mainly observed (Figure 6A,B). These elements are the main components of the eggshell and of the wollastonite.⁴⁰ This is one of the standards of the compounds that can be found in the sample (see Supporting Information Table S1). Wollastonite is a common mineral that is obtained in the reaction of calcium carbonate (CaCO_3) with silicon dioxide (SiO_2 , due to the silicification) in the eggshell. This synthesis happens in the soil at high temperatures and pressures during progressive metamorphism.⁴¹ In addition, elements such as magnesium (Mg), iron (Fe), potassium (K), sodium (Na), and aluminum (Al) are also found in smaller quantities, as observed in the inset of Figure 6A,B, respectively. These elements are mixed with silicon oxide,⁴² forming albite, a common mineral that is also composed of aluminum, potassium, and sodium.⁴³

Of the elemental composition obtained, the calcium content is inversely proportional to the content of silicon on both sides, being higher on the outer side than on the inner side (Figure 6A,B). The decrease in the calcium content is probably an indication that other elements have infiltrated through diffusion, replacement, or recrystallization processes carried out during fossilization.⁴⁴

The presence of elements such as magnesium (Mg), phosphorus (P), and manganese (Mn) is an indication that sedimentary materials such as clay minerals were filtered inside the eggshells. Thanks to this, the elements and/or minerals

that are not part of the composition of the eggshell could also be observed. The evidence that the eggshell has undergone diagenetic changes during fossilization implied a change in the elemental composition of the eggshell.

In addition, the EDS mapping of the studied area, framed with a white line (Figure 7 and Supporting Information Figures S6–S9), allowed us to observe that carbon, potassium, iron, manganese, phosphorous, sulfur, and chlorine, in the case of Supporting Information Figures S6–S9, are distributed more evenly throughout the sample compared to the other elements. Oxygen, sodium, aluminum, silicon, and magnesium are found mainly in areas where calcium is present in a lower concentration due to the spatial location of the atoms within the structures formed in the eggshells. Furthermore, Figure 7 shows a larger structure framed in yellow, in which oxygen, sodium, aluminum, and silicon are the most characteristic elements, as is the structure shown in Supporting Information Figure S9.

X-ray Fluorescence (XRF) Elemental Analysis. X-ray fluorescence analysis is a technique that helps determining the elemental composition of a sample with high precision compared to the analysis obtained by EDS. Therefore, the samples were analyzed to corroborate the data previously obtained. Supporting Information Table S2 shows the mass concentration (mg kg^{-1}) of each of the elements found in the samples. Being calcium the main component of the eggshells, its high concentration is adequate for the type of sample. Furthermore, silicon and phosphorous are slightly in excess compared to aluminum, potassium, or iron, elements that are naturally found in the soil.⁴⁵ Moreover, the presence of sodium, magnesium, and chlorine was observed with values

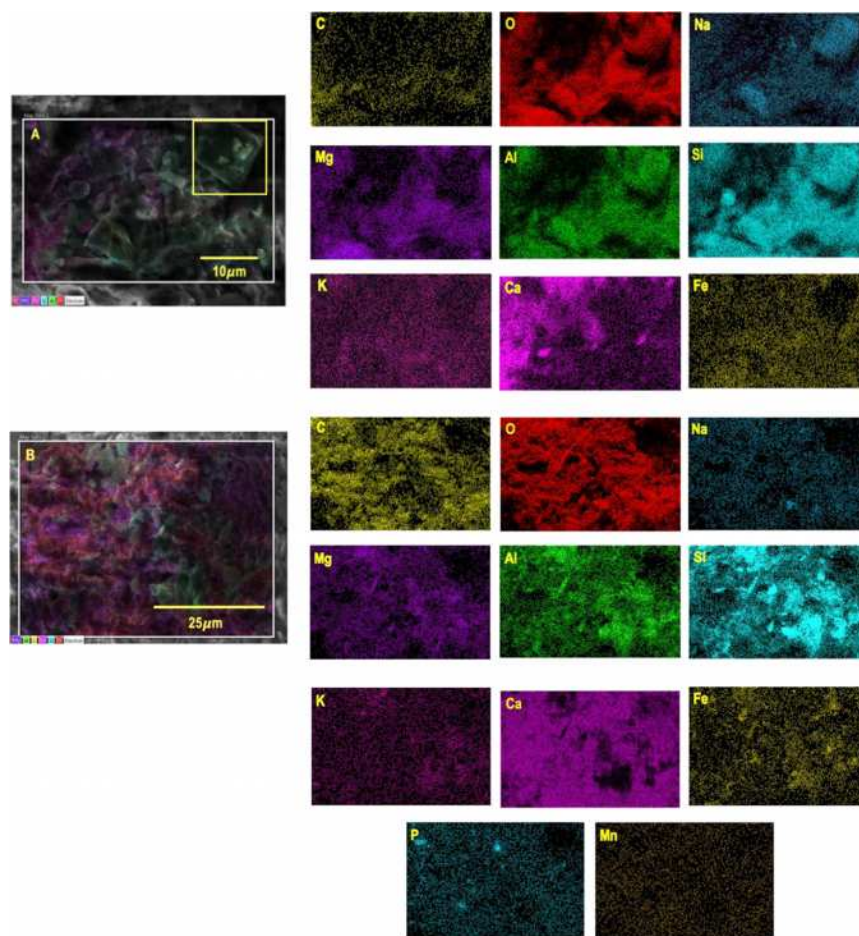


Figure 7. Images of the elemental distribution EDS (in color) of the surface eggshell of the *Spheroolithus* sample 1. (A) External surface, (B) inner surface.

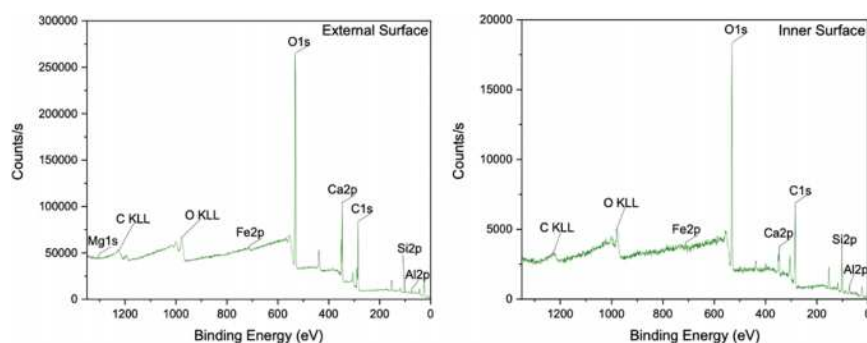


Figure 8. X-ray photoelectron spectra (XPS) of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1 (external and inner surfaces). The electronic state of some elements presented in the eggshell surface corresponds to the observed by EDS and XRF.

that are considered unreliable. However, the presence of metals like chromium (Cr), copper (Cu), zinc (Zn), and strontium (Sr), which were not observed by EDS, was detected by XRF. This provides information about the strength of the energy of the electronic levels, as the depth of the signal produced by XRF is greater than the one produced by EDS, allowing

determination of these elements, which are in very low concentrations.

Determination of the Electronic State of the Elements by X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).

X-ray photoelectron spectroscopy is used to determine the elemental composition and chemical and electronic states of the elements present on the surface of a sample at a depth of

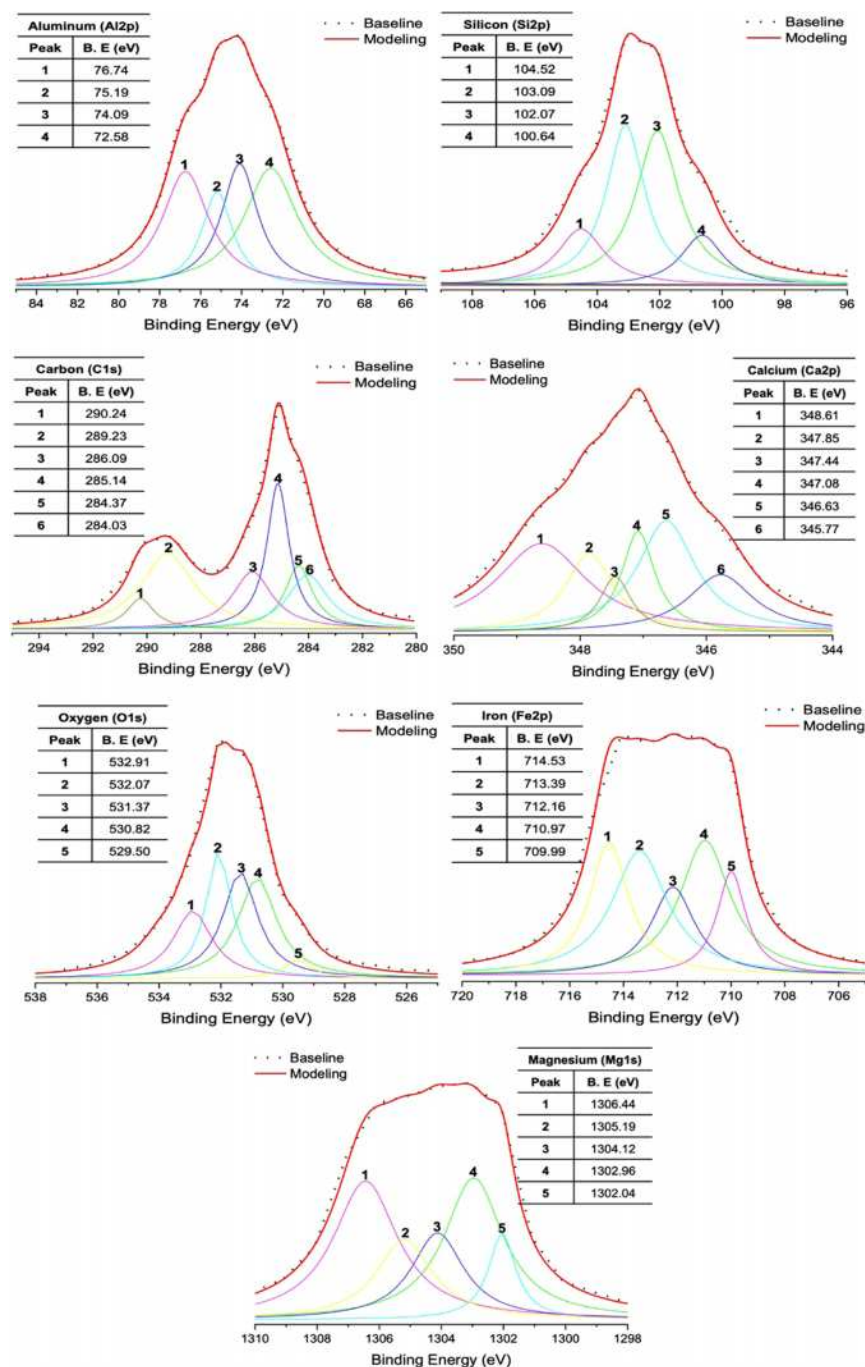


Figure 9. Deconvoluted X-ray photoelectron spectra of the external surface of the eggshell *Spheroolithus* sample 1. The tables show the binding energies of each compound; binding energy (B.E.).

1–10 nm.⁴⁶ Due to the presence of metals such as chromium, copper, zinc, and strontium detected in the XRF analysis but undetected in EDS, we decided to corroborate whether these elements could only be found inside or whether they could also be found on the surface of the samples. Based on these data, we found that these atoms were surrounded by the main elements of the eggshell (Ca, C, O). Compared to that of the

bulk, the metals had a much higher binding potential on the surface, causing an increase in reactivity.

According to the spectra obtained from the ornithopod and theropod eggshells (Figures 8 and S11), the elements that are evident are calcium (Ca 2p, ≈ 347 eV), oxygen (O 1s, ≈ 532 eV), carbon (C 1s, ≈ 285 eV), silicon (Si 2p, ≈ 102 eV), aluminum (Al 2p, ≈ 74 eV), iron (Fe 2p, ≈ 712 eV), sodium

(Na 1s, ≈ 1072 eV), and magnesium (Mg 1s, ≈ 1303 eV). The intensities corresponding to oxygen and carbon are the most notable (with the exception of calcium on the external surface), probably due to the presence of organic molecules formed on the surface of the eggshells and to the calcite diagenetic layer formed by the fossilization process. The decrease in some of the signals is caused by electrons that are elastically dispersed before leaving the surface of the sample, causing a reduction in the kinetic energy of the electrons and, therefore, a decrease in the intensity of the peaks.

To determine the chemical bonding and compounds on the surfaces of each of the samples, the deconvolution of each of the electronic states was carried out, determining thus different functional groups from spheroolithus eggshell (Figures 9 and S10) (to see the compounds of each spectrum, see the Supporting Information). The aluminum (Al 2p) spectrum was resolved into four curves. The peaks at 76.74 eV and 74.09 eV are related to oxide (Al_2O_3) and hydroxide ($\text{Al}(\text{OH})_3$) compounds, while the peak at 75.19 eV is associated with aluminosilicates (Al_2SiO_5) and metallic Al is founded at 72.58 eV. Silicon (Si 2p) spectrum had the same behavior as aluminum, with four curves at 104.52, 103.09, 102.07, and 100.64 eV, associated with elemental silicon, Si 2p_{3/2}, Si 2p_{1/2}, and silicon oxide (SiO_2). The nonmetallic element such as carbon (C 1s) presents a peak at 286.09 eV, which is associated with acetyl compounds (O–C–O). At 284.37 eV, compounds with nonoxidized alkane-type carbon groups (C–C) were observed, as well as carboxylic groups (C=O) at 289.23 eV. In addition, metal carbonates were observed at 290.21 eV, which are probably associated with CaCO_3 and Na_2CO_3 . Besides, the C sp² and C sp³ peaks were detected at 285.14 and 284.03 eV, respectively. Oxygen (O 1s), another nonmetallic element, corroborated the information obtained from the C 1s, the signals corresponding to the C–O group belong to alcohol and ether groups at 532.91 eV, and metal oxides at 530.82 and 529.50 eV are observed.^{47,48}

The binding energies of the characteristic signals of alkali and alkaline-earth metals such as sodium (Na 1s) for the case of *Prismatoolithus* eggshell (Figure S11–S13), calcium (Ca 2p), and magnesium (Mg 1s) indicate that compounds linked as oxides (CaO at 346.63 eV, MgO at 1304.12 eV), hydroxides ($\text{Mg}(\text{OH})_2$ at 1302.04 eV, NaOH at 1073.26 eV), aluminosilicates ($\text{Na}[\text{AlSi}_3\text{O}_8]$ at 1072.18 eV, chemical composition of albite), phosphates ($\text{Mg}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ at 1306.44 eV, Na_3PO_4 at 1069.79 eV), bicarbonates (NaHCO_3 at 1071.06 eV), carbonates (CaCO_3 at 347.08 eV and 348.61 eV, MgCO_3 at 1305.19 eV), chlorides (CaCl_2 at 347.85 eV), sulfates (CaSO_4 at 347.44 eV), and metallic magnesium at 1302.96 eV are present, and finally, iron (Fe 2p), the only transition metal, confirming the presence of Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , FeO, and FeOOH, at 710.97, 713.39, 709.99, and 712.16 eV, respectively.^{48,49}

Taking into account these results, a methodology to obtain information about the intramineral proteins, present in the dinosaur eggshells, could be developed since a study of the eggshell of a dinosaur carried out by μ -XANES determines the presence of a cluster formed by the S–S/S–H groups of L-cysteine. This could be an indication of the plausible presence of the proteins or of the remaining peptides that were isolated by the mineral phase.⁵⁰

CONCLUSIONS

The samples were optically observed determining that the eggshells of the unidentified ootaxon presented high similarities to the eggshells of the *Spheroolithus* (samples 1 and 2) and to the Lambeosaurinae (herbivorous dinosaurs), in terms of texture, roughness, and thickness. As for the coloration, the unidentified ootaxon looks more like *Spheroolithus* eggshells. However, colors are not entirely relevant when characterizing, as they can fluctuate during diagenesis. Using techniques such as SEM, we observed that the eggshells presented structures with different morphologies of sizes ranging from 0.5 to 50 μm , making it possible to identify the ornamentation, whereas the nonidentified ootaxon has nodes in the cuticle, characteristics that correspond to ornithopod eggshells. Furthermore, the mamillary cones observed in this eggshell are approximately cylindrical as those observed in *Spheroolithus* eggshells.

On the other hand, the eggshells are composed mainly of calcium, carbon, silicon, and oxygen. Other elements such as sodium, potassium, aluminum, and iron are also present in moderate concentration, but only on the surface level; however, traces of chromium, copper, zinc, and strontium, were determined internally. This variation in the composition of the eggshell, which is composed mainly of calcium carbonate (corroborated by XPS), is an indication that the eggshells underwent diagenetic changes, replacement, and recrystallization process during fossilization.

All of these analyses aimed at giving information about the elemental composition of the dinosaur eggshells collected in Mexico, contributing therefore to the paleontological research in the Americas, in the same way that has already been done in other continents. Furthermore, being able to determine whether an egg of an unidentified ootaxon of dinosaur corresponds either to a theropod or to an ornithopod dinosaur will be, without a doubt, a great contribution to the world of structural analysis of paleontological samples.

EXPERIMENTAL SECTION

Cleaning and Identification of Eggshell Surfaces. The eggshells were first washed with 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution for 30 min to remove the organic contamination present in the samples; then, they were washed with Milli-Q water and air-dried. After that, the corresponding sides of every eggshell were identified with an optical microscope SZH10 OLYMPUS and were placed on carbon tape to identify the external and internal sides of the eggshells. Once the sides were identified, we submitted the samples to the four different methodologies mentioned below.

Morphological Characterization by Scattering Electron Microscopy (SEM). For these analyses, we used an SEM-TESCAN VEGA 3 SB scanning electron microscope with a voltage of 15 keV in backscattering electrons (BSE). All samples were gold-coated to improve the conductivity. These samples were observed on both sides of the eggshell and radial section. The allocation of the side was carried out by observing the radial section of eggshells where the curvature was correctly appreciated. The thickness of each of the samples was obtained from the radial section SEM images using ImageJ software.

Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS) Mapping Using High-Resolution SEM (HRSEM). The analyses by HRSEM and EDS mapping were performed using a JEOL

JSM-7800F microscope with a 2 kX magnification to 15 keV. In the case of EDS, the process was finalized when the number of counts was in 2000, and for the mapping, the processing time was 4 min. The samples were used without gold coating.

Elemental Characterization by X-ray Fluorescence (XRF). For this technique, the samples were placed on a slide suitable for equipment use (after treatment) as it was previously described. We used an X-ray tube with Rh anode (potential difference, 30 keV; amperage, 250 μ A), located at an angle of 0° with respect to the normal of the sample. The irradiation time of each sample was 900 s. X-ray detection was mediated using an SDD detector (Amptek), located at an angle of 45° with respect to the normal of the sample. The detector resolution was 140 eV to 5.9 keV. The data obtained were analyzed by the QXAS software of the International Atomic Energy Agency. Accuracy was determined using analytical methods for geogenic materials published by Espinosa et al.³⁴

X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). K-Alpha Surface Analysis from Thermo was used, with a monochromatic AL K α line to 12 kV and 40 W of power at a relative angle of 30°. The general recognition was made using a neutralizer that generates a cloud of argon ions of 3 keV energy and 30 W power over the analyzed area. The spectra are obtained under two conditions: in a broad general scan (0–1350 V) with 1 eV/step and 100 eV of step energy, and in mode of small windows with 0.1 eV/step and 50 eV of step energy.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.0c03334>.

