



VNIVERSITATIS VALÈNCIA

FACULTAT DE QUÍMICA

DEPARTAMENT DE QUÍMICA FÍSICA

INSTITUT DE CIÈNCIA DELS MATERIALS

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES
MECÁNICAS DE BIOPOLÍMEROS
NANOESTRUCTURADOS
PRESENTES EN LA NATURALEZA**

Memoria que presenta

Omar Troncoso Heros

Para optar al grado de

Doctor en Ciencias Químicas

Directores de la Tesis:

Dra. Clara M Gómez Clari

Dr. Fernando G Torres García

Valencia, Noviembre 2014



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



D^a. Clara M. Gomez Clari, Catedrática del Departament de Química-Física de la Universitat de València

D. Fernando G. Torres García, Profesor Principal del Departamento de Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú

CERTIFICAN:

Que el trabajo que presenta D. Omar Troncoso Heros en esta memoria bajo el título “ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS DE BIOPOLÍMEROS NANO ESTRUCTURADOS PRESENTES EN LA NATURALEZA” ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departament de Química-Física y en el Institut de Ciència dels Materials de la Universitat de València.

Y para que así conste, a efectos de su presentación para optar al título de Grado de Doctor en Ciencias Químicas, expedimos la presente, que firmamos a 3 de Noviembre de 2014.

Dra. Clara M Gómez Clari

Dr. Fernando G Torres García

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer a todas las personas e instituciones de Perú y España, sin quienes esta tesis no se hubiera podido llevar a cabo.

En primer lugar a Clara Gómez, Fernando Torres y Daniel López, directora y co-directores del proyecto de tesis.

En segundo lugar a la Asociación Universitaria Iberoamericana de Postgrado, el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del Perú (COMCYTEC) y a la Facultad de Ciencias e Ingeniería de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) por las becas y ayudas recibidas.

A todas las personas que de alguna u otra manera me brindaron su apoyo.

A mi familia

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	9
1. El colágeno	9
2. El biso de mejillón	18
3. Redes de fibras en 2D: la membrana de huevo	30
4. Redes de fibras en 3D: el músculo del manto del calamar gigante	35
CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL	39
1. Materiales	39
1.1. Bisos de mejillones	39
1.2. Membrana de huevo	40
1.3. Manto de calamar gigante	42
2. Técnicas de caracterización	43
2.1. Morfología	43
2.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier	44
2.3. Ensayos de análisis térmico	44
2.4. Ensayos de tensión cuasi-estática	45
2.5. Ensayos de nanoindentación	49
2.6. Ensayos reológicos	51
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
1. Una fibra de biopolímeros: El biso de mejillón	55
1.1. Caracterización morfológica	55

1.2.	Propiedades mecánicas	66
2.	Red de biopolímeros: La membrana de huevo	84
2.1.	Caracterización morfológica	84
2.2.	Propiedades mecánicas	92
2.3.	Análisis de las propiedades de las fibras individuales	93
2.4.	Análisis de las propiedades de la red	96
3.	Red tridimensional: El manto del calamar gigante	112
3.1.	Caracterización morfológica	112
3.2.	Análisis reológico y térmico	118
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....		133
CAPITULO 6. REFERENCIAS.....		137
PUBLICACIONES		157

SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

Col-D	Colágeno de la zona distal del biso
Col-P	Colágeno de la zona proximal del biso
Col-NG	Colágeno NG del biso
PreCol-D	Precursor de colágeno de la zona distal del biso
PreCol-P	Precursor de colágeno de la zona proximal del biso
PreCol-NG	Precursor de colágeno NG del biso
DOPA	3,4 dihidroxi-L-fenilalanina
FP	Proteínas del pie del biso
MEFP	Proteínas de pies de mejillón <i>M. edulis</i>
ESM	Membrana de huevo (“ <i>Eggshell membrane</i> ”)
LOM	Microscopía óptica de luz
SEM	Microscopía electrónica de barrido
AFM	Microscopía de fuerza atómica
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
TGA	Análisis termogravimétrico
DSC	Calorimetría de barrido diferencial
$\sigma(t)$	Esfuerzo de tensión
$l(t)$	Longitud de probeta