Images, graphics, and maps of the elemental composition of the eggshells by the energy-dispersive spectroscopy (EDS) as well as the possible standards. Also, the mass concentration of elements recorded in the dinosaur samples by X-ray fluorescence spectroscopy (XRF), their electron state, and binding energy by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS); analysis of the elemental composition of eggshell by scanning electron microscopy (SEM) and energy-dispersive spectroscopy (EDS) (Figures S1–S5); standards obtained by EDS according to the elemental composition present in the eggshells of the five dinosaurs (Table S1); analysis of energy-dispersive spectroscopy (EDS) mapping (Figures S6–S9); elemental analysis by X-ray fluorescence spectroscopy (XRF); mass concentration (mg kg^{-1}) of elements recorded in the dinosaur samples (Table S2); electronic state of the elements by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS); binding energy of electronic states of the elements presents in the *Spheroolithus* sample 1 eggshell obtained by XPS (Table S3); deconvoluted X-ray photoelectron spectra of the inner surface of the eggshell *Spheroolithus* sample 1, and tables showing the binding energies of each compound (Figure S10); compounds determined by deconvolution of XPS spectrum of the *Spheroolithus* eggshell (Table S4); binding energy of electronic states of the elements presents in the *Prismatoolithus* eggshell obtained by XPS (Table S5); X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra of the eggshell of the *Prismatoolithus* (external and inner surface); electronic state of some elements presented

in the eggshell surface corresponding to the observed by EDS and XRF (Figure S11); deconvoluted X-ray photoelectron spectra of the external surface of the eggshell *Prismatoolithus*; tables showing the binding energies of each compound (Figure S12); deconvoluted X-ray photoelectron spectra of the inner surface of the eggshell *Prismatoolithus*; tables showing the binding energies of each compound (Figure S13); and compounds determined by deconvolution of XPS spectrum of the *Prismatoolithus* eggshell (Table S6) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Abel Moreno – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México; orcid.org/0000-0002-5810-078X; Email: carcamo@unam.mx

Authors

Nerith R. Elejalde-Cadena – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

Jonathan S. Cabrera-Hernández – Posgrado en Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado UNAM, Ciudad Universitaria, Ciudad de México 04510, México

René Hernández-Rivera – Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.0c03334>

Author Contributions

The manuscript was designed and written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Carlos Raul Magaña from the Microscopy Laboratory of Physics Institute of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for taking the SEM-EDS data; Dr. Javier Miranda and B.Sc. Juan Carlos Pineda of the Aerosol Laboratory of Physics Institute of UNAM for taking XRF data; and Ing. William Javier Cauch for the XPS analyzes carried out at the National Laboratory of Nano and Biomaterials, CINVESTAV-IPN, financed by the projects FOMIX-Yucatán 2008-108160, CONACYT LAB-2009-01-123913, 292692, 294643, 188345 y 204822. N.R.E.-C. and J.S.C.-H. thank CONACYT (Registration No. 889262 and No. 1002773) for a scholarship for the Ph.D. program in Chemistry Sciences and Master program in Biological Sciences of UNAM and to the future Graphic Designer Michelle Dayana Betancourt Pardo for the design of Figure 1 corresponding to the parts of the eggshell and coloring the dinosaur illustrations in Figure 2 as well as the map of Figure 3. Two of the authors (A.M. and R.H.-R.) acknowledge the support from the DGAPA-PAPIIT project no. IG200218, PAPIIT no. IN100913 and IN103616 for this research. The authors acknowledge Antonia Sánchez-Marín for the English revision and grammar corrections.

REFERENCES

- (1) Cullen, T. M.; Longstaffe, F. J.; Wortmann, U. G.; Huang, L.; Fanti, F.; Goodwin, M. B.; Ryan, M. J.; Evans, D. C. Large-scale stable isotope characterization of a Late Cretaceous dinosaur-dominated ecosystem. *Geology* **2020**, *48*, 546–551.
- (2) Kuang, H.; Liu, Y.; Ning, Z.; Peng, N.; Xu, K. Cretaceous stratigraphy, paleoenvironment and terrestrial biota in Shandong Province. *Open J. Geol.* **2019**, *9*, 650–653.
- (3) Buckland, W. Notice on the Megalosaurus or great fossil lizard of stones field. *Trans. Geol. Soc. London* **1824**, *1*, 390–396.
- (4) Farlow, J. O.; Brett-Surman, M. K. *The Complete Dinosaurs*; Farlow, J. O.; Brett-Surman, M. K., Eds.; Indiana University Press: USA, 1997; Chapter 1 and 2.
- (5) Foulke, W. P. Remarks on fossil bones, shells, and wood, particularly historical remarks on the collection of Hadrosaurus foulkii Leidy. *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* **1859**, *10*, 213–215.
- (6) Prieto-Márquez, A.; Weishampel, D. B.; Horner, J. R. The dinosaur Hadrosaurus foulkii, from the Campanian of the East Coast of North America, with a reevaluation of the genus. *Acta Palaeontol. Pol.* **2006**, *51*, 77–98.
- (7) Case, J. A.; Martin, J. E.; Chaney, D. S.; Reguero, M.; Marensi, S. A.; Santillana, S. M.; Woodburne, M. O. The First duck-billed dinosaur (Family Hadrosauridae) from Antarctica. *J. Vertebr. Paleontol.* **2000**, *20*, 612–614.
- (8) Hammer, W. R.; Hickerson, W. J. A crested theropod dinosaur from Antarctica. *Science* **1994**, *264*, 828–830.
- (9) Lü, J.; Xu, L.; Liu, Y.; Zhang, X.; Jia, S.; Ji, Q. A new troodontid theropod from the Late Cretaceous of central China, and the radiation of Asian troodontids. *Acta Palaeontol. Pol.* **2010**, *55*, 381–388.
- (10) Lucas, S. G. *Dinosaurs: The Textbook*; 6th ed.; Lucas, S. G., Ed.; Columbia University Press: USA, 2016; Chapter 12.
- (11) Andrews, R. C. *The New Conquest of Asia: A Narrative of the Explorations of the Central Asiatic Expeditions in Mongolia and China 1921-30*; American Museum of Natural History: West Hartford, USA and New York, 1932.
- (12) Grellet-Tinner, G.; Chiappe, L.; Norell, M.; Bottjer, D. Dinosaur eggs and nesting behaviors: a paleobiological investigation. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2006**, *232*, 294–321.
- (13) Grellet-Tinner, G.; Sim, C. M.; Kim, D. H.; Trimby, P.; Higa, A.; An, S. L.; Oh, H. S.; Kim, T. J.; Kardjilov, N. Description of the first lithostrotian titanosaur embryo in ovo with Neutron characterization and implication for lithostrotian Aptian migration and dispersion. *Gondwana Res.* **2011**, *20*, 621–629.
- (14) Mikhailov, K. E. *Fossil and Recent Eggshell in Amniotic Vertebrates: Fine Structure, Comparative*; Palaeontological Association, 1997; pp 1–80.
- (15) Carpenter, K. *Eggs, Nests, and Baby Dinosaurs: A Look at Dinosaur Reproduction*; Carpenter, K., Ed.; Indiana University Press: USA, 1999; Chapter 5.
- (16) Tanaka, K.; Zelenitsky, D. K.; Williamson, T.; Well, A.; Therrien, F. Fossil eggshells from the Upper Cretaceous (Campanian) Fruitland Formation, New Mexico. *Hist. Biol.* **2011**, *23*, 41–45.
- (17) Jackson, F. D.; Varricchio, D. J. Fossil eggs and eggshell from the lowermost two medicine formation of western Montana, Sevenmile Hill Locality. *J. Vertebr. Paleontol.* **2010**, *30*, 1142–1156.
- (18) Barta, D. E.; Brundridge, K. M.; Croghan, J. A.; Jackson, F. D.; Varricchio, D. J.; Jin, X.; Poust, A. W. Eggs and clutches of the Spheroolithidae from the Cretaceous Tiantai Basin, Zhejiang province, China. *Hist. Biol.* **2014**, *26*, 183–194.
- (19) Xie, J. F.; Zhang, S. K.; Jin, X. S.; Li, D. Q.; Zhou, L. Q. A new type of dinosaur eggs from Early Cretaceous of Gansu Province, China. *Vertebr. Palasiat.* **2016**, *54*, 1–10.
- (20) Fernández, M. S.; Wang, X.; Vremir, M.; Laurent, N. D.; Kaiser, G.; Dyke, G. A mixed vertebrate eggshell assemblage from the Transylvanian Late Cretaceous. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, No. 1944.
- (21) Eagle, R. A.; Enriquez, M.; Grellet-Tinner, G.; Pérez-Huerta, A.; Hu, D.; Tütken, T.; Montanari, S.; Loyd, S. J.; Ramirez, P.; Tripathi, A. K.; Kohn, W. J.; Cerling, T. E.; Chiappe, L. M.; Eiler, J. M. Isotopic ordering in eggshells reflects body temperatures and suggest differing thermophysiology in two Cretaceous dinosaur. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, No. 8296.
- (22) Cojan, I.; Renard, M.; Emmanuel, L. Palaeoenvironmental reconstruction of dinosaur nesting sites base on a geochemical approach to eggshells and associated palaeosols (Maastrichtian, Provence Basin, France). *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2003**, *191*, 111–138.
- (23) Montanari, S.; Higgins, P.; Norell, M. A. Dinosaur eggshell and tooth enamel geochemistry as an indicator of Mongolian Late Cretaceous paleoenvironments. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2013**, *370*, 158–166.
- (24) Tullett, S. G. The Porosity of Avian Eggshells. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Physiol.* **1984**, *78*, 5–13.
- (25) Hincke, M. T.; Nys, Y.; Gautron, J.; Mann, K.; Rodríguez-Navarro, A. B.; McKee, M. D. The Eggshell: Structure, Composition and Mineralization. *Front. Biosci.* **2012**, *17*, 1266–1280.
- (26) Ramírez-Velasco, A. A.; Hernández-Rivera, R. Diversity of Late Cretaceous dinosaurs from Mexico. *Bol. Geol. Min.* **2015**, *126*, 63–108.
- (27) Aguillón-Martínez, M.; Zelenitsky, D. K.; Brikman, D.; Eberth, D. Eggshell fragments from the uppermost Cerro del Pueblo Formation (Upper Cretaceous; Mexico). *J. Vertebr. Paleontol.* **2004**, *24*, 33A.
- (28) Cabrera-Hernández, J. S. Descripción e identificación de cáscaras de huevo de dinosaurios fósiles y de dos dinosaurios perinatales de la formación El Gallo (Cretácico tardío) El Rosario, Baja California, México. Bachelor Dissertation, Universidad de Guadalajara: Jalisco, México, 2018.
- (29) Ramírez-Velasco, A. A.; Morales-Salinas, E.; Hernández-Rivera, R.; Tanke, D. R. Spinal and rib osteopathy in *Huehucanauhtlus tiquichensis* (Ornithopoda: Hadrosauroidae) from the Late Cretaceous in Mexico. *Hist. Biol.* **2016**, *29*, 208–222.
- (30) Gudíño-Maassán, J. L.; Aguilar, F. J.; Hernández-Rivera, R. Aplicación de fotogrametría digital para el registro de las huellas de dinosaurio de la Formación Cerro del Pueblo (Campaniano Tardío), Coahuila, México. *Bol. Soc. Geol. Mex.* **2018**, *70*, 307–324.
- (31) Torres-Rodríguez, E.; Montellano-Ballesteros, M.; Hernández-Rivera, R.; Benammi, M. Dientes de terópodos del Cretácico Superior del Estado de Coahuila, México. *Rev. Mex. Cienc. Geol.* **2010**, *27*, 72–83.
- (32) Fastovsky, D. E.; Clark, J. M.; Strater, N. H.; Montellano, M.; Hernández-Rivera, R.; Hopson, J. A. Depositional environments of a Middle Jurassic terrestrial vertebrate assemblage Huizachal Canyon, Mexico. *J. Vertebr. Paleontol.* **1995**, *15*, 561–575.
- (33) Ramírez-Velasco, A. A.; Hernández-Rivera, R.; Servín-Pichardo, R. *Hadrosaurids: The Hadrosaurian Record from Mexico*; Eberth, D. A.; Evans, D. C., Eds.; Indiana University Press: USA, 2014; Chapter 19.
- (34) Espinosa, A. A.; Miranda, J. Elemental Analysis of soils as possible resuspended dust sources in Mexico City. *J. Environ. Res.* **2013**, *7*, 1015–1020.
- (35) Moreno-Aranza, M.; Canudo, J. I.; Gasca, H. M. Unusual theropod eggshells from the Early Cretaceous Blesa formation of the Iberian Range, Spain. *Acta Palaeontol. Pol.* **2014**, *59*, 843–854.
- (36) Sellés, A. G.; Galobart, A. Reassessing the endemic European Upper Cretaceous dinosaur egg *Cairanoolithus*. *Hist. Biol.* **2016**, *28*, 583–596.
- (37) Grellet-Tinner, G. Membrana Testacea of titanosaurid dinosaur eggs from Auca Mahuevo (Argentina): Implications for exceptional preservation of soft tissue in Lagerstätten. *J. Vertebr. Paleontol.* **2005**, *25*, 99–106.
- (38) Kurzanov, S. M.; Mikhailov, K. E. *The Age of Dinosaur in Russia and Mongolia: Dinosaur Eggshells from the Lower Cretaceous of Mongolia*; Benton, M. J.; Shishkin, M. A.; Unwin, D. M.; Kurochkin, E. N., Eds.; Cambridge University Press: U.K., 1989; Chapter 28.
- (39) Dauphin, Y.; Cuif, J. P.; Salomé, M.; Susini, J.; Williams, C. T. Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 1761–1771.

- (40) Trubnikov, I. L.; Solov'ev, L. A.; Lupeiko, T. G. Synthesis of wollastonite in salt melts. *Glass. Ceram.* **1989**, *46*, 488–489.
- (41) Vichaphund, S.; Kitiwan, M.; Atong, D.; Thavorniti, P. Microwave synthesis of wollastonite powder from eggshells. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2011**, *31*, 2435–2440.
- (42) Flicstein, J.; Schieber, M. Micro segregation of impurities in hydrothermally grown quartz crystals. *J. Cryst. Growth.* **1974**, *24–25*, 603–609.
- (43) Marshall, D. B.; Wilson, C. J. L. Recrystallization and peristerite formation in albite. *Contrib. Mineral. Petrol.* **1976**, *57*, 55–69.
- (44) Alexander, G. L.; McMahon, S.; Matthews, J. J.; Still, J. W.; Brasier, A. T. Petrological evidence supports the death mask model for the preservation of Ediacaran soft-bodied organism in South Australia. *Geology* **2019**, *47*, 215–218.
- (45) Hoefler, H.; Strel, C.; Wobrasuchek, P.; Ovari, M.; Zaray, G. Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **2006**, *61*, 1135–1140.
- (46) Biesinger, M. C.; Payne, B. P.; Grosvenor, A. P.; Lau, L. W. M.; Gerson, A. R.; Smart, R. St.C. Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transitions metals, oxides and hydroxides: Cr, Mn, Fe, Co and Ni. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 2717–2730.
- (47) Thermo Scientific. XPS Simplified/Elements Table. <https://xpsimplified.com/periodictable.php> (accessed May 21, 2020).
- (48) Naumkin, A. V.; Kraut-Vass, A.; Gaarenstroom, S. W.; Powell, C. J. *NIST Standard Reference Database 20. NIST Standard Reference Database*, 2012.
- (49) Ferreira, F. V.; Souza, L. P.; Martins, T. M. M.; Lopes, J. H.; Mattos, B. D.; Mariano, M.; Pinheiro, I. F.; Valverde, T. M.; Livi, S.; Camilli, J. A.; Goes, A. M.; Gouveia, R. F.; Lona, L. M. F.; Rojas, O. J. Nanocellulose/bioactive glass cryogels as scaffolds for bone regeneration. *Nanoscale* **2019**, *11*, 19842–19849.
- (50) Legorreta-Flores, A.; Davila-Tejeda, A.; Velásquez-González, O.; Ortega, E.; Ponce, A.; Castillo-Michel, H.; Reyes-Grajeda, J. P.; Hernández-Rivera, R.; Cuéllar-Cruz, M.; Moreno, A. Calcium carbonate crystals shapes mediated by intramineral proteins from eggshell of ratite birds and crocodiles. Implications to the eggshell's formation of a dinosaur of 70 million years old. *Cryst. Growth. Des.* **2018**, *18*, 5663–5673.

Fractal Analysis of the Distribution and Morphology of Pores in Dinosaur Eggshells Collected in Mexico: Implications to Understand the Biomineralization of Calcium Carbonate

Nerith R. Elejalde-Cadena and Abel Moreno*



Cite This: *ACS Omega* 2021, 6, 7887–7895



Read Online

ACCESS |



Metrics & More

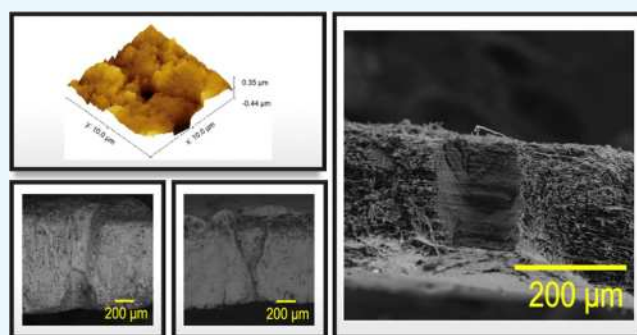


Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: In this work, we present an investigation of the surface area and roughness of different dinosaur eggshells of 70 million years old using fractal dimension analysis obtained from atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM) information. We also conduct qualitative analyses on the external and inner surfaces of eggshells, which are mainly composed of calcium carbonate. The morphological characteristics of both surfaces can be revealed by both SEM and AFM techniques. It is observed that the inner surface of the eggshell has greater roughness that increases the surface area due to the vaster number of pores compared to the external face, making, therefore, the fractal dimension also greater. The aim of this contribution is to identify the morphology of the pores, as well as the external and inner surfaces of the eggshells, since the morphology is very similar on both surfaces and will otherwise be difficult to determine with the naked eye by SEM and AFM. In addition, the sole AFM analysis is very complicated for these types of samples due to the intrinsic roughness. However, it needs additional methods or strategies to complete this purpose. This contribution used the fractal dimension to show the same behavior obtained in both SEM and AFM techniques, indicating the fractal nature of the structures.



1. INTRODUCTION

An egg is a mineralized structure that fulfills the function of protecting the embryo for its correct growth and development. It is divided into an organic phase (composed mainly of biomacromolecules as proteins) and an inorganic phase (composed mainly of calcium carbonate), and depending on the content of these phases, some eggs can be flexible (turtle eggs), semi-rigid (crocodile eggs) and rigid (chicken eggs). Among the species that are characterized by presenting rigid eggs, we find dinosaurs. Not only dinosaurs' eggs are known to be very rigid, but they are also known to be very thick. Like the other species, they have an inorganic phase called eggshell, developed through the formation of crystalline calcium carbonate (CaCO_3) units on the inner eggshell membrane (mamillary cone), initiating the formation of a very rigid structure called mineral palisade, giving way to the formation of pores, which fulfill the function of providing the embryo with a homeostatic medium.¹

The morphology exhibited by the crystalline units and the pores in the dinosaur eggshells allow us to discern between a variety of eggshells that belong to different species of dinosaurs. Regardless of the species and the type of eggshell, they fulfill the same functions: (1) protection and isolation of the embryo from the external environment, (2) gas exchange produced by respiration and metabolism of the embryo (input

of oxygen (O_2)), (3) exchange of water vapor, and (4) thermal exchange from inside to outside and vice versa.^{2,3}

According to Russu,⁴ the porosity of an eggshell depends on four factors: (1) the number of pores; (2) cross-sectional area; (3) length; (4) pore morphology; and in turn, its direct relation to the fractal dimension.⁵ In the eggshell of various species, pores between 0.01 and 1 mm have been observed, which, according to the IUPAC, are classified as macropores (>50 nm). As the pores are smaller and the number of pores contained in the eggshell increases, the specific superficial area of the system (area/volume ratio) also increases dramatically, and so does the roughness.

Fractals have been accepted to describe different natural systems and currently finding extensive application in diverse areas such as telecommunication technology,⁶ computer science,⁷ optical and electronic devices,^{8,9} and recent characterization of absorption capacity, porosity, and surface area,^{10,11} using atomic force microscopy (AFM),¹² scanning electron

Received: January 26, 2021

Accepted: March 3, 2021

Published: March 12, 2021



microscopy (SEM),^{11,13} chorioallantoic,¹⁴ extra-embryonic vessels,¹⁵ vascular networks,¹⁶ magnetic resonance images,¹⁷ among others. For example, random systems at the microscopic scale behave like fractals, i.e., their geometrical units resemble one another at all scales (at both low and high magnifications, similar features are identified). It, therefore, means that fractals are not sensitive to the scale of resolution and fractal analysis can be used to extract more information about a surface as compared to the conventional statistical methods. They argued that the presence of low-density regions (a network of pores) of surfaces with microstructures was the reason for the fractal behavior of thin surfaces. In rough surfaces, the fractal dimension is used as an analytical index to measure how the morphological features vary on scaling.^{18,19} The fractal analysis provides information on the roughness exponent, correlation length, and shift (or lattice size). These parameters offer a detailed description of spatial patterning, segmentation, texture, and lateral roughness of the surface morphology.^{20,21}

On the other hand, it is evident that the porous structures do not have an ordered arrangement in their structure, so it is not trivial to find one. For this, different methods have been developed for the fractal analysis of various systems. According to Mandelbrot:²² “Fractals can be intuitively defined as objects within objects or the repetition of the same objects at different scales”. There are two types of fractals: self-similarity and self-affinity. Self-similarity involves geometric objects whose shape does not change when magnifying at different scales; this means that these objects present regular fractals. Instant self-affinity tends to exist in various natural objects (though not always) that exhibit self-similarity only up to a certain level of magnification or only in certain portions of it,^{23,24} e.g., eggshells (Figure 1). The eggshell surface can be seen as a fractal object due to its roughness at different scales.

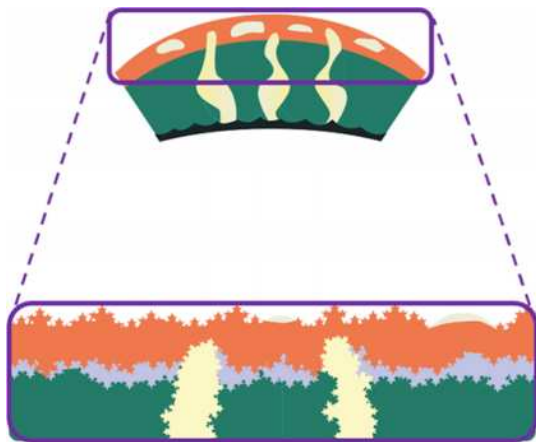


Figure 1. Representation of a typical eggshell surface with fractal behavior (Koch curve). The inset shows a zoom over the surface of the eggshells where the self-affinity is observed.

Of the different methods used to determine the fractal dimension, the most common is the box counting method, which uses a count of the minimum number of boxes N (of size h) necessary to fully cover a graph or figure (in two-dimensional (2D) (SEM) or three-dimensional (3D) (AFM)). The counting process is repeated for different values of h and $\log(N)$ is plotted as a function of $\log(1/h)$. The points obtained are approximated by the traditional method of least

squares to a straight line. By the definition of box counting, the fractal dimension is the limit of the ratio $\log(N)/\log(1/h)$ when h tends to zero. This value can be approximated to the magnitude of the slope of the line. Then, for each case, the number of boxes (N) covering the fractal features is counted, and this logarithm is plotted versus the size of boxes (h).^{24,25} The fractal dimension (D) is determined from the maximal slope coefficient of the double log plot defined as follow

$$D = \lim_{h \rightarrow 0} - \frac{\log N(h)}{\log h} \quad (1)$$

Due to the lack of information in the determination of the surface area and roughness of the samples of dinosaur eggshells using the box counting method, the eggshells of different species of dinosaurs that lived in the Late Cretaceous were studied to obtain the analysis of the fractal dimension in 2D and 3D using images obtained by scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM), respectively.

The aim of this contribution is to use the fractal dimension to show the same behavior obtained in both SEM and AFM techniques, indicating the fractal nature of the structures. This contribution will open the possibility of applying this methodology using other images as in the case of optical images for ancient samples, where growth patterns can be mathematically and structurally analyzed.

2. MATERIALS AND METHODS

These ancient eggshells of Late Cretaceous dinosaurs were collected in the coastal area of El Rosario, Baja California in Mexico.²⁶ These eggshells of different species of dinosaurs were first washed with 5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) with the aim of eliminating the organic membrane and then they were washed with Milli-Q water and air-dried. All samples were observed with an SZH10 OLYMPUS microscope on both sides to determine the corresponding sides of the eggshells. The thickness was sized using ImageJ software. For the SEM images, the samples were washed with 5% EDTA and Milli-Q water and then air-dried. We used a TESCAN VEGA 3 SB microscope with a voltage range of 10–20 kV at high vacuum at magnifications of 500 \times and 1000 \times . The SEM images at a magnification of 500 \times were observed with Digital Micrograph software to observe the size of the pores on both sides of the eggshells, while the images at a magnification of 1000 \times were converted into binary images using ImageJ software. The SEM images of the cross section were taken after the treatment of the samples using a sandpaper of 1500 grit with the aim of observing the pores. After that, the fractal dimension of binary images was determined using the box counting method. Then, a NanoScope V from Thermo was used for AFM. The images in three-dimensional color graphics were obtained using ScanAsyst-air tips in scan assist mode at different scanning rates with NanoScope 9.2 software, and the surface area, mean roughness, and fractal dimension of every sample were processed with Gwyddion software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

During the past years, fossils of different dinosaur species have been recorded in Mexico. Among these records is the collection of eggshells in the town of El Rosario, Baja California, corresponding to the Late Cretaceous (74 MY).

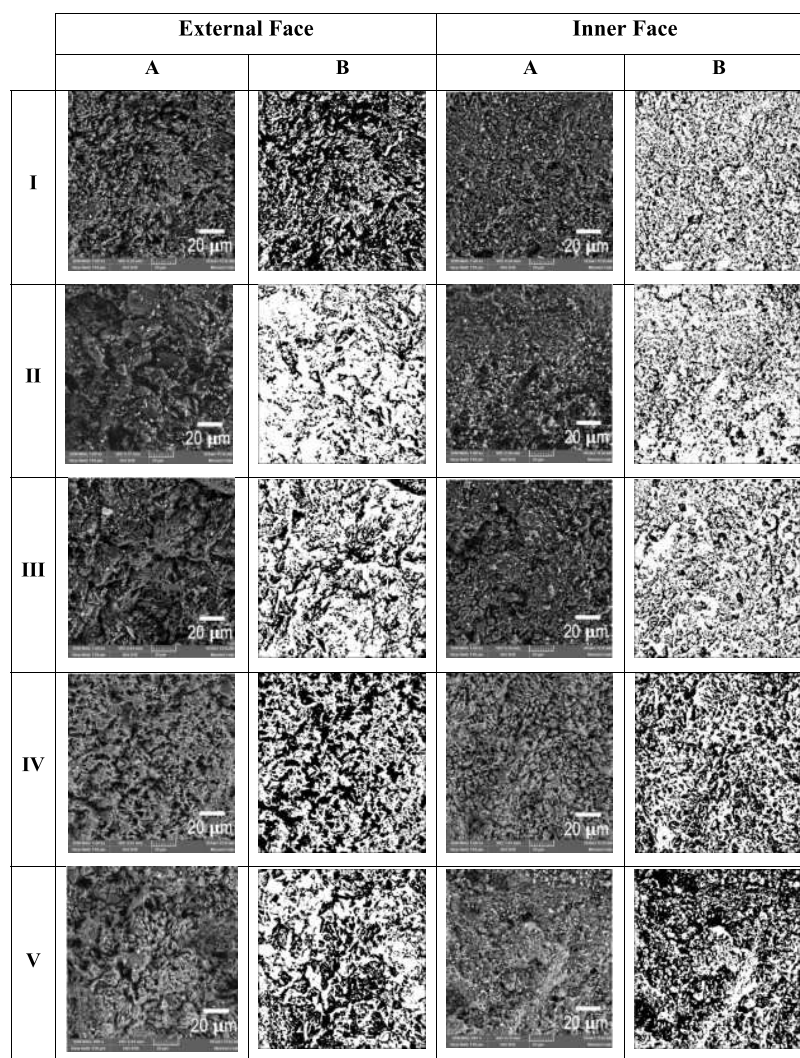


Figure 2. SEM images using box counting analysis. (A) SEM images at 1000 \times and (B) binary images. (I) *Spheroolithus* sample 1, (II) Lambeosaurinae eggshell, (III) *Spheroolithus* sample 2, (IV) *Prismatoolithus*, and (V) nonidentified ootaxon.

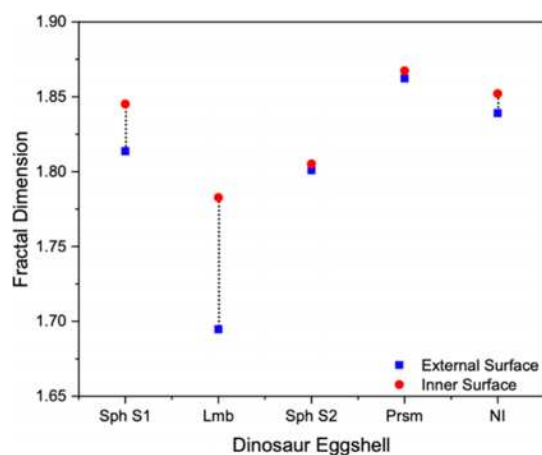


Figure 3. Fractal dimension based on eggshell SEM images. Sph S1: *Spheroolithus* sample 1, Lmb: Lambeosaurinae eggshell, Sph S2: *Spheroolithus* sample 2, Prsm: *Prismatoolithus*, and NI: nonidentified ootaxon. Fractal dimension (D) values are between 1.69 and 1.87.

Some samples of eggshells belong to ornithopod (herbivores) and theropod (carnivores) dinosaurs of the Hadrosauridae and Troodontidae families, respectively. Those of the Hadrosaur-

idae family correspond to the oogenus *Spheroolithus*, and the oogenus *Prismatoolithus* correspond to the Troodontidae family.²⁶ The prefixes “oo” (egg) and “oolithus” (stone egg) are added to differentiate oospecies, oogenus, and oofamilies of dinosaurs.^{27,28}

We analyzed two eggshells of the oogenus *Spheroolithus* (samples 1 (I) and 2 (III)); one of the family Lambeosaurinae (II), which is part of the Hadrosauridae family, with the oogenus nonidentified; one of the oogenus *Prismatoolithus* (IV); and one nonidentified ootaxon (V).

SEM images were taken from both sides of the eggshell to observe the homogeneity of the sample, witnessing larger structures on the external surface of the eggshell and superficial roughness, while for the inner surface, the observed structures are smaller, giving a smooth and homogeneous appearance compared to the external surface. In addition, using SEM images at 1000 \times , binary images were obtained to get information about the shape and size of the pores of the eggshells (dark areas, Figure 2B), which have different morphologies and sizes, being wider than those observed on the external face.

Based on the binary images, the fractal dimension was calculated (Figure 3) using a logarithm based on the

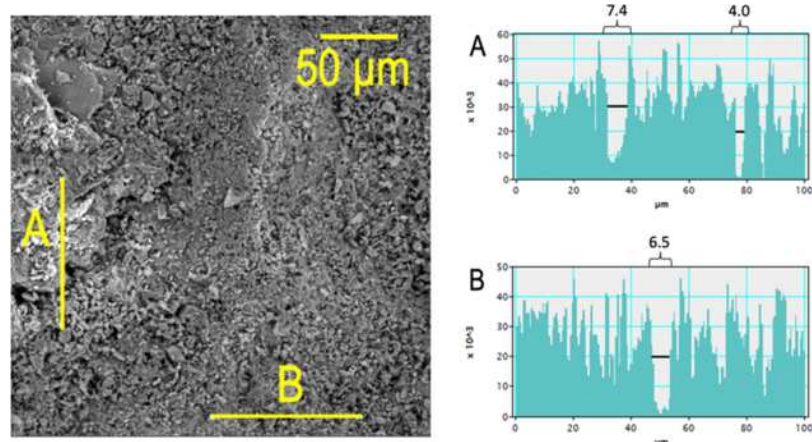


Figure 4. SEM images and roughness profile indicating the possible pores of the external face of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile.

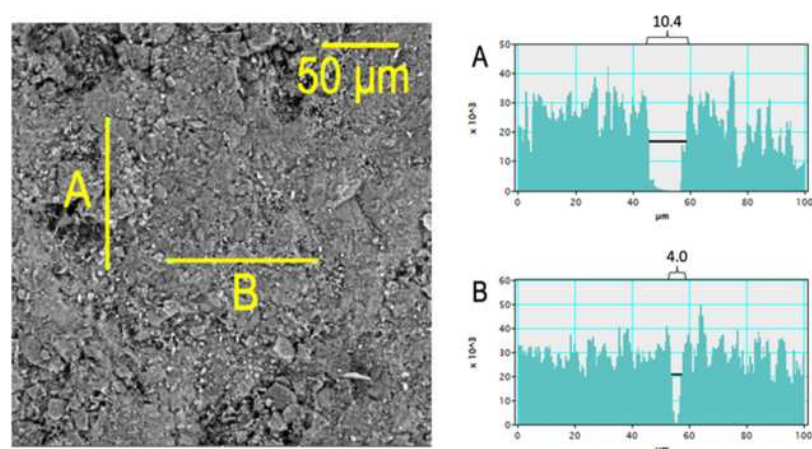


Figure 5. SEM images and roughness profile indicating the possible pores of the internal face of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile.

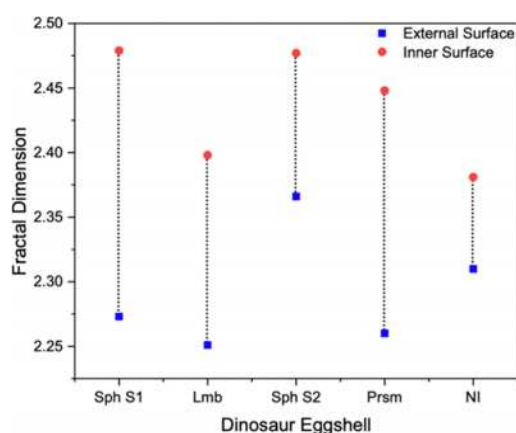


Figure 6. Fractal dimension based on AFM images. Sph S1: *Spheroolithus* sample 1, Lmb: Lambeosaurinae eggshell, Sph S2: *Spheroolithus* sample 2, Prsm: *Prismatoolithus*, and NI: nonidentified ootaxon. Fractal dimension (D) values are between 2.25 and 2.5, indicating high roughness.

relationship between the number of an empty box ($N(h)$) and the size of the box (h) (eq 1). The eggshells of the *Spheroolithus* sample 2 (Sph S2) and *Prismatoolithus* (Prsm) species present a similar pore-size distribution on both

surfaces, which could indicate that the pore has a unique entrance and exit, granting greater roughness, but not necessarily a high surface area, just like the one seen in the eggshell of the nonidentified ootaxon (NI). Instead of the other two eggshells, *Spheroolithus* sample 1 (Sph S1) and Lambeosaurinae (Lmb), the difference in roughness observed is greater, compared to the other three samples. This is probably due to wear caused by diagenetic changes during fossilization processes, which allowed the formation of large structures and the fragmentation of the same sample. This causes an increase in the roughness as well as in the hollow areas, interfering with the data, as it is mainly observed in the Lambeosaurinae eggshell (Lmb).

Due to the results obtained by calculating the fractal dimension, it was decided to determine the pore size observed from the SEM images (Figures 4 and 5), which were measured using Digital Micrograph software, where the pores on the inner surface are smaller in diameter than those observed on the external surface. This procedure was performed on all the five dinosaur eggshells (see the Supporting Information) and the same pattern was repeated.

An accurate analysis of the morphology and roughness of the surfaces as well as the calculation of the surface area and many other parameters can be obtained from atomic force microscopy (AFM); this technique is very accurate compared

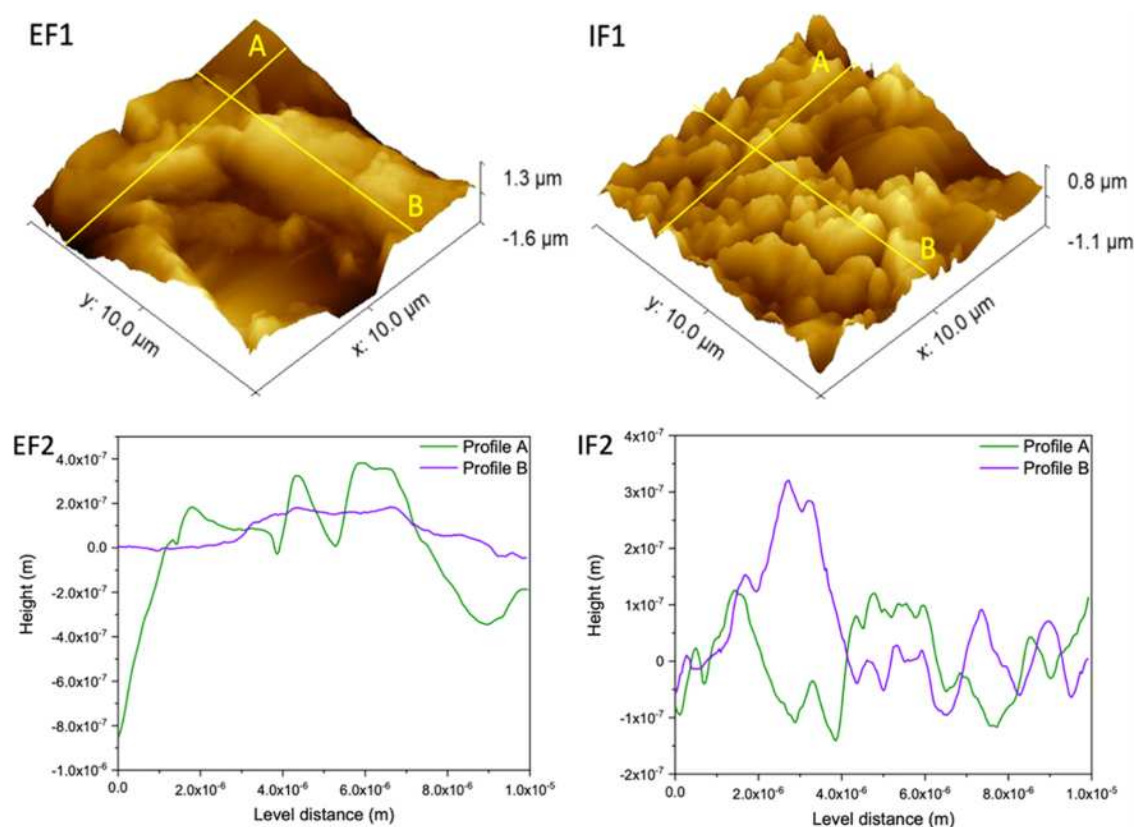


Figure 7. Topographies and profiles of the pore size of the surface of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1. EF: External surface and IF: inner surface. (1) AFM image and (2) profiles of the superficial structure. (A) Profile corresponding to the X-axis and (B) Profile corresponding to the Y-axis.

to SEM analysis, mainly when samples under analysis are not good conductors. A disadvantage in AFM occurs when the samples under study are very rough, making the interpretation of the results difficult, so other tools must be used for a good interpretation of the results. Such is the case of fractal analysis giving good statistical results to help the characterization of samples like those discussed in this work. The fractal dimension (between 2D and 3D) was determined using AFM images, and the results were similar to those obtained by SEM (fractal dimension between one-dimensional (1D) and 2D), where the inner surface presents a greater roughness. The values obtained between each of the phases are far from each other since with the fractal dimension in AFM, not only the surface but also the volume of the amount of matter present on the surface of the samples, is analyzed up to a few microns deep. According to Figure 6, the *Spheroolithus* eggshells (Sph S1 and S2) show greater roughness (fractal dimension 2D–3D close to 3) in general compared to the other species, followed by Lambeosaurinae (Lmb) and *Prismatoolithus* (Prsm) eggshells, and finally, the nonidentified ootaxon (NI), which presents low roughness on the external surface and decreases on the inner surface.