δ	Deformación
E	Módulo de Young (módulo elástico)
E_n	Módulo de Young de la red
E_f	Módulo de Young de la fibra
ν	Modulo de Poisson
k	Constante de resorte de cantiléver del AFM
α	Ángulo de punta de cantiléver del AFM
z	Altura en la aproximación en el AFM
d	Deflexión del cantiléver del AFM
$\varepsilon(t)$	Deformaciones oscilatorias en el rómetro
ω	Periodo
G	Modulo de corte
G'	Modulo de almacenamiento (en corte)
G''	Modulo de perdidas (en corte)
K	Constantes empírica de ley de potencia
n	Exponente empírico de ley de potencia
A_1	Constante empírica
λ	Ratio de estiramiento
C_1	Constante de ecuación de Mooney
C_2	Constante de ecuación de Mooney
σ_T	Esfuerzo real
T	Temperatura
R	Constante universal de los gases
ρ	Densidad

WLC	Modelo “ <i>Worm like chain</i> ”
ANOVA	Análisis de la varianza
PET	Tereftalato de polietileno
DGM	Músculo del manto del calamar gigante <i>D. gigas</i>
EDX	Espectrometría de rayos X de energía dispersiva
RSS	Ablandamiento por esfuerzo reversible (<i>reversible stress softening</i>)

Capítulo 1

Introducción

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas biológicos cuentan con materiales que cumplen diversas funciones como las de protección mecánica, barreras químicas (membranas de células), reserva de iones (huesos), funciones catalíticas (enzimas), transformación de energía química en energía cinética (músculos), soporte mecánico, entre otros.

A diferencia de los materiales sintéticos, los materiales de origen biológico se auto-ensamblan (*self-assembled materials*). Aunque el término auto-ensamblaje no tiene una definición formal, Whitesides y Grzybowski (2012) lo definen como un proceso que utiliza componentes pre-existentes (partes separadas o distintas de una estructura), reversible y que puede ser controlado por el diseño apropiado de sus componentes.

Tabla 1. Comparación entre materiales biológicos y materiales de ingeniería. Adaptado de Frantz et al. (2007).

Material Biológico	Material de Ingeniería
Elementos livianos denominados: C, N, O, H, Ca, P, S, Si,...	Gran variedad de elementos: Fe, Cr, Ni, Al, Si, C, N, O,...
Crecimiento por autoensamblaje biológicamente controlado (diseño aproximado)	Fabricación a partir de fundidos, polvos, soluciones, etc. (diseño exacto)



Estructura jerárquica en todos los niveles de tamaño	Formación (de la pieza) y Microestructura (del material)
Adaptación de la forma y estructura a la función	Selección del material de acuerdo a la función
Modelado y Remodelado: Capacidad de adaptación a condiciones ambientales cambiantes	Diseño seguro (teniendo en cuenta posibles cargas máximas, así como la fatiga)
Curación: Capacidad de auto repararse	

Frantz et al. (2007) presentan una comparación entre los materiales auto-ensamblados y los materiales de ingeniería (Tabla 1). Es importante notar que la gran cantidad de funciones que cumplen los materiales biológicos se logran usando pocos elementos (si se compara con la cantidad de elementos que se usan para la fabricación de materiales de ingeniería).

Las propiedades mecánicas de muchos materiales biológicos dependen del ensamblaje de sus elementos estructurales. Algunas estructuras están formadas por diferentes tipos de fibras en una red con determinada geometría. La geometría específica de estas redes está determinada tanto por las propiedades individuales de las fibras como por la de los enlaces que mantienen las fibras unidas. Un ejemplo claro de este tipo de redes se encuentra en las redes de filamentos de proteínas de la matriz extracelular y el citoesqueleto de las células. Entre las fibras que forman estas redes de biopolímeros importantes para el funcionamiento de los tejidos

biológicos se encuentra la elastina, fibrina, colágeno, actina, filamentos intermedios, etc.

La importancia de conocer las propiedades de este tipo de redes puede ser ejemplificada al estudiar algunas de las enfermedades presentes en los tejidos biológicos. De hecho, muchas enfermedades están asociadas a algún tipo de cambio en las propiedades mecánicas de los componentes de los tejidos afectados. Por ejemplo, el enfisema, una enfermedad crónica de los alveolos pulmonares, se caracteriza por una pérdida de la elasticidad de dicho tejido inducida por cambios bioquímicos en la matriz extracelular. Los tejidos de los pulmones sanos tienen un módulo elástico de alrededor de 5 -30 kPa. En cambio, el módulo elástico de tejidos enfermos disminuye en alrededor del 40% (Kononov et al., 2001).