The roughness data can be confirmed with the profiles obtained from the topographies taken by AFM, where it can be seen that the inner surface presents greater roughness reflected in the variety of size of the observed structures (Figures 7-IF1 and 8-IF1), while the external one presents large structures, giving an almost smooth appearance to the surface (Figures 7-EF2 and 8-EF2), indicating that the formation of structures was a little more ordered and slower, allowing a low variation

in the size of the structures present on the surface. This behavior could be observed in the vertical and horizontal profiles (Figures 7 and 8) made on both surfaces of each eggshells (for other species, see the Supporting Information). In addition, for the Lambeosaurinae eggshell (Figure S9-IF1), it was possible to capture the topography of a pore with a diameter of approximately $1.5 \mu\text{m}$.

Finally, the roughness was confirmed by calculating the surface area of each eggshell (Figure 9). It is indeed confirmed that the inner surface is rougher, presenting a relationship with the size of the pores determined by SEM images that the larger the pore diameter the less the roughness present on the surface. Therefore, the relationship between the surface area and the fractal dimension is directly proportional (Figure 10).

The results are an indication that the structures and pores present in the inner surface of the eggshells are smaller; however, when they are found in abundance, they increase the roughness. This conclusion was corroborated through the analysis of the distribution of the pores using the binary images obtained from SEM, which were analyzed using ImageJ software, for all of the samples under study (Figure 11). From these images, the range of the pore diameter was determined for the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1 (Figure 11, black); it presented in the external surface pores with diameters between 1.1 and $1.3 \mu\text{m}$ (Figures 11-1A), while on the inner surface, the pore size was smaller with approximately a diameter of $1 \mu\text{m}$ (Figures 11-1B). Similar results were obtained from the eggshells of Lambeosaurinae (Figure 11, red) and *Spheroolithus* sample 2 (Figure 11, blue),

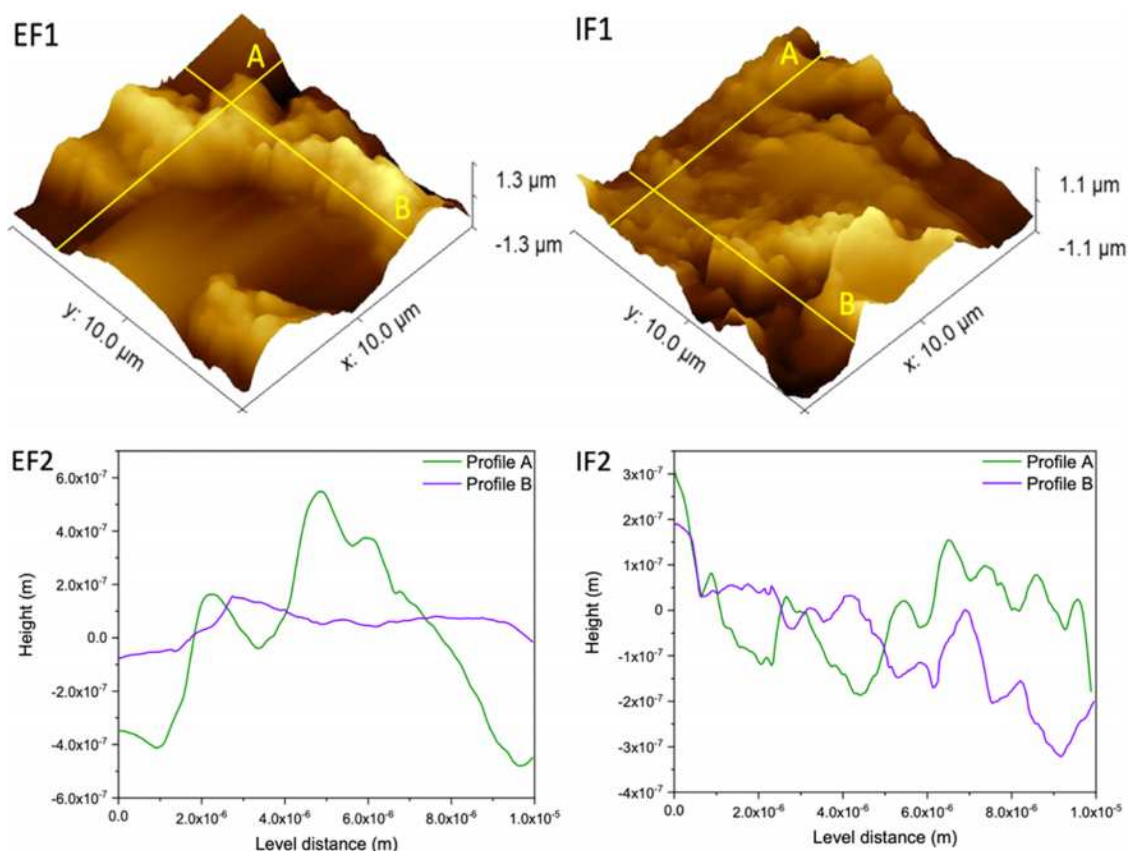


Figure 8. Topographies and profiles of the pore size of the surface of the *Pristatoolithus* eggshell. EF: External surface and IF: inner surface. (1) AFM image and (2) profiles of the superficial structure. (A) Profile corresponding to the X-axis and (B) profile corresponding to the Y-axis.

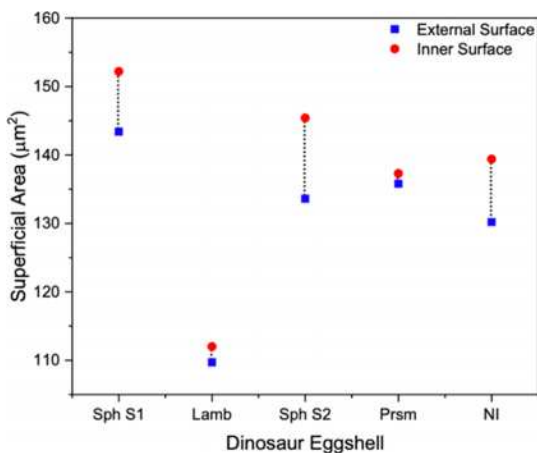


Figure 9. Surface area based on AFM images. Sph S1: *Spheroolithus* sample 1, Lmb: Lambeosaurinae eggshell, Sph S2: *Spheroolithus* sample 2, Prsm: *Pristatoolithus*, and NI: nonidentified ootaxon. For tabulated data, see Table S2.

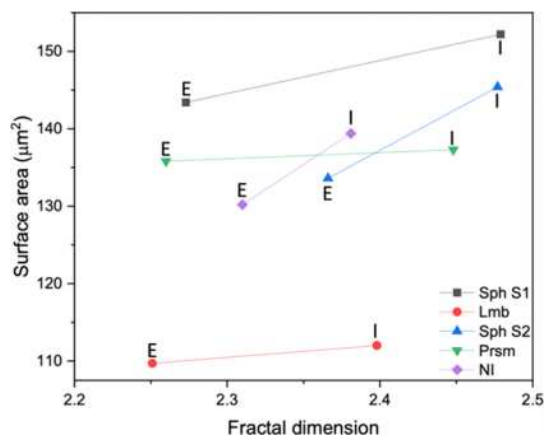


Figure 10. Correlation between the fractal dimension and the surface area of the dinosaur eggshells under study. (E) External surface, (I) inner surface. Sph S1: *Spheroolithus* sample 1, Lmb: Lambeosaurinae eggshell, Sph S2: *Spheroolithus* sample 2, Prsm: *Pristatoolithus*, and NI: nonidentified ootaxon.

with the difference that the latter presented bigger pores on the external surface compared to the other two species.

While *Pristatoolithus* (Figure 11, green) and unidentified ootaxon (Figure 11, purple) presented values of approximately 1–2 and 1.3–1.8 μm for the external surface and 1.8–2.2 and 1.2–1.5 μm for the inner surface, respectively, being the largest in diameter.

These values, compared to those reported by Carpenter (Table 1),²⁹ are consistent despite the fossilization processes,^{30,31} such as recrystallization of calcium carbonates

pedogenic³² or hydrothermal fluids caused mainly by volcanism,³³ which induced the formation of irregular structures, not typical of the eggshell that adhered to the surfaces, causing the deformation of the eggshell microstructures (crystalline aggregates), which hinders the visibility of the pores or the total coverage of them. This same fact increases the roughness value, increasing the surface area of both surfaces of the eggshell with the passing of the years.

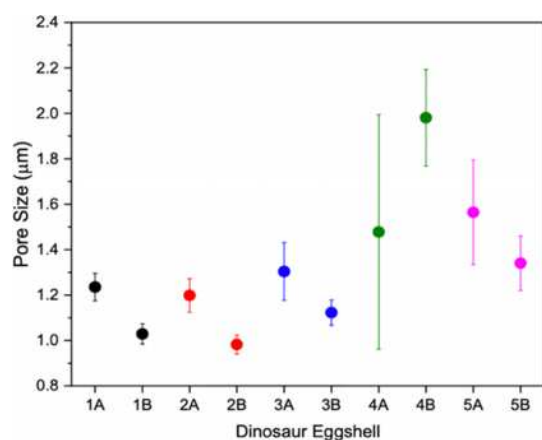


Figure 11. Pore distribution using ImageJ of the eggshell of the dinosaur eggshell under study. (A) External surface and (B) inner surface. (1) *Spheroolithus* sample 1 (black), (2) Lambeosaurinae eggshell (red), (3) *Spheroolithus* sample 2 (blue), (4) *Prismatoolithus* (green), and (5) nonidentified ootaxon (purple).

In addition, the morphology of the pores of each of the eggshells under study was observed, which is related to the pore size determined in Figure 6. Figure 12A corresponding to the *Spheroolithus* sample 1 presents a pore with a diameter of approximately 200 μm , with a larger cavity on the external surface of the inner one. The Lambeosaurinae eggshell (Figure 12B), which despite having a slightly narrower diameter, presents a morphology similar to that observed in the *Spheroolithus* sample 1, and following Carpenter's theory, the appropriate pore for these two samples is tubocanalliculate (Figure 13B) with a canal size of 0.5–0.2 mm. In addition, *Spheroolithus* sample 2, which belongs to the same family as the two previous species, presents a difference in the morphology and pore size (Figure 12C). In this case, the pore has a diameter of approximately 100 μm , which corresponds to multicanalliculate (Figure 13C) with a canal size of 0.1–0.3 mm. Both the tubocanalliculate and multicanalliculate pores show a high exchange with the environment due to the conditions in which the eggs were found at the time of deposition, which would be humid environments, with or without sunlight. On the other hand, another type of pore is observed in *Prismatoolithus* and unidentified ootaxon (Figure 12D,E), where the observed pore is prolatocanalliculate (Figure 13D), which is characterized by having a diameter and a variable morphology, as well as the environment in which the eggs were deposited.

Subsequently, the pores of the eggshells of current species such as ostrich, emu, and crocodile (Figure 12) were determined to observe the variability of the pores in other species. Ostrich and emu (Figure 12F,G), species that correspond to the same family, have pores with different

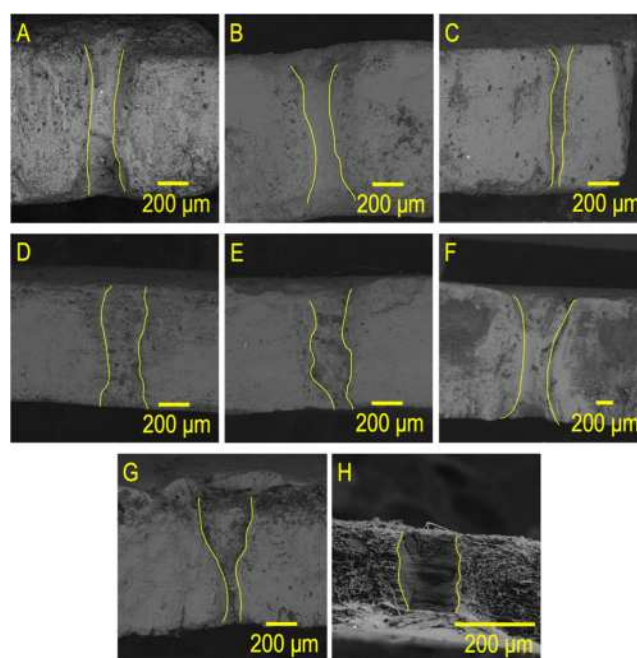


Figure 12. Morphology of the pores of the dinosaur eggshells under study and the phylogenetically related species. (A) *Spheroolithus* sample 1, (B) Lambeosaurinae eggshell, (C) *Spheroolithus* sample 2, (D) *Prismatoolithus*, (E) nonidentified ootaxon, (F) ostrich, (G) emu, and (H) crocodile.

morphologies. This result can be taken as evidence to indicate that the morphology of the pores is not related to the species of the same family. At the same time, the ostrich and crocodile eggshells (Figure 12F,H) present a similarity with the *Spheroolithus* sample 1 and Lambeosaurinae eggshells. On the other hand, the pores observed in the emu eggshell have a rimocanalliculate morphology (Figure 13E), which is characterized by having a funnel shape with an external diameter much greater than the internal diameter. This type of pore is suitable for depositions in dry environments.

4. CONCLUSIONS

The correlation of information obtained between the two techniques used (SEM and AFM), using the analysis of the fractal dimension by the box counting method, allowed us to determine the morphology of the structures present on the surface as well as the size of the pores from the binary images (black areas) and the morphology of the pores from the cross-sectional images. In addition, it was identified that the pores on the inner surface of the eggshell have pores of smaller diameters, favoring the formation of smaller structures and therefore giving greater roughness and surface area, evidencing the relationship between the fractal dimension (1D and 2D) and the surface area.

Table 1. Distribution of Every Pore Presents in the Eggshell of Dinosaurs²⁹

pore name	canal size (mm)	abundance (mm ²)	exchange	environment
angusticanalliculate	0.01–0.1	3–20/100	less	dried
tubocanalliculate	0.5–0.2	400–500/100	high	buried in humid mounds
multicanalliculate	0.1–0.3	600–1000/100	high	humid mounds
prolatocanalliculate	0.05–1	30–150/100	moderate	varied
rimocanalliculate	0.01–0.03	undefined	undefined	dried
obliquicanalliculate	undefined	undefined	undefined	undefined

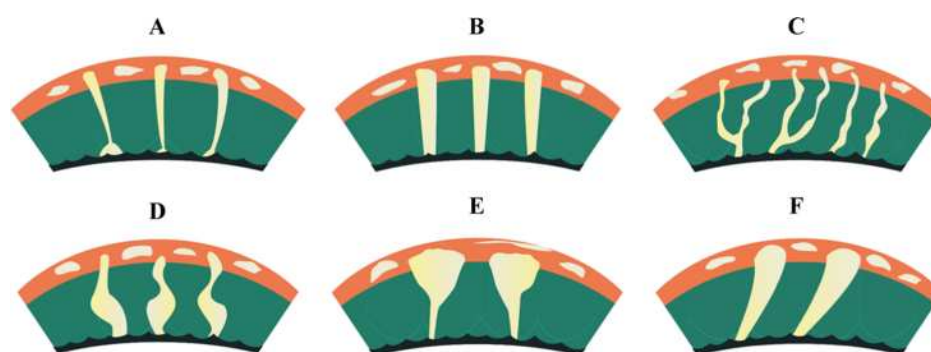


Figure 13. Design of the pores present in dinosaur eggshells. (A) Angusticanaliculate, (B) tubocanaliculate, (C) multicanaliculate, (D) prolatoanaliculate, (E) rimocanaliculate, and (F) obliquicanaliculate.²⁹

These analyzes were developed with the purpose of obtaining information about the distribution of the pores and roughness of the eggshells of dinosaurs, contributing to research focused on the analysis of surfaces that present a certain degree of roughness and fractality in different materials. Furthermore, identifying the external and inner surfaces of fossilized eggshells, using methods that are available to everyone, could be a great contribution to the paleontology area, mainly because this methodology could be applied to images that are easier to acquire, such as optics.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.1c00478>.

SEM and AFM images to determine the roughness and fractal dimension on both surfaces of the eggshells; determination of porosity and pore size by scattering electron microscopy (SEM) and atomic force microscope (AFM) (S.1); fractal dimension of both surfaces of the eggshells of dinosaurs using SEM binary images and AFM images (Table S1); SEM images and roughness profile indicating the pore of the external surface of the Lambeosaurinae eggshell. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S1); SEM images and roughness profile indicating the pore of the inner surface of the Lambeosaurinae eggshell. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S2); SEM images and roughness profile indicating the pore of the external surface of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S3); SEM images and roughness profile indicating the pore of the inner surface of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S4); SEM images and roughness profile indicating the pore of the external surface of the *Prismatoolithus* eggshell. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S5); SEM images and roughness profile indicating the pore of the inner surface of the *Prismatoolithus* eggshell. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S6); SEM images and roughness profile indicating the pore of the external surface of the eggshell of the nonidentified ootaxon. (A) Vertical profile and (B) horizontal profile (Figure S7); SEM images and roughness profile indicating the pore of the inner surface of the eggshell of the nonidentified ootaxon. (A) Vertical profile and

(B) horizontal profile (Figure S8); topographies and profiles of the pore size of the surface of the Lambeosaurinae eggshell. (EF) External surface and (IF) inner surface. (1) AFM image and (2) profiles of the superficial structure. (A) Profile corresponding to the X-axis and (B) profile corresponding to the Y-axis (Figure S9); topographies and profiles of the pore size of the surface of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2. (EF) External surface and (IF) inner surface. (1) AFM image and (2) profiles of the superficial structure. (A) Profile corresponding to the X-axis and (B) profile corresponding to the Y-axis (Figure S10); topographies and profiles of the pore size of the surface of the eggshell of the nonidentified ootaxon. (EF) External surface and (IF) inner surface. (1) AFM image and (2) profiles of the superficial structure. (A) Profile corresponding to the X-axis and (B) profile corresponding to the Y-axis (Figure S11); and superficial area and mean roughness of dinosaur eggshells based on AFM images (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Abel Moreno – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México; orcid.org/0000-0002-5810-078X; Email: carcamo@unam.mx

Author

Nerith R. Elejalde-Cadena – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acsomega.1c00478>

Author Contributions

The manuscript was designed and written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

One of the authors (N.R.E.-C.) thanks CONACYT (Registration no. 889262) for the scholarship for the Ph.D. program in Chemistry Sciences of Universidad Nacional Autónoma de México and to the Graphic Designer Michelle Dayana Betancourt Pardo for the design of Figures ¹ and ¹³,

corresponding to the types of the pores and representation of the Koch curve. One of the authors (A.M.) acknowledges DGAPA-UNAM project PAPIIT IG200218 for the support of this research. The authors acknowledge Antonia Sánchez-Marín for the English style correction and grammar revision of this contribution.

REFERENCES

- (1) Barret, P. M.; Canudo, J. I.; Coria, R. A.; Chiappe, L. M.; Galobart, A.; Moratalla, J. J.; Pereda, X.; J. de Ricqlès, A.; Royo-Torres, R.; Sanz, J. L.; Weishampel, D. B.; Zhou, Z. *Los dinosaurios en el siglo XX. Nuevas Respuestas al Inagotable Enigma de los Dinosaurios*; Metatemas Tusquets Co Pte Ltd: Barcelona, 2007.
- (2) Romanoff, A. L.; Romanoff, A. J. *The Avian Egg*; John Wiley & Sons Co Pte Ltd: New York, 1963.
- (3) Board, R. G. Properties of avian eggshells and their adaptive value. *Biol. Rev.* **1982**, *57*, 1–28.
- (4) Russu, M. V.; Gheorghiu, S. Fractal-like Features of Dinosaur Eggshells. In *Fractals in Biology and Medicine*; Losa, G. A.; Merlini, D.; Nonnenmacher, T. F.; Weibel, E. R., Eds.; CRC Press: Springer, 2005; pp 245–256.
- (5) Peng, C.; Zou, C.; Yang, Y.; Zhang, G.; Wang, W. Fractal analysis of high rank coal from southeast Qinshui basin by using gas adsorption and mercury porosimetry. *J. Pet. Sci. Eng.* **2017**, *156*, 235–249.
- (6) Karhana, M.; Kumar, R. A review on fractal antenna. *Int. J. Eng. Res. Technol.* **2017**, *5*, 1–4.
- (7) Sala, N. Fractals, Computer Science and Beyond. In *Complexity Science, Living Systems, and Reflexing Interfaces: New Models and Perspectives*; Orsucci, F.; Sala, N., Eds.; CRC Press: Hershey, 2012.
- (8) Graydon, O. A light ride to the stars. *Nature* **2019**, *13*, 227–228.
- (9) Fan, J. A.; Yeo, W. H.; Su, Y.; Hattori, Y.; Lee, W.; Jung, S. Y.; Zhang, Y.; Liu, Z.; Falgout, L.; Bajema, M.; Coleman, T.; Gregoire, D.; Larsen, R. J.; Huang, Y.; Rogers, J. A.; Cheng, H. Fractal design concepts for stretchable electronics. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, No. 3266.
- (10) Tao, S.; Pan, Z.; Chen, S.; Tang, S. Coal seam porosity and fracture heterogeneity of marcolithotypes in the Fanzhuang Block souther Qinshui Basin, China. *J. Nat. Gas Sci. Eng.* **2019**, *66*, 148–158.
- (11) Zhang, K.; Wang, S. Determination of the box-counting fractal dimension of pore distribution in eggshell based on scanning electron microscopy image analysis. *Adv. Mater. Res.* **2012**, *341–342*, 776–779.
- (12) Bramowicz, M.; KŁysz, S. Application of atomic force microscopy (AFM) in the diagnosis of a surface layer. *Res. Works Air Force Inst. Technol.* **2007**, *22*, 167–174.
- (13) Smith, T. G., Jr.; Lange, G. D.; Marks, W. B. Fractal methods and results in cellular morphology—dimensions, lacunarity and multifractals. *J. Neurosci. Methods* **1996**, *69*, 123–136.
- (14) Chan, Y. K.; Yu-Siw, L.; Meng-Hsiun, T.; Mao-Hsiang, C. Vessel box counting dimension of chicken chorioallantoic images. *Int. J. Comput. Consum. Control* **2016**, *5*, 26–40.
- (15) Borba, F. K. S. L.; Loos Queiroz Felix, G.; Ventura Lola Costa, E.; Silva, L.; Dias, P. F.; Albuquerque Nogueira, R. Fractal analysis of extra-embryonic vessels of chick embryos under the effect of glucosamine and chondroitin sulfates. *Microvasc. Res.* **2016**, *105*, 114–118.
- (16) Mancardi, D.; Varetto, G.; Bucci, E.; Maniero, F.; Guiot, C. Fractal parameters and vascular networks: facts & artifacts. *Theor. Biol. Med. Modell.* **2008**, *5*, No. 12.
- (17) Mansoor, M. S.; Oghabian, M. A.; Homayoun, A.; Shahbabaie, A. Analysis of resting-state fMRI topological graph theory in methamphetamine drug users applying box-counting fractal dimension. *Basic Clin. Neurosci.* **2017**, *8*, 371–386.
- (18) Li, J.; Du, Q.; Sun, X. An improved box-counting method for image fractal dimension estimation. *Pattern Recognit.* **2009**, *42*, 2460–2469.
- (19) Bouda, M.; Caplan, J. S.; Saiers, J. E. Box-counting dimension revisited: Presenting an efficient method of minimizing quantization error and an assessment of the self-similarity of structural root systems. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, No. 149.
- (20) Blenkinsop, T. G. In *Applications of fractal geometry to mineral exploration*, SEG Predictive Mineral Discovery Under Cover: Extended Abstracts, 2004; pp 158–161.
- (21) Soumya, S.; Swapna, M. S.; Raj, V.; Pillai, M.; Sankararaman, S. Fractal as a potential tool for surface morphology of thin films. *Eur. Phys. J. Plus* **2017**, *132*, No. 551.
- (22) Mandelbrot, B. B. *The Fractal Geometry of Nature*; Henry Holt & Company Co Pte Ltd: New York, 2010.
- (23) Xia, Y.; Cai, J.; Wei, W.; Hu, X.; Wang, X.; Ge, X. A new method for calculating fractal dimensions of porous media based on pore size distribution. *Fractals* **2018**, *26*, No. 1850006.
- (24) Nair, G. G.; Nair, A. S. Fractality of numeric and symbolic sequences. *IEEE Potentials* **2010**, *29*, 36–39.
- (25) Liu, Y.; Chen, L.; Wang, H.; Jiang, L.; Zhang, Y.; Zhao, J.; Wang, D.; Zhao, Y.; Song, Y. An improved differential box-counting method to estimate fractal dimension of gray-level images. *J. Vis. Commun. Image R.* **2014**, *25*, 1102–1111.
- (26) Elejalde-Cadena, N. R.; Cabrera-Hernández, J. S.; Hernández-Rivera, R.; Moreno, A. Searching for a Clue to Characterize a Crystalline Dinosaur's Eggshell of Baja California, Mexico. *ACS Omega* **2020**, *5*, 25936–25946.
- (27) Mikhailov, K. E. Special Papers in Palaeontology. In *Fossil and Recent Eggshell in Amniotic Vertebrates: Fine Structure, Comparative Morphology and Classification*, Mikhailov, A., Ed.; CRC Press: Wiley, London, 1997; p 80.
- (28) Mikhailov, K. E.; Bray, E. S.; Hirsch, K. F. Paratoxonomy of fossil eggs remains (Vetevovata): Principles and application. *J. Vertebr. Paleontol.* **1996**, *16*, 763–769.
- (29) Carpenter, K. *Eggs, Nets, and Baby Dinosaurs. A Look at Dinosaur Reproduction*, Farlow, J. O., Ed.; CRC Press: Indiana University: Indiana, 1999; p 141.
- (30) Tarhan, L. G.; Hood, A. V. S.; Droser, M. L.; Gehling, J. G.; Briggs, D. E. G.; Gaines, R. R.; Robbins, L. J.; Planavsky, N. J. Petrological evidence supports the death mask model for the preservation of Ediacaran soft-bodied organism in South Australia. *Geology* **2019**, *47*, No. e473.
- (31) Suarez, C. A.; Kohn, M. J. Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: review. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2020**, *268*, 277–295.
- (32) Kim, C. B.; Al-Aasm, I. S.; Ghazban, F.; Chang, H. W. Stable Isotopic composition of dinosaur eggshells and pedogenic carbonates in the upper cretaceous seonso formation, South Korea: Paleoenvironmental and diagenetic implications. *Cretaceous Res.* **2009**, *30*, 93–99.
- (33) Sharp, Z. *Principles of Stable Isotope Geochemistry*; Pearson Prentice Hall Co Pte Ltd: Michigan, 2007.

Molecular Analysis of the Mineral Phase and Examination of Possible Intramineral Proteins of Dinosaur Eggshells Collected in El Rosario, Baja California, Mexico

Nerith Rocío Elejalde-Cadena, José Octavio Estevez, Vicente Torres-Costa, María Dolores Ynsa-Alcalá, Gastón García-López, and Abel Moreno*



Cite This: *ACS Earth Space Chem.* 2021, 5, 1552–1563



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



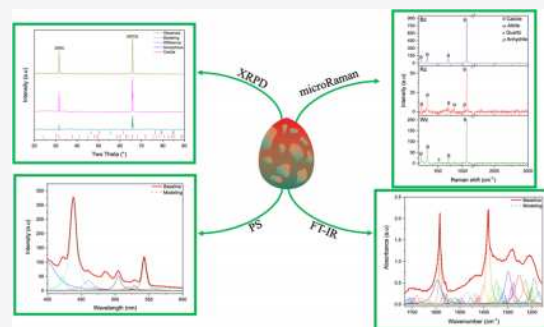
Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: We performed a molecular analysis of dinosaur's eggshells collected in El Rosario, Baja California, using techniques such as Raman spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray powder diffraction (XRPD), and photoluminescence spectroscopy (PS). These techniques allowed us to identify calcite as the main mineral. The crystalline planes corresponding to this mineral were obtained with a hexagonal unit cell by Rietveld refinement. In addition, six crystallographic planes corresponding to quartz were identified by XRPD, with a rather large crystallite size compared to those obtained from calcite and albite. For this latter mineral, found in a low content, we were able to identify only three crystalline planes and three wavelengths of photoluminescence and micro-Raman signals at a very low intensity. In addition, the analysis by FT-IR allowed us to identify bands corresponding to nine amino acids and the components of the secondary structure that might very well be some ancestral proteins that had been conserved for so long, thanks to the mineralized structure. This type of structural characterization together with the optical one is a very relevant contribution to the field of paleontological research, mainly because these types of samples are unique in their type due to the biological relevance in Mexico that will allow us to understand the species that became extinct millions of years ago.

KEYWORDS: dinosaur eggshells, Late Cretaceous, amino acids, secondary structure, molecular composition, Baja California



1. INTRODUCTION

Recent characterization of dinosaur fossils has allowed us to advance in the classification and identification of species that had been on the face of earth for more than 65 million years ago. Several species have been collected in different localities in Canada, the United States,^{1–4} and in Mexico, where the first report of a dinosaur bone corresponding to the Upper Cretaceous was found in 1926 by Janensch.⁵ From this discovery, the boom in finding other species gradually increased.

Geochemical analysis of fossilized materials, such as teeth, bones, and eggshells, has been performed to determine the paleoenvironmental conditions and the diagenetic changes carried out over the years. From fossilized dinosaur bones collected in the Morrison Formation in Utah, subparallel francolite crystals $(\text{Ca}, \text{Mg}, \text{Sr}, \text{Na})_{10}(\text{PO}_4, \text{SO}_4, \text{CO}_3)\text{Fe}_{2-3}$ with a size ranging from 10 to 40 nm wide have been characterized, with an elongation in the direction of the *c*-axis. This elongation is observed in crystals that grew in the cracks of the material during the diagenetic processes, forming structures up to 250 nm long.⁶

Dinosaurs' bones and teeth have been tested by isotopic studies and micro-Raman, FT-IR, XRF, and XRD analysis of the chemical and mineralogical composition as well as the determination of the crystallite size. These measurements were performed to identify the fossilization and/or precipitation processes caused by biological mechanisms and diagenetic and thermal alterations. Additionally, these studies even investigated changes in the chemical composition, observed through the formation of minerals such as apatite, hematite, calcite, quartz, among others, as well as their relationship with organic molecules present in the samples.^{7–10}

On the other hand, in Sauropod dinosaur eggshells, molecular analysis by FT-IR, XRD, and Raman spectroscopy, indicate that the eggshells are composed not only of calcite,¹¹ and carbon

Received: March 23, 2021

Revised: May 26, 2021

Accepted: May 27, 2021

Published: June 8, 2021



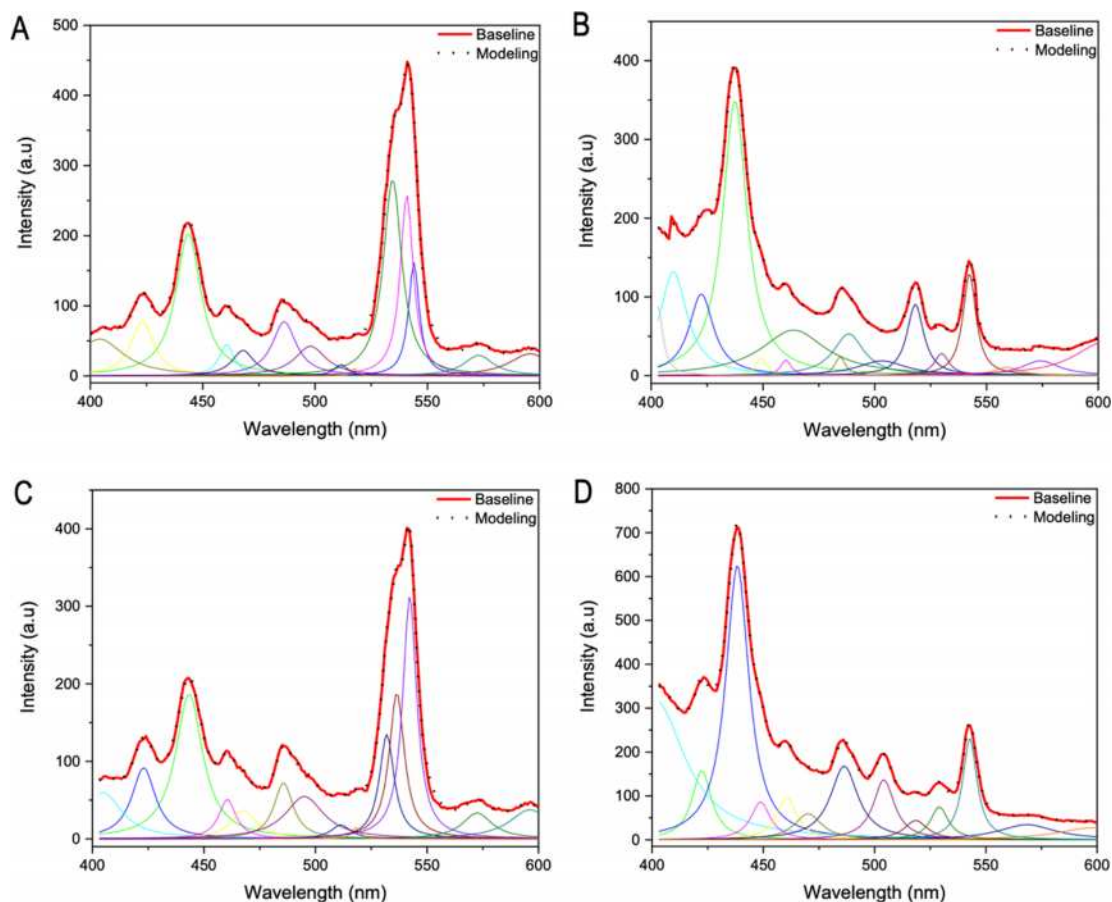


Figure 1. Photoluminescence of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1 on (A, B) external and (C, D) inner surfaces at (A, C) $\lambda = 250$ nm and (B, D) $\lambda = 370$ nm excitation energies.

either in the form of graphite or amorphous, but also of carbohydrate and sulfate compounds such as hydroxyapatite,¹² as evidenced in a Late Cretaceous archosaur's eggshell collected in South Korea.^{13,14} In addition, other studies carried out on eggshells from other eras have shown that the diagenetic changes not only affect the composition but also the mineralized structure, which are evidenced by craters formed by reabsorption at the bases of crystalline units.¹⁵

These discoveries lead to studies on evolution, microenvironments, behaviors, pathologies, and anatomical variation that dinosaurs might have had. Unfortunately, there are few reports of findings related to eggs and there is no information about studies of the molecular analysis of dinosaur eggshells of the Theropod and Hadrosauridae families collected in Mexico. Therefore, the aim of this work is to show the mineral composition of eggshells of different species of dinosaurs corresponding to the Late Cretaceous like the oospecies *Spheroolithus* (samples 1 and 2), Lambeosaurinae, *Prismatoolithus*, and one nonidentified ootaxon, using different techniques such as FT-IR, micro-Raman, FS, and XRPD.

2. EXPERIMENTAL SECTION

Samples were washed with a 5% EDTA solution for 30 min to eliminate the membrane residues and impurities present in the eggshells, again washed with Milli-Q water and air-dried. The

inner and external sides of the samples were discriminated using an SZH10 Olympus optical microscope and they were deposited on carbon tape to preserve the orientation corresponding to the eggshells.

2.1. Characterization of Minerals by Photoluminescence Spectroscopy (PS). Fluorescence was measured using a CARY Eclipse fluorescence spectrophotometer using 250 and 370 nm excitation wavelengths with a measurement emission in the 400–600 nm range. All measurements were made at room temperature.

2.2. Identification of Minerals by Raman Spectroscopy (Raman). The identification of minerals was made using a Thermo Scientific microscope equipped with a micro-Raman spectrometer using a 532 nm laser, measuring in the 3000–50 cm^{-1} range with a 50 \times of amplification. The measurement was performed in three different zones with the working power in the range 0.1–9 mW due to the intrinsic fluorescence observed in the samples.