De la misma forma, se ha reportado que las propiedades mecánicas de la matriz extracelular y las células epiteliales varían en caso de cáncer de mama. La glándula mamaria tiene una rigidez de alrededor de 150 Pa mientras que las que están afectadas por cáncer tienen una rigidez de 4000 Pa (Paszek et al., 2005). Otras enfermedades que influyen en las propiedades mecánicas de los tejidos y células incluyen escleroderma (Enomoto et al., 1996), arterioesclerosis y enfermedades coronarias (Liao et al., 1999).

En el presente trabajo se estudian tres sistemas distintos: el bisco de mejillón, la membrana interna de los huevos y el músculo del manto del calamar gigante. Estos tres sistemas tienen en común el hecho de tener el colágeno como parte importante de su

estructura. Los bisos de mejillones son un ejemplo de fibras constituidas por colágeno, mientras que la membrana de huevo es una red coherente bidimensional formada por fibras individuales y el músculo del calamar gigante es una red tridimensional.

El trabajo consistió en caracterizar los sistemas para luego analizar su comportamiento mecánico en función de cómo están contruidos (características morfológicas) y en qué ambiente trabajan (influencia del medio, temperatura, humedad). Como parte del análisis de los resultados se utilizaron modelos de la ciencia de materiales como la ecuación de Mooney-Rivlin para establecer si podían describir satisfactoriamente el comportamiento de los sistemas estudiados. Con este estudio se pretende avanzar hacia la posible construcción de un modelo general que describa las propiedades mecánicas de los biopolímeros nanoestructurados.

Capítulo 2
**Revisión de la
Literatura**

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. El colágeno

El colágeno es el componente principal de la piel y de muchos otros tejidos, incluyendo tendones, huesos, dientes y cartílago (Hellmich & Ulm, 2002). Debido a su importancia, el colágeno y sus componentes han sido ampliamente estudiados. Diversos estudios describen las moléculas de colágeno como varillas delgadas con una longitud de 280-300 nm. Dichas moléculas están formadas por tres cadenas de polipéptidos dispuestas en una estructura de triple hélice (Boedtker & Doty, 1956; Hall & Slayter, 1959). La Tabla 2.1 lista diferentes tipos de colágeno que forman parte de una variedad de tejidos.

Tabla 2.1. Localización y estructura de los diferentes tipos de colágenos (Mayne & Burgeson, 1987)

Tipo	Estructura Molecular	Estructura Supermolecular	Localización
I	300 nm	Fibrillas 67-nm anilladas	Piel, tendón, hueso, etc.
II	300 nm	Fibrillas pequeñas 67-nm anilladas	Cartílago, humor vítreo,
III	300 nm	Fibrillas pequeñas 67-	Piel, músculo, etc.

Tipo	Estructura Molecular	Estructura Supermolecular	Localización
		ηm anilladas	
IV	390 ηm C dominio globular	Red no fibrilla	Todas las membranas basales
V	300 ηm N dominio globular	Fibras pequeñas	Mayoría de tejidos intestinales
VI	150 ηm N + C dominio globular	Microfibrillas, fibrillas 100 ηm anilladas	Mayoría de tejidos intestinales
VII	450 ηm	Dímero	Fibrillas de anclaje
VIII	?	Red hexagonal	Algunas células endoteliales
IX	200 ηm N dominio globular	FACIT	Cartílago
X	150 ηm C dominio globular	Red hexagonal	Cartílago hipertrófico y mineralizado
XI	300 ηm	Fibras pequeñas	Cartílago

Los colágenos tipo I, II, III, V y XI son los que forman fibras debido a su capacidad de ensamblarse en agregados

supramoleculares altamente orientados. En la Figura 2.1 se aprecian fibrillas de colágeno. Dichas fibrillas muestran un patrón de bandas característico, con una periodicidad de aproximadamente 70 nm, basado en una disposición escalonada de los monómeros de colágeno individuales (Hulmes & Miller, 1981).