2.3. Characterization of Minerals by X-ray Powder Diffraction (XRPD). XRPD was measured with a PANalytical X-ray Empyrean diffractometer with Cu $K\alpha$ radiation ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$) at 45 kV and 35 mA, with a spot size and step time of 0.0167 μm and 80 s. The low-angle Bragg–Brentano configuration was used with an incidence angle of 0.5°. Phase identification was performed using Match software.¹⁶ Finally,

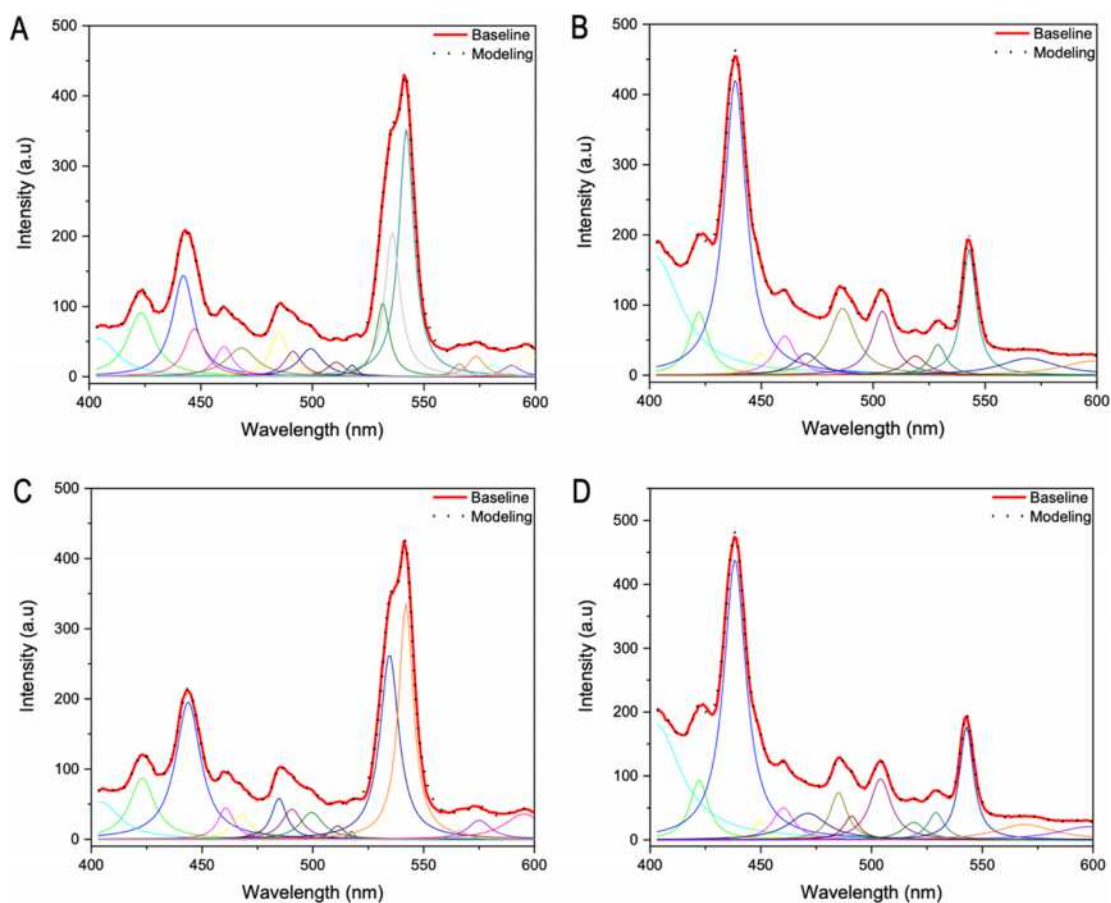


Figure 2. Photoluminescence of the eggshell of *Pristatoolithus* on (A, B) external and (C, D) inner surfaces at (A, C) $\lambda = 250$ nm and (B, D) $\lambda = 370$ nm excitation energies.

Table 1. Wavelengths Obtained by Deconvolution of the Fluorescence Signals from Both Sides of the Eggshells of the *Spheroolithus* Sample 1 at Excitation Energies (EE) of 250 and 370 nm^a

λ (nm)	external surface			inner surface				
	λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)	λ : 250 nm (EE)		λ : 370 nm (EE)		
	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
404	13	CS	403	3	CS	405	10	CS
423	6	CS	410	7		423	6	CS
444	7	Q	422	7	CS	443	7	Q
461	4	CS	437	7	Q	460	5	CS
468	6	S	449	3	Q	468	7	S
486	6	A	460	3	CS	486	5	A
499	8		464	18	CS	495	10	CS
511	4	Q	484	3	A	511	5	Q
517	1	C	488	8	CS	518	2	C
534	5		503	13	CS	532	4	
541	4	C	518	4	C	536	4	
544	3	C	530	4	CS	542	4	C
573	8	C	542	3	C	572	8	C
596	11	A	557	7	CS	596	11	A
			574	10	C			

^aA: albite; C: calcite; Q: quartz; S: SiO₂; Δ : FWHM; M: standard; and CS: calcium of current species.

the Rietveld refinement was carried out using TOPAZ software.¹⁷

2.4. Determination of Organic Molecules by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). FT-IR measure-

Table 2. Wavelengths Obtained by Deconvolution of the Fluorescence Signals from Both Sides of the Eggshell of *Prismatoolithus* at Excitation Energies (EE) of 250 and 370 nm^a

external surface						inner surface					
λ : 250 nm (EE)			λ : 370 nm (EE)			λ : 250 nm (EE)			λ : 370 nm (EE)		
λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M	λ (nm)	Δ	M
404	10	CS	402	14	CS	404	10	CS	402	14	CS
423	7	CS	422	5	CS	423	7	CS	422	5	CS
442	6	Q	438	6	Q	444	7	Q	438	6	Q
447	5	Q	449	4	Q	461	4	CS	449	3	Q
460	5	CS	460	6	CS	468	5	S	460	6	CS
468	8	S	470	7	S	475	5	CS	471	11	S
485	5	A	486	7	A	484	4	A	485	4	A
491	5	CS	504	5	CS	490	5	CS	491	4	CS
499	6		519	6	C	499	6		504	6	CS
511	5	Q	529	4	CS	511	4	Q	519	6	C
518	2	C	543	4	C	517	1	C	529	4	CS
532	3		569	15	CS	534	5		543	4	C
539	4		598	16	A	542	4	C	569	16	S
542	4	C				567	3	S	598	17	A
566	3	S				575	6	C			
573	4	C				595	11	A			
581	5	CS									
589	5										
597	6	A									

^aA: albite; C: calcite; Q: quartz; S: SiO₂; Δ : FWHM; M: standard; and CS: calcium of current species.

ments were performed in reflectance mode using a gold reference with a Cary 630 FT-IR spectrometer (Agilent Technologies) attached to a SurveyIR infrared microscope (RedWave Technology) with a spot size of 2 mm. Each scan consisted of 64 averaged scans with a resolution of 4 cm⁻¹.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Determination of the Molecules Present in the Eggshells by Fluorescence Spectroscopy (FS). The photoluminescence (PL) process occurs when light of sufficient energy is incident on a material, where photons are absorbed and electronic excitations are generated. Eventually, these excitations relax, and the excited electrons return to the ground state, and when radiative relaxation occurs, the emitted photons are known as photoluminescence. Luminescence techniques have been used to characterize minerals and materials on different scales (macro-, micro-, and nano-) because it is a simple and nondestructive technique. A wide variety of minerals have been reported to have luminescence properties, mainly caused by doping and lattice defects. For this reason, this work presents photoluminescence results for each of the samples under study, where Lorentzian functions were adjusted to identify the emission lines of the main minerals present on the external and inner surfaces of the shell. Figures 1 and 2 show the FL spectrum of the sample labeled *Spheroolithus* sample 1 and *Prismatoolithus*, respectively. In both cases, two excitation wavelengths were considered 250 and 370 nm (see Tables 1 and 2). The emission lines found correspond mainly to calcite, albite, and quartz, which were also observed in previous studies.¹⁸ As it was almost impossible to identify other peaks appearing at low emission intensities, the fluorescence of the eggshell of current species such as the ostrich, emu, and crocodile had been developed (see the Supporting Information), to clarify if these wavelengths corresponded to calcium, since it was known by SEM-EDS that the eggshells of the current species were composed only of calcium carbonate (Figure S4).

Experimental data was compared with that reported by Ritcher et al., and McRae et al.^{19,20} Similar results were observed in the other three eggshells of the species mentioned in the Supporting Information (SI), where depending on the analyzed external/inner surface, it was possible to observe, with a higher or lower signal level, calcite, quartz, silicon dioxide (SiO₂, which does not correspond to quartz), and albite. The wavelengths at 410, 499, 532, 534, 536, 539, and 589 nm are not identified in this work.

3.2. Molecular Identification by Raman Spectroscopy (Raman). The formation of different structures on eggshell surfaces (internal and external) of the different species of dinosaurs are confirmed by Raman spectroscopy. Three different zones have been analyzed and denoted as Bz (black zone), Rz (red zone), and Wz (white zone) (see Figures 3, 5, S8, S10, and S12). Table 3 shows the molecular compounds that can be seen in the sample belonging to the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1, being calcite, albite, quartz, silicon dioxide, and anhydrite, obtained from the Raman spectrum

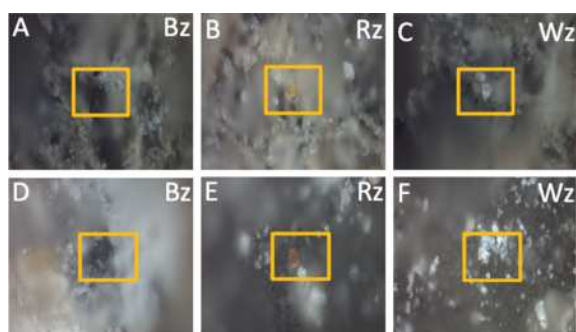


Figure 3. Zones corresponding to micro-Raman measurements made in the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1. (A–C) External surface; (D–F) inner surface; Bz: black zone; Rz: red zone; and Wz: white zone.

Table 3. Raman Shift Observed in the Eggshell of the *Spheroolithus* Sample 1^{a,b}

external surface			inner surface			
θ	ω	θ	ω	ε	ρ	
155	470	155	833	512	1028	
281		281				
712		712				
1088		1088				

^a θ : calcite; ω : albite; ε : quartz; and ρ : anhydrite. ^bThe shift is given in cm^{-1} .

(Figure 4). Other minerals, such as hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) and iron oxides such as hematite (Fe_2O_3), are observed in the other samples (Figure S9). Peaks at 155, 281, 712, and 1088 cm^{-1} correspond to calcite (CaCO_3). The peaks located at 155 and 281 cm^{-1} are related to the lattice mode of calcite, and the peak at 712 cm^{-1} ($\nu_4\text{-CO}_3$ calcite) corresponds to the asymmetric bending mode of CO_3 . The peak at the frequency of 1088 cm^{-1} ($\nu_2\text{-CO}_3$) is characteristic of the symmetric bending of CO_3 groups (Figure 5).^{21,22}

Albite ($\text{Na}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$) crystals presented Raman peaks at 171 and 833 cm^{-1} , associated with the cage-shear modes and deformation modes of the tetrahedral, respectively. The Raman peak at 480 cm^{-1} is due to the expansion of the coordination of the Na group and the stretching of the $\text{Na-O}_c(\text{O})$. Something similar happens with the signal at 507 cm^{-1} , related to the compression of the four members of the tetrahedral ring and the stretching of O-Na-O . While the signal at 581 cm^{-1} is associated with the tetrahedral deformation and the stretching of the O-Na-O group, the signal at 656 cm^{-1} is characteristic of the vibrations of the tetrahedral ring of albite. Finally, the signal

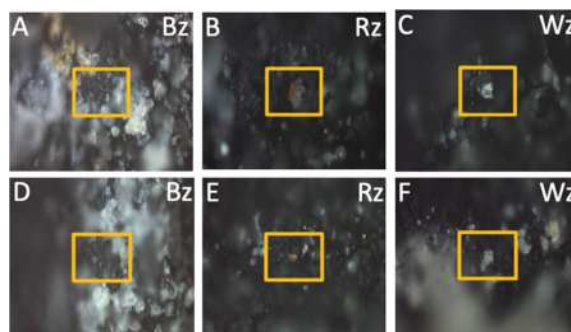


Figure 5. Zones corresponding to micro-Raman measurements made in the eggshell of the *Prismatoolithus*. (A–C) External surface; (D–F) inner surface; Bz: black zone; Rz: red zone; and Wz: white zone.

observed at 297 cm^{-1} is associated with the rotation, expansion, and contraction of the tetrahedral ring.^{21,23}

The quartz peak at 126 cm^{-1} is attributed to the lattice mode symmetric stretching vibrations; 218 and 387 cm^{-1} are generated by symmetric modes; 406 and 603 cm^{-1} are related to the Si–O–Si bridging vibrations; 512 and 454 cm^{-1} correspond to the bending vibrations of the binding oxygen bond of Si–O, and finally, the signal at 353 cm^{-1} , is related to the vibrations of the lattice cell.^{21,24} Silicate peaks have been observed. The peaks at 224, and 245 cm^{-1} are attributed to sodium silicate and aluminosilicate, respectively; 410 cm^{-1} is a fundamental vibration of dry SiO_2 ; 555 cm^{-1} indicates Si–O–Si symmetric stretching and bending vibrations; 581 cm^{-1} is related to the Si–O⁰ rocking motions in fully polymerized SiO_2

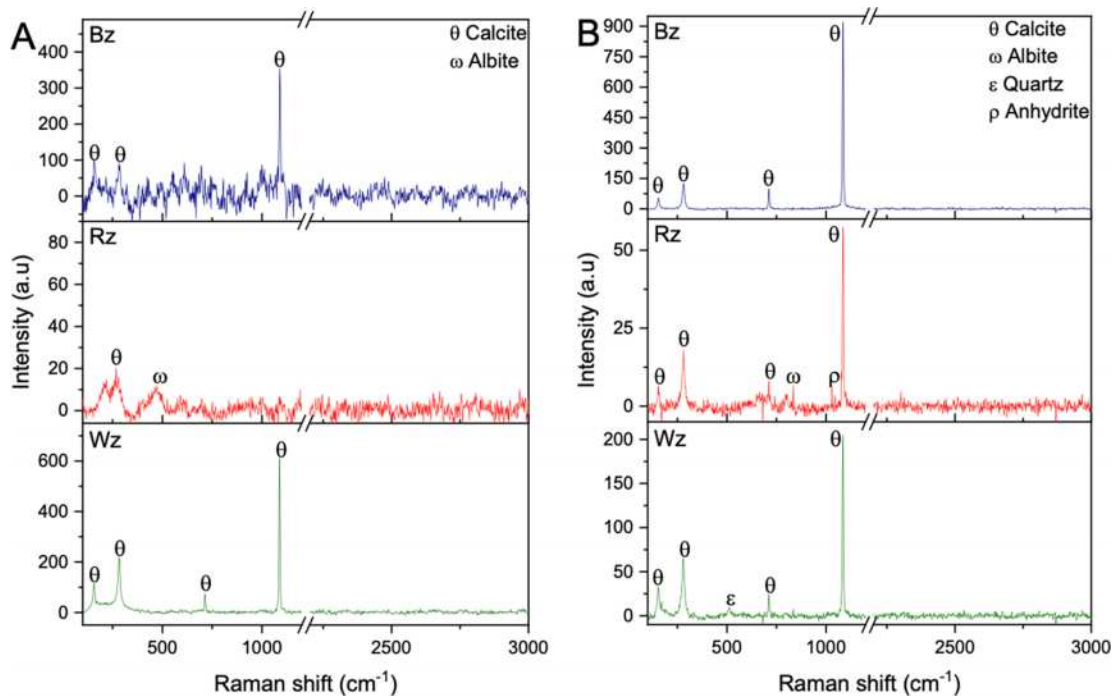


Figure 4. Raman spectrum of the *Spheroolithus* eggshell sample 1 in three different zones on both sides of the eggshell. (A) External surface; (B) inner surface; Bz: black zone; Rz: red zone; Wz: white zone; θ : calcite; ω : albite; ε : quartz; and ρ : anhydrite.

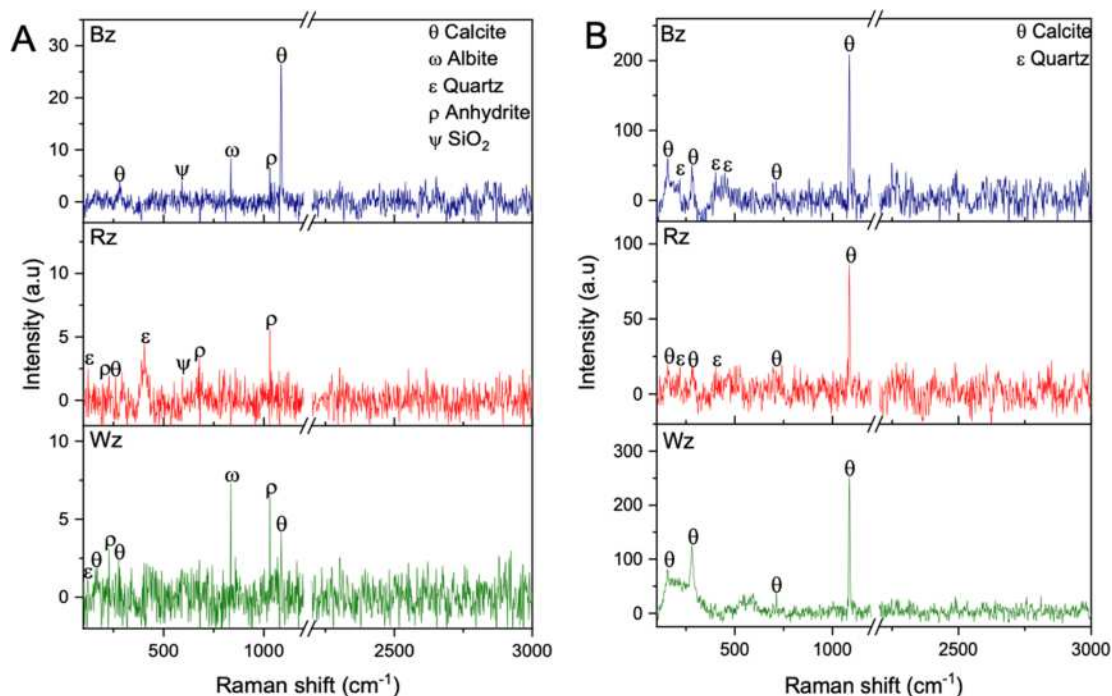


Figure 6. Raman spectrum of the *Prismaotolithus* eggshell in three different zones on both sides of the eggshell. (A) External surface; (B) inner surface; Bz: black zone; Rz: red zone; Wz: white zone. θ : calcite; ω : albite; ε : quartz; ρ : anhydrite; and ψ : SiO_2 .

(Q^4) units; 595 cm^{-1} is characteristic of defect bands and the feature of silicate networks.^{21,24}

The signals at 231 , 676 , and 1028 cm^{-1} are attributed to a mixture of calcium sulfates from anhydrite (CaSO_4) with sodium silicate, characteristic of the symmetric stress vibrations of the SO_4 group.^{21,22,25} The other compound is identified as hydroxyapatite ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) with signals at 568 and 885 cm^{-1} characteristic of a flexion mode of the PO_4 group.^{21,26} The Raman peak at 685 cm^{-1} of the *Lambeosaurinae* eggshell possibly corresponds to a signal characteristic of hematite (Fe_2O_3), but it is necessary to identify other signals of this mineral.²² The Raman shift in the three zones of the other species of dinosaurs can be seen in the Supporting Information.