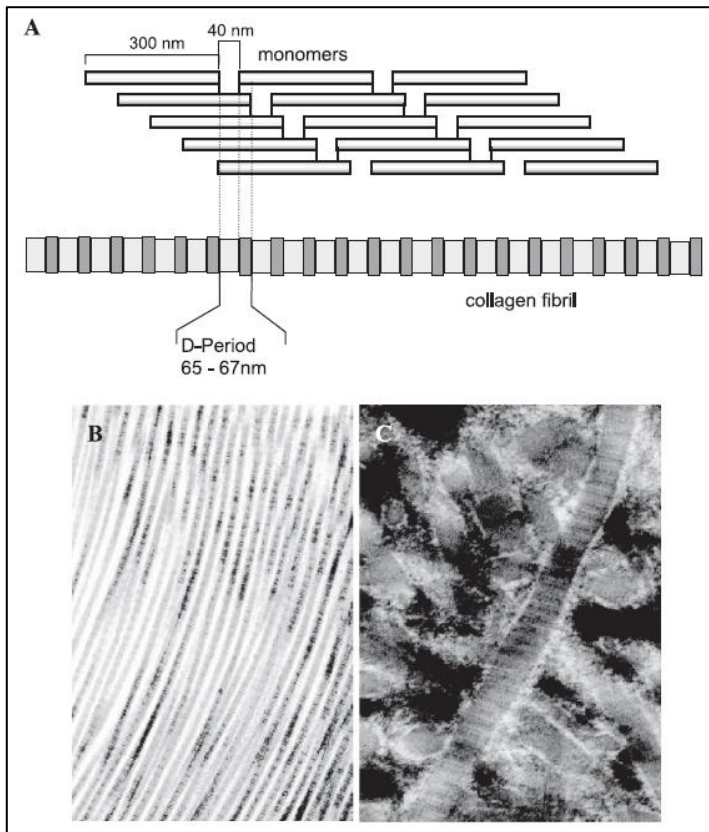


Figura 2.1. Representación esquemática de la estructura supramolecular de las fibrillas de colágeno (A). Fibrillas dispuestas en el tendón normal (B) y el cartílago articular (C). Tomado de (Gelse et al., 2003)

El colágeno tipo I (Figura 2.2) es el colágeno más abundante. Forma más del 90% de la masa orgánica del hueso y es el principal colágeno de tendones, piel, ligamentos, córnea, y muchos tejidos conectivos intersticiales. Se encuentra presente en compuestos junto con colágeno tipo III (piel y fibras reticulares) (Fleischmajer et al., 1990) o colágeno tipo V (hueso, tendón, córnea) (Niyibizi & Eyre, 1989).

Los otros tipos de colágeno forman parte de diferentes tejidos. Por ejemplo, el colágeno tipo II es el componente predominante y característico del cartílago hialino. Además, se encuentra en el epitelio corneal y el núcleo pulposo de los discos intervertebrales (von der Mark, 1999). El colágeno tipo III se distribuye ampliamente en los tejidos que contienen colágeno I con excepción del hueso (Rossert & Crombrughe, 2002). Es un componente importante de las fibras reticulares en el tejido intersticial de los pulmones, el hígado y la dermis (von der Mark, 1981).

Por otro lado, el colágeno tipo V forma hetero-fibrillas junto con los colágenos tipos I y III. Se encuentra en la matriz orgánica del hueso, estroma de la córnea, la matriz intersticial de los músculos, el hígado, los pulmones, y la placenta (Birk et al., 1988). El colágeno tipo XI es co-distribuido en gran medida en el cartílago articular con colágeno de tipo II (von der Mark, 1999, Mayne, 1989).

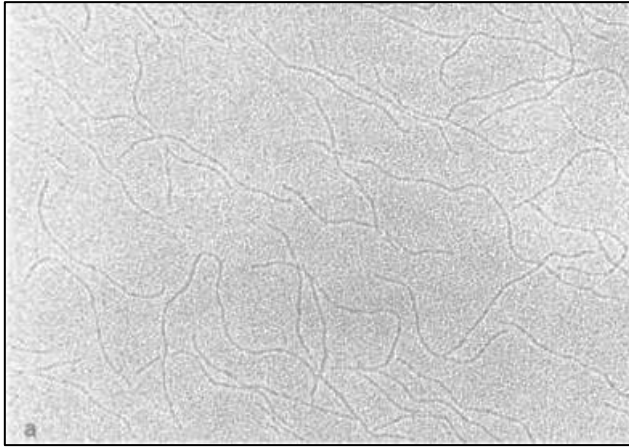


Figura 2.2. Microscopía electrónica de una molécula de colágeno tipo I. Tomado de (Mayne & Burgeson, 1987).

El colágeno, como muchos otros materiales biológicos, tiene una estructura jerárquica (Bhattacharjee & Bansal, 2005). La Figura 2.3 muestra un esquema de las diferentes jerarquías de diseño, que van desde la escala nanoscópica de polipéptidos a fibras de colágeno microscópicas (Borel & Monboisse, 1993). Cada molécula de tropocolágeno muestra una disposición espacial de tres polipéptidos. Estas tres moléculas (polipéptidos) están dispuestos en una estructura helicoidal, estabilizada principalmente por puentes de hidrógeno entre diferentes aminoácidos (glicina, prolina e hidroxiprolina).

Los tejidos ricos en colágeno están contruidos a partir de fibrillas de colágeno como bloques de construcción primarios. Estas fibrillas tienen un espesor en el rango de 50 a unos cientos de nanómetros y son ensambladas en una forma jerárquica en estructuras macroscópicas. La Figura 2.4 muestra un esquema de la

estructura jerárquica del tendón. En el nivel más bajo se encuentran las moléculas de colágeno con una longitud de aproximadamente 300 nm. Dichas moléculas se ensamblan por medio de un escalonamiento paralelo en fibrillas de 50-500 nm de diámetro. Las fibrillas se agrupan en fascículos que, a su vez, se agrupan para formar las fibras de tendones.

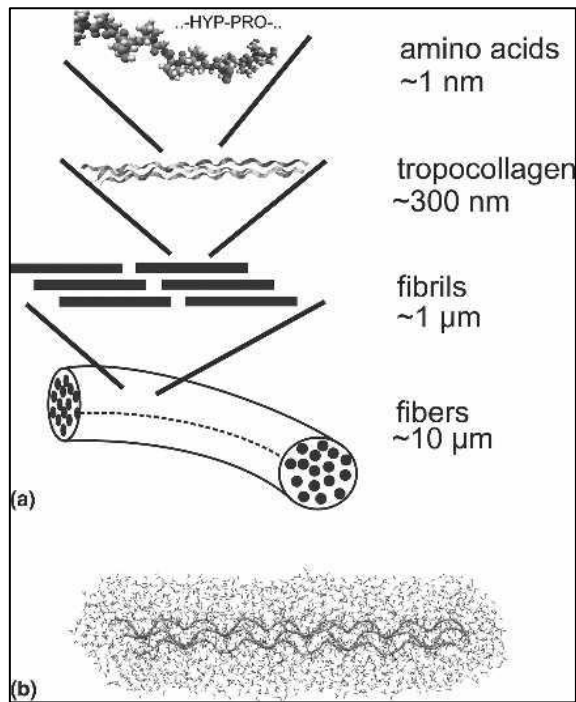


Figura 2.3. (a) Vista esquemática de algunas de las características jerárquicas de colágeno, que van desde el aminoácido, el nivel de polipéptido hasta la escala de las fibras de colágeno. (b) El colágeno estructura helicoidal triple, inmerso en un medio de moléculas de agua. Tomado de Buehler (2006).

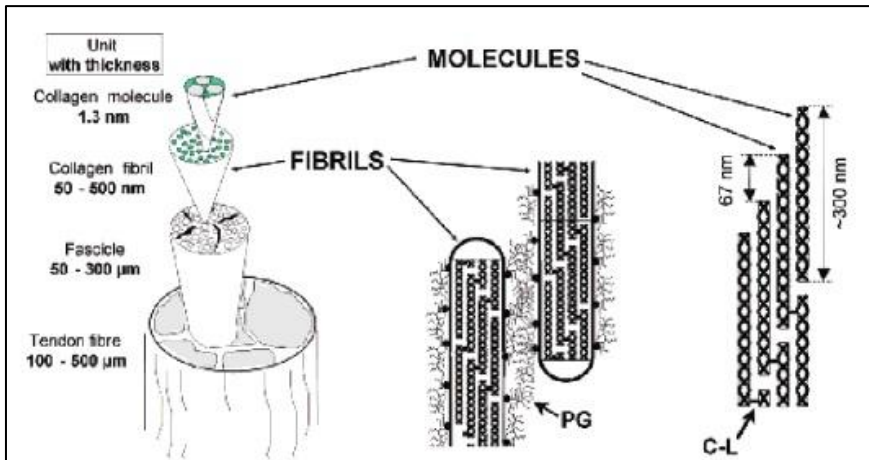


Figura 2.4. Esquema de la estructura jerárquica del tendón. Tomado de Fratz (2008).