When observing the peaks of the minerals obtained in the eggshell of the oospecies *Spheroolithus* sample 1 (Figure 4), they present a higher intensity and definition compared to those observed in the eggshell of the oospecies *Prismaotolithus* (Figure 6). A similar case occurs in the intensities of the Raman shift of the other species under study (see the Supporting Information). This variation in Raman peaks is due to several factors such as the size of the crystal lattice of the minerals present in the sample, that is, the larger the size of the crystallites, the greater the intensity of the peaks; impurities that cause alterations in the dimension of the cells due to ionic substitutions; and low crystalline homogeneity and grain boundaries. These factors induce the displacement and decrease of the intensity of the peaks.^{7,27}

Furthermore, the samples fluoresced during data collection, causing the signal intensities to drop dramatically. For this reason, Raman spectra show a break between 1200 and 2000 cm^{-1} to minimize the interference caused by the fluorescence presented by the determined minerals as the working power

varied. In addition to this, another excitation wavelength in the near infrared was used, giving unfavorable results because an increase in the fluorescence signal was generated, providing better results in the excitation wavelength of 532 nm (Table 4).

Table 4. Raman Shift Observed in the Eggshell of the *Prismaotolithus*^{a,b}

external surface		inner surface				
θ	ω	ε	ψ	ρ	θ	ε
155	833	126	595	231	155	218
281		406		676	281	406
1088				1028	712	454
					1088	

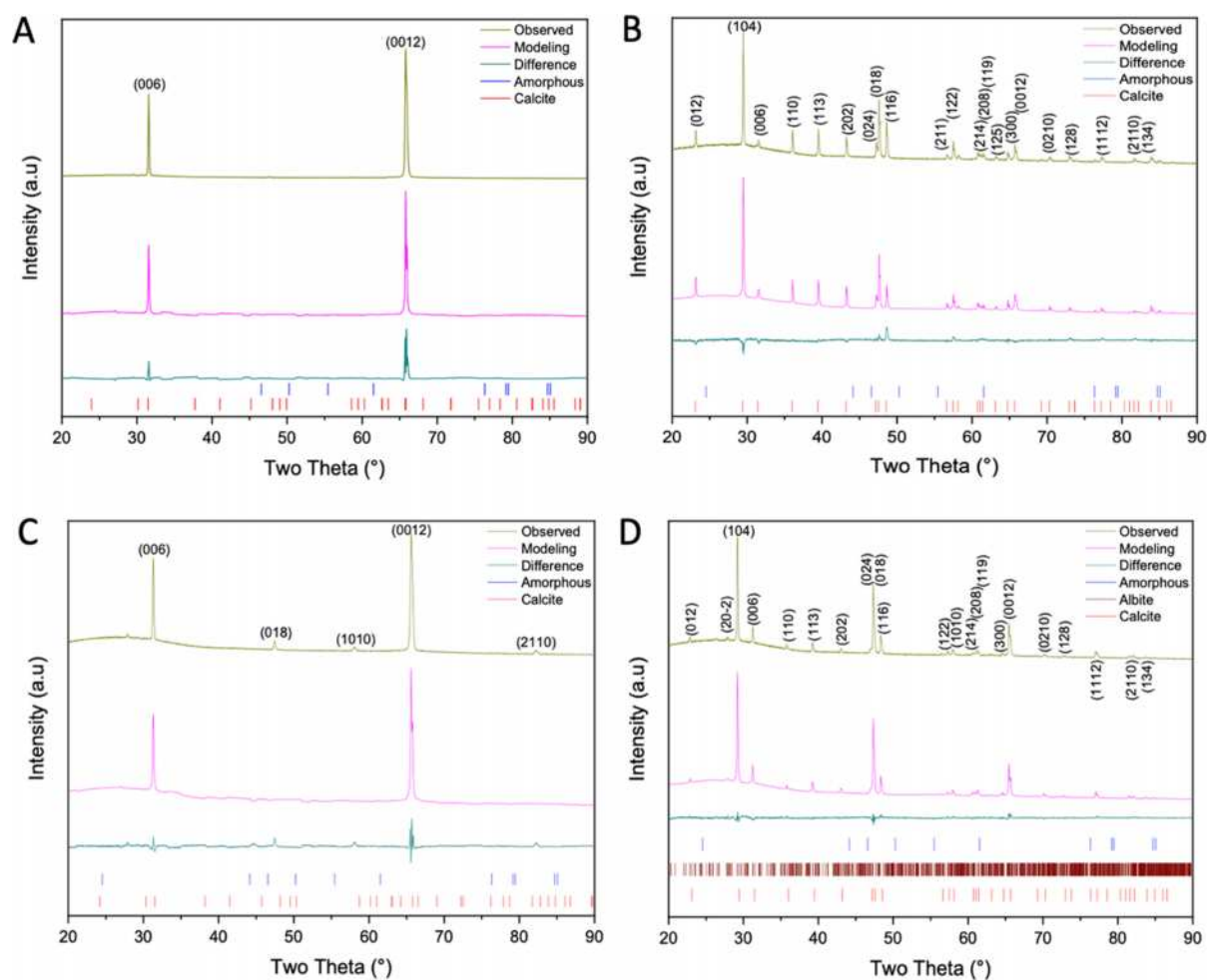
^a θ : calcite; ω : albite; ε : quartz; ρ : anhydrite; and ψ : SiO_2 . ^bThe shift is given in cm^{-1} .

3.3. Phase Determination Using X-ray Powder Diffraction (XRPD). From the previous results, it was identified that the samples contained calcite (CaCO_3), albite ($\text{Na}(\text{AlSi}_3\text{O}_8)$), and quartz. To corroborate those results, X-ray diffraction was performed on all eggshells, for determining that the phases correspond to the minerals mentioned above, as well as the crystallite size and percentage (Table 5) belonging to eggshells of the *Spheroolithus* sample 1 and *Prismaotolithus*. The crystallite size present in the eggshells of the *Lambeosaurinae*, *Spheroolithus* sample 2, and unidentified ootaxon are found in the Supporting Information.

All of the diffractograms were taken above $2\theta = 20^\circ$, since below this angle no characteristic lattice spacing d_{hkl} of any mineral of interest was preserved. In addition, the presence of amorphous elements or compounds such as iron (Fe), aluminum (Al), or silicon dioxide (SiO_2), distorted the signals

Table 5. Crystallite Size and Concentration of Minerals Present in the Eggshells of the *Spheroolithus* Sample 1 and *Prismatoolithus*

oogenus ¹⁸	crystalline	external surface		inner surface	
		size (Å)	concentration (%)	size (Å)	concentration (%)
<i>Spheroolithus</i> sample 1	calcite	248.2	1.90	611.1	2.21
<i>Prismatoolithus</i>	calcite	226.9	0.94	496.3	2.44
	albite			611.1	1.11

Figure 7. Diffractogram corresponding to the eggshells of the (A, B) *Spheroolithus* sample 1 and (C, D) *Prismatoolithus* with the observed phases indicated. (A, C) External surface and (B, D) inner surface.

observed in all of the samples, causing the formation of a Gaussian curve and therefore, the decrease in the intensities of the planes.²⁸

The crystallite size is determined using the Scherrer equation (eq 1), where t is the thickness of the crystal in Å, λ corresponds to the X-ray wavelength, θ_B to the Bragg angle, and B to the calculated peak width using Warren's formula (eq 2), where B_M is the width of the peak in radians at the average height of the peak and B_S is the width of the peak of the standard material.^{29,30}

$$t = \frac{0.9\lambda}{B \cos \theta_B} \quad (1)$$

$$B^2 = B_M^2 - B_S^2 \quad (2)$$

Calcite is the mineral found in the greatest quantity and has smaller crystals, followed by albite in terms of the crystallite size. Albite was the phase with the lowest proportion. And finally, quartz, present in low concentrations, had large crystallites mainly on the inner side of the shell.

When observing the diffractograms of all of the *Spheroolithus* sample 1 and *Prismatoolithus* (Figure 7) and the other dinosaur species under study (Figure S14), the reported crystallographic planes corresponding to the X-ray diffraction of calcite (see Table S11),²⁸ with the space group $R\bar{3}c$ and unit cell parameters (hexagonal): $a = b = 4.986 \text{ \AA}$, $c = 17.049 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, and $\gamma = 120^\circ$ were identified in all of the samples, as were the lattice spacings d_{hkl} corresponding to quartz [d_{100} , d_{010} , d_{200} , d_{202} , and d_{211}] with a space group $P3_221$ corresponding to a hexagonal

unit cell with $a = b = 4.914 \text{ \AA}$, $c = 5.394 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, and $\gamma = 120^\circ$. The opposite happened with albite, where three lattice spacings d_{hkl} [d_{030} , d_{220} , and d_{040}] were determined with a triclinic crystalline system (P1) and unit cell parameters of $a = 8.139 \text{ \AA}$, $b = 12.798 \text{ \AA}$, $c = 7.136 \text{ \AA}$, $\alpha = 44.2^\circ$, $\beta = 116.6^\circ$, and $\gamma = 87.7^\circ$. The lattice spacings d_{hkl} [d_{202} , d_{220} , and d_{1010}] were not identified, but according to the diffractograms, it is believed that they probably correspond to what would be albite.

From the diffractograms obtained, it is possible to adjust all of the phases with their texture features. The crystals of the internal part, where the process of crystallization and eggshell formation begins, is carried out with polycrystalline growth with nonfixed orientation. Therefore, the calcite presented a preferential orientation on the outer face of the eggshell in the planes' lattice spacing d_{hkl} [d_{006} , d_{0012} , d_{018} , d_{1010} , d_{2110} , and d_{104}], indicating that the crystalline growth of the mineral palisade is carried out in an orderly manner. The lattice spacings d_{018} and d_{104} are characteristic of the formation of twin rhombohedral crystals of calcite,^{31,32} while the crystalline growth observed in the preferential orientations not identified as twin crystals, is probably due to the diagenetic changes that the eggshells have undergone over the years, as well as to the presence of biomacromolecules such as the intramineral proteins responsible for the eggshell formation process.

3.4. Characterization of Organic Molecules by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR). Once the minerals present in the fossilized samples have been identified, and considering that biomineralization is mediated by biomacromolecules, FT-IR was performed with the purpose of obtaining information about the primary and secondary structures of the possible proteins present in the eggshells.

Proteins mainly have a peptide group in their chemical structure, which can be identified with their own vibrations divided into nine amide groups: A, B, I–VII. The amide A band is observed with a wavenumber of $\sim 3500\text{--}3200 \text{ cm}^{-1}$ and has the feature of presenting vibrations of hydrogen bonds with lengths from 2.69 to 2.85 Å, while amide B ($\sim 3200\text{--}3100 \text{ cm}^{-1}$) features the NH stretching (st) vibrations. Of the amides I–VII, the most characteristic ones are the amides I–III, which give information on the vibrations of the amino acids and the type of secondary structure commonly present in the protein signal. Amide I ($\sim 1730\text{--}1580 \text{ cm}^{-1}$) stands out for having a high absorption and focuses on the vibrations of the $\text{C}=\text{O}$ and $\text{C}-\text{N}$ groups of the backbone. Amide II ($\sim 1580\text{--}1450 \text{ cm}^{-1}$) is typical of the bending (bd) vibrations in the plane of the NH group and of the stretching vibrations of the CN and $\text{C}-\text{C}$ groups, while amide III ($\sim 1450\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$) depends mainly on hydrogen bonding, being the most complex group for its identification. Amide groups IV–VII are even more complex than amide III, with wavenumbers of $\sim 767\text{--}625$, $\sim 800\text{--}640$, $\sim 606\text{--}537$, and $\sim 200 \text{ cm}^{-1}$, respectively, and provide information on the skeletal torsion and on the bending (bd) vibrations of the OCN , NH , and $\text{C}=\text{O}$ groups out of the plane.^{33,34} The parts of the secondary structure can be observed with broad bands at wavenumbers of $\sim 1637\text{--}1629$ and $\sim 1696\text{--}1685 \text{ cm}^{-1}$ for β -sheets, ~ 1652 and $\sim 1548 \text{ cm}^{-1}$ for α -helices, and an absorption close to $\sim 1680 \text{ cm}^{-1}$ for turns.^{35,36}

According to this information, the samples were analyzed on both surfaces in the spectral ranges corresponding to amide I ($\sim 1730\text{--}1580 \text{ cm}^{-1}$), amide II ($\sim 1580\text{--}1475 \text{ cm}^{-1}$), and amide III ($\sim 1475\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$), to be able to obtain information about the possible presence of intramineral proteins within the mineralized structures of fossilized eggshells. These results are

important since they may provide information about ancestral proteins that, to this date, have not yet been identified and/or characterized. The data corresponding to the eggshells of the *Spheroolithus* sample 1 and *Prismatoolithus* are displayed in Table 6 (the data of the other species are found in the

Table 6. Deconvolution of the FT-IR Spectra and Assignment of the Vibrations Corresponding to the Amino Acid (AA) Side Chain as well as the Secondary Structure (SS) of Intramineral Proteins Present in the External (e) and Inner (i) Surfaces of the *Spheroolithus* Sample 1 and *Prismatoolithus* Eggshells^a

AA/SS	<i>Spheroolithus</i> sample 1		<i>Prismatoolithus</i>		vibration assignment
	$\nu_0(\text{e})$ (cm^{-1})	$\nu_0(\text{i})$ (cm^{-1})	$\nu_0(\text{e})$ (cm^{-1})	$\nu_0(\text{i})$ (cm^{-1})	
Asp	1574	1574	1568	1570	COO^- st as
	1716	1714	1717		COOH st
Glu	1560	1569	1559	1560	COO^- st as
				1713	COOH st
Arg	1674				CN_3H_5^+ st s
	1633		1633	1633	CN_3H_5^+ st s
Lys		1631		1626	NH_3^+ bd as
	1530	1526	1525	1526	NH_3^+ bd s
	1515	1514		1514	NH_3^+ bd s
Asn	1682	1681	1683	1679	$\text{C}=\text{O}$ st
			1619	1622	NH_2 bd
Gln			1672	1671	$\text{C}=\text{O}$ st
				1613	NH_2 bd
					ring-OH
Tyr	1522	1520	1517	1521	ring-OH
	1605		1601	1601	ring-O ⁻
	1498	1498	1498	1497	ring-O ⁻
His					ring
Phe	1489	1490	1489	1489	ring
	turns		1693	1696	
α -helix		1668			
		1663	1661	1664	1665
		1701	1705	1702	1703
		1652	1652	1651	1657
β -sheet disordered					1648
					1684
		1644	1643	1641	

^a ν_0 : wavenumber; st: stretching; bd: bending; s: symmetrical; and as: asymmetrical.

Supporting Information. Aspartic acid (Asp), glutamic acid (Glu), arginine (Arg), lysine (Lys), asparagine (Asn), glutamine (Gln), tyrosine (Tyr), histidine (His), and phenylalanine (Phe), are among the amino acids that were identified, as well as the turns, β -sheets, α -helices, and disordered protein signals.^{37,38}

From Asp it was possible to identify COO^- st asymmetric (as) vibrations at $1575\text{--}1568 \text{ cm}^{-1}$ in all of the samples, as well as Glu at $1564\text{--}1557 \text{ cm}^{-1}$, but the COO^- st in $1721\text{--}1714 \text{ cm}^{-1}$ for Asp were not observed in the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2 and unidentified ootaxon (Figure S15). A similar case happened with the COO^- st vibration of Glu at $1713\text{--}1709 \text{ cm}^{-1}$, which was not identified in the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1 (Figure 8). In the case of Arg, two vibrations were identified at $1614\text{--}1673 \text{ cm}^{-1}$ for CN_3H_5^+ st as, except in the eggshell of the *Prismatoolithus*, *Spheroolithus* sample 2, and unidentified ootaxon, and at $1638\text{--}1633 \text{ cm}^{-1}$ for CN_3H_5^+ st symmetric (s), observed in all samples. Another

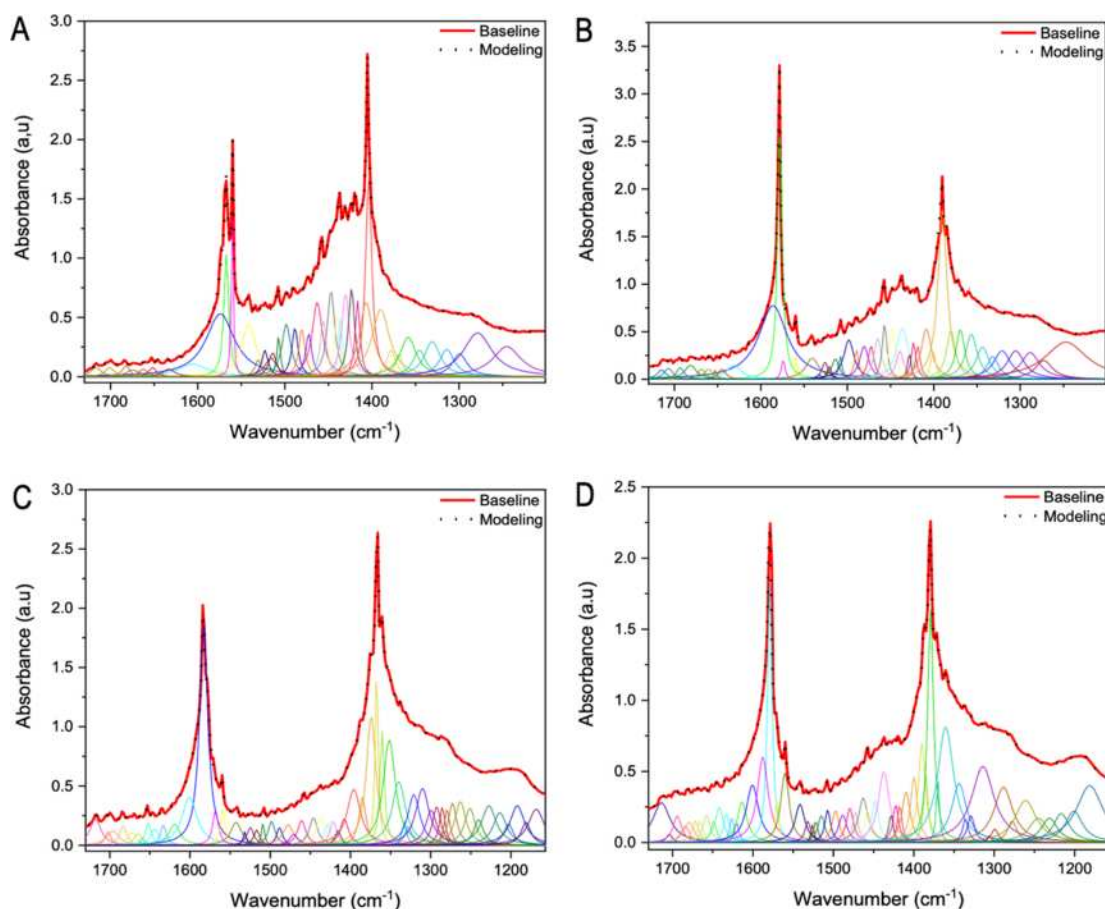


Figure 8. FT-IR spectrum of the eggshell of the (A, B) *Spheroolithus* sample 1 and (C, D) *Prismaoolithus* on both sides of the eggshell. (A, C) External surface and (B, D) inner surface. The red line corresponds to the experimental data and the black dotted line corresponds to the sum of Lorentzian graphs obtained by deconvolution of the peaks.

amino acid identified in all samples without exception is Lys with vibrations at $1631\text{--}1626\text{ cm}^{-1}$ for $-\text{NH}_3^+$ bands, $1530\text{--}1525$ and $1515\text{--}1512\text{ cm}^{-1}$ for $-\text{NH}_3^+$ bands. Asn and Gln with structural similarity, present $\text{C}=\text{O}$ vibrations at $1683\text{--}1679$ and $1672\text{--}1668\text{ cm}^{-1}$, respectively, and $-\text{NH}_2$ bands at $1622\text{--}1618\text{ cm}^{-1}$ for Asn and $1613\text{--}1609\text{ cm}^{-1}$ for Gln, where the eggshell of the *Spheroolithus* sample 1 was the only sample from which the bands corresponding to these two amino acids were not observed.