La estructura jerárquica de los tejidos formados a partir de colágeno tiene una influencia en las propiedades mecánicas de dichos tejidos. En la Figura 2.5 se muestra las curvas típicas de tensión-deformación de un tendón de cola de ratón (Misof et al., 1997) y de un hueso de fémur bovino (Gupta et al., 2006) sometidos a tracción en dirección de las fibras de colágeno. La diferencia en el comportamiento mecánico entre el tendón y el hueso mostrado en la Figura 2.5 ha sido atribuida al hecho de que el hueso está mineralizado. La inclusión de pequeñas partículas minerales de fosfato de calcio modifica considerablemente la rigidez del tejido. El módulo elástico del tendón de la Figura 2.5 es de alrededor de 1GPa mientras que el módulo elástico del hueso es de alrededor de 20GPa.

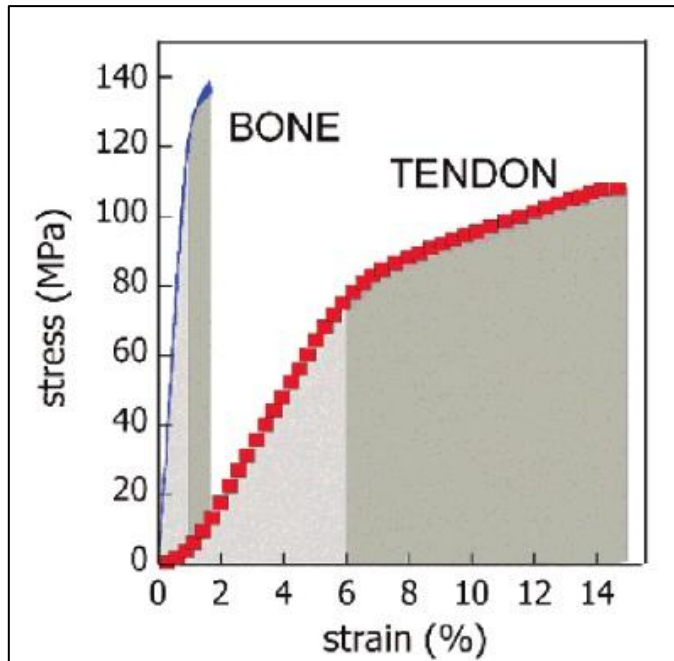


Figura 2.5. Curva típica de tensión-deformación de tendón de hueso. Tomado de Fratzl (2008).

En el caso de los huesos, el colágeno por sí solo no es suficiente para proporcionar la rigidez necesaria para soportar cargas de compresión. La rigidez adecuada es proporcionada por la inclusión de nanopartículas minerales. La fase mineral ocupa aproximadamente la mitad del volumen en el hueso cortical (hueso compacto y no poroso). En la Figura 2.6 se muestra un ejemplo de hueso cortical de un fémur humano. El bloque de construcción primario es la fibrilla de colágeno mineralizado con una estructura muy similar a la encontrada en el tendón de la Figura 2.4 pero conteniendo nanopartículas de hidroxiapatita aplanadas de 2-4 nm.

Estas fibrillas son luego ensambladas en una forma similar al contrachapado (Weiner & Wagner, 1998). Las propiedades mecánicas del hueso y dentina dependerán a gran medida en el grado de mineralización y en la arquitectura de la fibra.

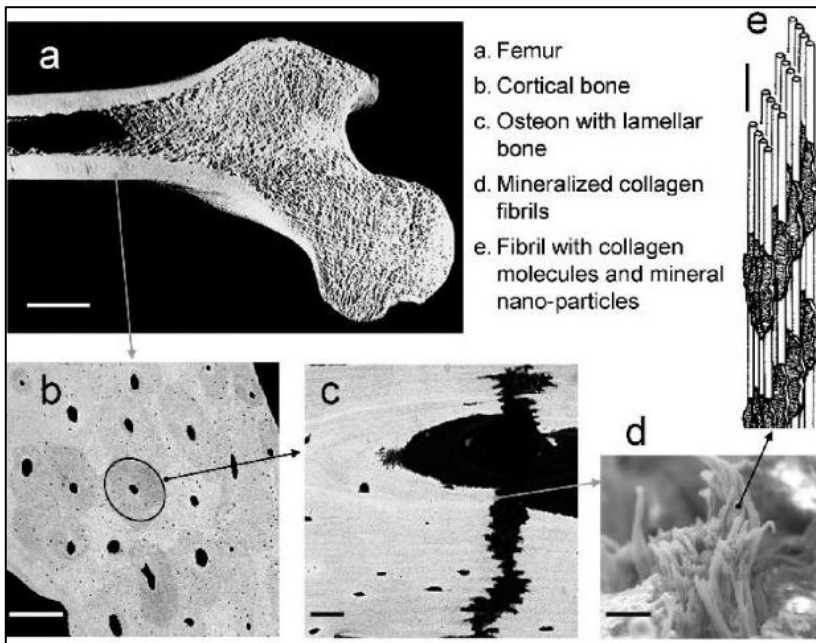


Figura 2.6. Estructuras jerárquicas del hueso cortical. Las longitudes de las barras son de 20 mm, 200 μm , 20 μm , 2 μm y 100 nm, (a)-(e) respectivamente. Tomado de Fratzl (2008).

Otros tejidos orgánicos ricos en colágeno tienen que cumplir funciones diferentes. En el caso de la córnea, por ejemplo, el tejido no solo confiere estabilidad mecánica para el bulbo del ojo, sino que también debe ser transparente, lo que impone ciertos límites

estructurales en el tejido. La piel y las paredes de las arterias deben ser flexibles pero además las arterias deben resistir la presión sanguínea. Esto implica un arreglo diferente de las fibrillas de colágeno que en este caso se combinan con moléculas elastoméricas, como la elastina.

2. El biso de mejillón

Los mejillones (Figura 2.7) son animales invertebrados acuáticos que viven en agua dulce o salada. Su anatomía se caracteriza por tener dos conchas que están unidas por un ligamento y se cierran con fuertes músculos internos. Internamente, los mejillones tienen un órgano de gran tamaño llamado “pie” que se utiliza para la locomoción del mejillón. Las fibras de biso son secretadas por este “pie” y son responsables de la inmovilización del mejillón a la superficie de un sustrato adecuado como una roca.



Figura 2.7. Mejillón de la especie *Aulacomya Ater* usado en este estudio.

En el pie del mejillón se encuentran tres glándulas principales: la glándula formadora del tallo, la glándula formadora del biso y la glándula formadora de la placa adhesiva. La primera glándula forma el tallo, un tejido orgánico que soporta todos los bisos sirviendo como una conexión entre el pie y las fibras de biso.

Los bisos son fibras usadas por los mejillones para fijarse a rocas y otros sustratos. La Figura 2.8 muestra un esquema general donde se puede apreciar las disposición de los bisos y cómo salen del mejillón para adherirse a sustratos como rocas, piedras y otros mejillones. Se aprecia también que la placa adhesiva de los bisos está situada en el extremo distal de dichas fibras. La Figura 2.9

muestra un grupo de bisos adheridos a rocas. Se puede ver que todos los bisos salen del tallo. El número total de fibras a lo largo del tallo varía de mejillón a mejillón, y aumenta con la turbulencia del agua (Moeser & Carrington, 2006). Un gran número de bisos permiten al mejillón unirse a varias superficies.

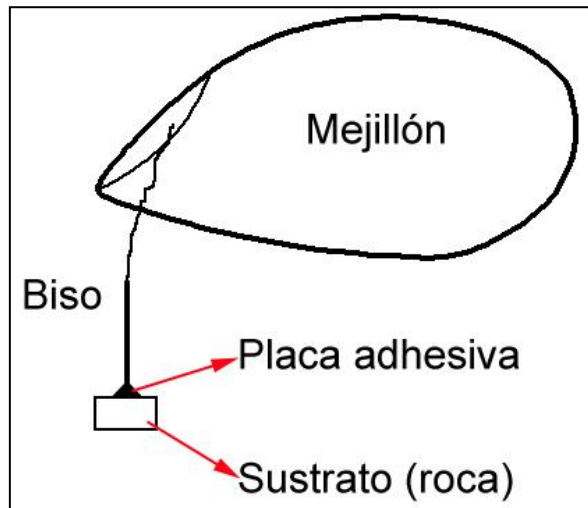


Figura 2.8. Esquema de sujeción del mejillón a un sustrato. La posición del mejillón se mantiene fija gracias a que los bisos terminan en una placa adhesiva que se sujeta a rocas u otros sustratos cercanos.