In the case of aromatic amino acids such as Tyr, it presents two vibrations corresponding to ring-OH at $1522\text{--}1517\text{ cm}^{-1}$ present in all samples and ring- O^- at $1605\text{--}1601$ and $1498\text{--}1496\text{ cm}^{-1}$, visible in all eggshells except the *Lambeosaurinae* one. Other amino acids with vibrations in the aromatic rings are Phe and His with vibrations at $1493\text{--}1488$ and $1594\text{--}1591\text{ cm}^{-1}$, respectively, the latter being unidentified in the eggshells of the *Spheroolithus* sample 1 and *Prismaoolithus* (Figure 8).

Of the components of the secondary structure, the turns present three characteristic bands, which correspond to nonhelical, nonhelical with Gly in position 3, and 3_{10} helices, but they have not been identified individually. Of these turns, the signals observed are found in wavenumbers of $1696\text{--}1690$, 1668 (not visible in the eggshells of *Prismaoolithus* and *Spheroolithus* sample 2), and $1665\text{--}1661\text{ cm}^{-1}$. Like the turns, the α -helices

can be observed in three bands located at $1705\text{--}1700$, $1657\text{--}1651$, and 1648 cm^{-1} , which are unidentified in the eggshells of the *Spheroolithus* sample 1 and *Lambeosaurinae*. The β -sheets and disordered protein signals are observed at $1685\text{--}1684$ and $1646\text{--}1641\text{ cm}^{-1}$, respectively, where the β -sheets are identified in the eggshell of *Prismaoolithus* and the unidentified ootaxon, while the disordered protein is not identified in the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2.

4. CONCLUSIONS

The chemical composition from the eggshells of the *Spheroolithus* sample 1, *Lambeosaurinae*, *Prismaoolithus*, *Spheroolithus* sample 2, and unidentified ootaxon was determined by micro-Raman identifying minerals such as calcite, quartz, and albite, using different working power due to the fluorescence lines emitted by the eggshell, which was confirmed by photoluminescence at room temperature. Calcite, the main factor in fluorescence, was found in a higher proportion compared to the other minerals. X-ray diffraction and Rietveld refinement allowed us to identify the crystallographic planes and measure the crystalline size. Along with calcite, quartz was another mineral that was characterized, together with silicon dioxide impurities, which were observed by fluorescence spectroscopy and X-ray diffraction by the Gaussian curve

observed in chromatograms due to impurities from amorphous crystals and metals absorbed during the fossilization process. In contrast to calcite and quartz, albite, the third mineral in the studied samples, presented a low intensity in the micro-Raman signals and photoluminescence emission. Only a few crystallographic planes were also detected due to the low proportion compared to the other minerals. The FT-IR analysis allowed us to identify the bands corresponding to nine amino acids (Asp, Glu, Arg, Lys, Asn, Gln, Tyr, His, and Phe), and the components of the secondary structure that the proteins have (turns, α -helices, and β -sheets). We must point out that this study is a contribution to the identification of ancestral proteins, which have not yet been fully characterized, and that the investigation to obtain the three-dimensional structure must continue as it will provide information about the evolution and the structural relationship with isolated and characterized proteins of species phylogenetically related with dinosaurs. These results are of great importance as there are no studies on the composition of dinosaur eggshells found in Mexico nor on intramineral proteins present in fossilized eggshells. In this case, it is hoped that the analysis carried out on these paleontological samples will help to complete the research puzzle of the possible compounds absorbed or diffused in the samples due to the diagenetic changes as well as give information about the behavior of dinosaurs and the paleoenvironment in which they were at the time of hatching the eggs.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsearthspacechem.1c00077>.

Photoluminescence, micro-Raman, Rietveld refinement, and FT-IR graphics of the eggshells of the Lambeosaurinae, *Spheroolithus* sample 2, and unidentified ootaxon, with the aim of determining the molecular composition; determination of photoluminescence of the eggshells by fluorescence spectroscopy (FS) (Section S1); wavelengths obtained for the deconvolution of the fluorescence signal from both sides of the Lambeosaurinae eggshell at excitation energies (EE) of 250 and 370 nm (Table S1); photoluminescence of the Lambeosaurinae eggshell on external (A, B) and inner surfaces (C, D) at $\lambda = 250$ nm (A, C) and $\lambda = 370$ nm (B, D) excitation energy (Figure S1); wavelengths obtained for the deconvolution of the fluorescence signal from both sides of the *Spheroolithus* eggshells sample 2 at excitation energies (EE) of 250 and 370 nm (Table S2); photoluminescence of the *Spheroolithus* eggshells sample 2 on external (A, B) and inner surfaces (C, D) at $\lambda = 250$ nm (A, C) and $\lambda = 370$ nm (B, D) excitation energy (Figure S2); wavelengths obtained for the deconvolution of the fluorescence signal from both sides of the eggshells of the unidentified ootaxon at excitation energies (EE) of 250 and 370 nm (Table S3); photoluminescence of the eggshells of unidentified ootaxon on external (A, B) and inner surfaces (C, D) at $\lambda = 250$ nm (A, C) and $\lambda = 370$ nm (B, D) excitation energy (Figure S3); SEM-EDS images of the area outline in white corresponding to the analysis performed on the pulverized ostrich (A), emu (B), and crocodile (C) eggshells and the mass percentage by mass of the identified elements (D) (Figure S4); wavelengths

obtained for the deconvolution of the fluorescence signal of calcite from both sides of the eggshell of an ostrich at excitation energies (EE) of 250 and 370 nm (Table S4); photoluminescence of the eggshells of an ostrich on external (A, B) and inner surfaces (C, D) at $\lambda = 250$ nm (A, C) and $\lambda = 370$ nm (B, D) excitation energy (Figure S5); wavelengths obtained for the deconvolution of the fluorescence signal of calcite from both sides of the eggshells of emu at excitation energies (EE) of 250 and 370 nm (Table S5); photoluminescence of the eggshells of an emu on external (A, B) and inner surfaces (C, D) at $\lambda = 250$ nm (A, C) and $\lambda = 370$ nm (B, D) excitation energy (Figure S6); wavelengths obtained for the deconvolution of the fluorescence signal of calcite from both sides of the eggshells of a crocodile at excitation energies (EE) of 250 and 370 nm (Table S6); photoluminescence of the eggshells of a crocodile on external (A, B) and inner surfaces (C, D) at $\lambda = 250$ nm (A, C) and $\lambda = 370$ nm (B, D) excitation energy (Figure S7); analysis of molecules determined by Raman spectroscopy (micro-Raman) (Section S2); zones corresponding to micro-Raman measurements made in the Lambeosaurinae eggshell (Figure S8); Raman shift observed in the Lambeosaurinae eggshell (Table S7); Raman spectrum of the Lambeosaurinae eggshell in three different zones on both sides of the eggshell (Figure S9); zones corresponding to micro-Raman measurements made in the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2 (Figure S10); Raman shift of the eggshell of the *Spheroolithus* sample 2 (Table S8); Raman spectrum of the *Spheroolithus* eggshell sample 2 in three different zones on both sides of the eggshell (Figure S11); zones corresponding to micro-Raman measurements made in the eggshell of the unidentified ootaxon (Figure S12); Raman shift observed in the eggshell of the unidentified ootaxon (Table S9); Raman spectrum of the eggshell of the unidentified ootaxon in three different zones on both sides of the eggshell (Figure S13); characterization of the crystallite by X-ray powder diffraction (XRPD) (Section S3); crystallite size and concentration of minerals present in the eggshell of the Lambeosaurinae, *Spheroolithus* sample 2, and unidentified ootaxon (Table S10); diffractogram of the obtained phases corresponding to the eggshell of the Lambeosaurinae (A, B), *Spheroolithus* sample 2 (C, D), and unidentified ootaxon (E, F). (A, C, E) External surface and (B, D, F) inner surface (Figure S14); experimental and theoretical crystallographic data of calcite (Table S11); characterization of organic molecules by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Section S4); deconvolution of the FT-IR spectra and assignment of the vibrations corresponding to the amino acid (AA) side chain as well as the secondary structure (SS) of intramineral proteins present in the external (e) and inner (i) surfaces of the Lambeosaurinae, *Spheroolithus* sample 2 eggshells, and unidentified ootaxon (Table S12); and FT-IR spectra of the eggshell of the Lambeosaurinae (A, B), *Spheroolithus* sample 2 (C, D), and unidentified ootaxon (E, F) on both sides of the eggshell (Figure S15) (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Abel Moreno – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México; orcid.org/0000-0002-5810-078X; Email: carcamo@unam.mx

Authors

Nerith Rocío Elejalde-Cadena – Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

José Octavio Estevez – Instituto de Física, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 02376, México

Vicente Torres-Costa – Departamento de Física Aplicada, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, Spain; orcid.org/0000-0001-5066-2799

María Dolores Ynsa-Alcalá – Departamento de Física Aplicada and Centro de Micro-Análisis de Materiales, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, Spain

Gastón García-López – Centro de Micro-Análisis de Materiales, Universidad Autónoma de Madrid, E-28049 Madrid, Spain

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acsearthspacechem.1c00077>

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Ing. Cristina Zorrilla from the Laboratory of Advanced Materials of Physics Institute of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) for Raman spectroscopy data, Dra. Vivechana Agarwal at Research Center for Engineering and Applied Sciences of the Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) for the data of fluorescence spectroscopy, and Dr. Ulises Salazar of the Physics Institute of Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) for the X-ray analyses. Finally, this research was sponsored in part by the NATO Science for Peace and Security Programme under grant G5734. One of the authors (N.R.E.-C.) wishes to thank CONACYT (Registration No. 889262) for a scholarship for the Ph.D. program in Chemistry Sciences of UNAM. One of the authors (A.M.) acknowledges Antonia Sánchez Marín for the technical and grammar corrections of this article.

REFERENCES

- (1) Jackson, F. D.; Varricchio, D. J. Fossil eggs and eggshell from the lowermost Two Medicine Formation of western Montana, Sevenmile Hill Locality. *J. Vertebr. Paleontol.* **2010**, *30*, 1142–1156.
- (2) Jackson, F. D.; Varricchio, D. J. Fossil egg and eggshells from the Upper Cretaceous Hell Creek Formation, Montana. *J. Vertebr. Paleontol.* **2016**, *36*, No. e1185432.
- (3) Jackson, F. D.; Horner, J. R.; Varricchio, D. J. Varricchio. A study of a *Troodon* egg containing embryonic remains using epifluorescence microscopy and other techniques. *Cretaceous Res.* **2010**, *31*, 255–262.
- (4) Guenther, M. F. *Comparative Ontogenies (Appendicular Skeleton) for Three Hadrosaurid and a Basal Iguanodontian: Divergent Development Pathways in Hadrosaurinae and Lambeosaurinae*; Eberth, D. A.; Evans, D. E., Eds.; Indiana University Press: Indiana, 2014; pp 398–415.
- (5) Ramírez-Velasco, A. A.; Hernández-Rivera, R. Diversity of late cretaceous dinosaurs from Mexico. *Bol. Geol. Min.* **2015**, *126*, 63–108.
- (6) Hubert, J. F.; Panish, P. T.; Chure, D. J.; Probst, K. S. Chemistry, microstructure, petrology, and diagenetic model of Jurassic dinosaur bones, dinosaur natural monument, Utah. *J. Sediment. Res.* **1996**, *66*, 531–547.
- (7) Olcott Marshall, A.; Marshall, C. P. Vibrational spectroscopy of fossils. *Palaeontology* **2015**, *58*, 201–211.
- (8) Piga, G.; Santos-Cubedo, A.; Brunetti, A.; Piccinini, M.; Malgosa, A.; Napolitano, E.; Enzo, S. A multi-technique approach by XRD, XRF, FT-IT to characterize the diagenesis of dinosaur bones from Spain. *Palaeogeogr., Palaeoclimatol., Palaeoecol.* **2011**, *310*, 92–107.
- (9) Heuser, A.; Tütken, T.; Gussone, N.; Galer, S. J. G. Calcium isotopes in fossil bones and teeth - diagenetic versus biogenic origin. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2011**, *75*, 3419–3433.
- (10) Das, S.; Hendry, M. J. Application of Raman spectroscopy to identify iron minerals commonly found in mine wastes. *Chem. Geol.* **2011**, *290*, 101–108.
- (11) Sakae, T.; Mishima, H.; Suzuki, K.; Kozawa, Y.; Sahni, A. Crystallographic and chemical analyses of eggshell of dinosaur (*Sauropod titanosaurids* sp.). *J. Fossil Res.* **1995**, *27*, 50–54.
- (12) Campos-Casal, F. H.; Cortez, F. A.; Gomez, E. I.; Chamut, S. N. Chemical composition and microstructure of recently oviposited eggshells of *Salvator merianae* (squamata: Teiidae). *Herpetol. Conserv. Biol.* **2020**, *15*, 25–40.
- (13) Choi, S.; Lee, S. K.; Kim, N. H.; Kim, S. Y.; Lee, Y. N. Raman spectroscopy detects amorphous carbon in an enigmatic egg from the upper cretaceous Wido volcanics of South Korea. *Front. Earth Sci.* **2020**, *7*, No. 349.
- (14) Choi, S.; Han, S. Y.; Kim, N. H.; Lee, Y. N. A comparative study of eggshells of Gekkotia with morphological, chemical composition and crystallographic approaches and its evolutionary implications. *PLoS One* **2018**, *13*, No. e0199496.
- (15) Stein, K.; Prondvai, E.; Huang, T.; Baele, J. M.; Sander, M.; Reisz, R. Structure and evolutionary implications of the earliest (Sinemurian, Early Jurassic) dinosaur eggs and eggshells. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, No. 4424.
- (16) Lutterotti, L.; Pillière, H.; Fontugne, C.; Boullay, P.; Chateigner, D. Full-profile search-match by the Rietveld method. *J. Appl. Crystallogr.* **2019**, *52*, 587–598.
- (17) Evans, J. S. O. Advanced input files & parametric quantitative analysis using Topas. *Mater. Sci. Forum* **2010**, *651*, 1–9.
- (18) Elejalde-Cadena, N. R.; Cabrera-Hernández, J. S.; Hernández-Rivera, R.; Moreno, A. Searching for a clue to characterize a crystalline dinosaur's eggshell of Baja California, Mexico. *ACS Omega* **2020**, *5*, 25936–25946.
- (19) Richter, D. K.; Götze, T.; Habermann, D. Cathodoluminescence of authigenic albite. *Sediment. Geol.* **2002**, *150*, 367–374.
- (20) McRae, C. M.; Wilson, N. C. Luminiscence Database I – Minerals and Materials. *Microsc. Microanal.* **2008**, *14*, 184–204.
- (21) Yin, Y.; Yin, J.; Zhang, W.; Tian, H.; Hu, Z.; Ruan, M.; Xu, H.; Liu, L.; Yan, Z.; Chen, D. FT-IR and micro-Raman spectroscopic characterization of minerals in high-calcium coal ashes. *J. Energy Inst.* **2018**, *91*, 389–396.
- (22) Edwards, H. G. M.; Farwell, D. W.; De Faria, D. L. A.; Monteiro, A. M. F.; Afonso, M. C.; De Blasis, P.; Eggers, S. Raman spectroscopic study of 3000-year-old human skeletal remains from a sambaqui, Santa Catarina, Brazil. *J. Raman Spectrosc.* **2001**, *32*, 17–22.
- (23) Mckeown, D. Raman spectroscopy and vibrational analyses of albite: from 25°C through the melting temperature. *Am. Mineral.* **2005**, *90*, 1506–1517.
- (24) Hulsbosch, N.; Thomas, R.; Boiron, M. C.; Dewaele, S.; Muchez, P. Direct observation of boro-aluminosilicate melt composition: Insights from Raman spectroscopy of melt inclusions in pegmatitic tourmaline of the gatumba-gitarama area (Rwanda). *Can. Mineral.* **2017**, *55*, 377–397.
- (25) Yadav, A. K.; Singh, P. A review of the structures of oxide glasses by Raman spectroscopy. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 67583–67609.
- (26) Timchenko, P. E.; Timchenko, E. V.; Pisareva, E. V.; Vlasov, M. Y.; Red'kin, N. A.; Frolov, O. O. Spectral analysis of allogeneic hydroxyapatite powders. *J. Phys.: Conf. Ser.* **2017**, *784*, No. 012060.

- (27) Gómez, D. A.; Coello, J.; Maspoch, S. The influence of particle size on the intensity and reproducibility of Raman spectra of compacted samples. *Vib. Spectrosc.* **2019**, *100*, 48–56.
- (28) Hoefler, H.; Strel, C.; Wobrasuchek, P.; Ovari, M.; Zaray, G. Analysis of low Z elements in various environmental samples with total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. *Spectrochim. Acta, Part B* **2006**, *61*, 1135–1140.
- (29) West, A. R. *Solid State Chemistry and Its Applications*; John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom, 1984; pp 173–175.
- (30) AMCSD: American Mineralogist Crystal Structure Database Record. <http://rruff.geo.arizona.edu/AMS/amcsd.php>.
- (31) Pokroy, B.; Kapon, M.; Marin, F.; Adir, N.; Zolotoyabko, E. Protein-induced, previously unidentified form of calcite. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 7337–7341.
- (32) Bruno, M.; Massaro, F. R.; Rubbo, M.; Prencipe, M.; Aquilano, D. (10.4), (01.8), (01.2), and (00.1) Twin laws of calcite (CaCO₃): Equilibrium geometry of the twin boundary interfaces and twinning energy. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 3102–3109.
- (33) Byler, D. M.; Susi, H. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* **1986**, *25*, 469–487.
- (34) Kong, J.; Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549–559.
- (35) De Meutter, J.; Goormaghtigh, E. FTIR imaging of protein microarrays for high throughput secondary structure determination. *Anal. Chem.* **2021**, *93*, 3733–3741.
- (36) Krimm, S.; Bandekar, J. Vibrations spectroscopy and conformation of peptides polypeptides, and proteins. *Adv. Protein Chem.* **1986**, *38*, 181–364.
- (37) Venyaminov, S. Y.; Kalnin, N. N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. I. Spectral parameters of amino acid residue absorption bands. *Biopolymers* **1990**, *30*, 1243–1257.
- (38) Venyaminov, S. Y.; Kalnin, N. N. Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous protein in α -, β -, and random coil conformations. *Biopolymers* **1990**, *30*, 1259–1271.