Son dos las características que han llamado la atención de los investigadores con respecto a los bisos de mejillones. En primer lugar, las propiedades mecánicas de los bisos y, en segundo lugar, las proteínas adhesivas que utilizan para fijarse a las rocas.

La resistencia y extensibilidad de dichas fibras permiten a los mejillones soportar las fuerzas producidas por el golpe de las olas a velocidades mayores a 10 m/s y aceleraciones de aproximadamente 400 m/s². Su tenacidad es seis veces mayor que la del tendón humano y es comparable con la tenacidad del Kevlar® y las fibras de carbono. Con olas suaves, las fibras de biso proporcionan una respuesta elástica, que permite a los mejillones se muevan libremente con las olas. Con olas violentas, bisos son capaces de disipar la energía y aumentar la fuerza de fijación (Carrington & Gosline, 2004). Sin estas propiedades, los mejillones se estrellarían contra las rocas.



Figura 2.9. Detalle de un grupo de bisos adheridos a rocas. Se puede apreciar que los bisos salen del tallo del mejillón.

Las propiedades adhesivas de fibras de biso permiten que los mejillones se unan a sustratos duros y blandos en ambientes acuáticos utilizando las proteínas adhesivas situadas en unas placas que se encuentran en el extremo final (distal) de los bisos. Estas placas contienen al menos seis tipos diferentes de proteínas adhesivas que han generado un gran interés por sus aplicaciones potenciales.

Se han estudiado los bisos de diferentes especies de mejillón incluyendo *Modiolus modiolus*, *Geukensia demissa*, *Bathymodiolus thermophilus*, *Dreissena polymorpha*, *Aulacomya ater* y *Perna canaliculus* (Brazee & Carrington, 2006; Aldred et al., 2006; Pearce & LaBarbera, 2009; Troncoso et al., 2008). Los bisos de mejillones del género *Mytilus* como *Mytilus edulis*, *M. californianus*, *M. galloprovincialis*, *M. coruscus* y *M. trossulus* también han recibido una atención considerable (Brazee & Carrington, 2006; Allen et al., 1976; Smeathers & Vincent, 1979; Martínez-Lage et al., 1995; Sun et al., 2002; Gosling, 1992; Bell & Gosline, 1996). Los resultados muestran que las fibras de biso de estos géneros tienen composición y estructura similares.

Sin embargo, los bisos producidos por diferentes especies de mejillones no son exactamente iguales (Brazee & Carrington, 2006). Las diferencias encontradas en las propiedades mecánicas del biso de mejillón de diferentes especies están probablemente relacionadas con las adaptaciones que ayudan a los mejillones sobrevivir en diferentes ambientes (Harrington & Waite, 2007). El flujo, la salinidad y la temperatura están entre los factores

ambientales estudiados por su influencia en las propiedades mecánicas del biso de mejillón (Lee et al., 1990; Seed & Suchanek, 1992; Dolmer & Svane, 1994). Por ejemplo, las fibras de biso de *M. californianus* tienen una resistencia a la tracción mayor que la de los bisos de *M. edulis* (Harger, 1970; Witman & Suchanek, 1984). La unión adhesiva de *M. galloprovincialis* es más fuerte que la de *M. edulis* (Gardner & Skibinski, 1991; Wills & Skibinski, 1992). Incluso la temporada y la exposición al oleaje, son factores que afectan la fuerza de unión dentro de las especies específicas (Witman & Suchanek, 1984; Price, 1980; Price, 1982).

Los bisos están formados principalmente por proteínas y agua. En el caso de *M. edulis*, se ha reportado que los bisos de dicha especie contienen alrededor de 70% de agua, en peso. Del peso seco, la proteína es de aproximadamente el 96% (Waite, 2002). Además, se han encontrado pequeñas cantidades de residuos inorgánicos tales como cenizas, pesados y metales de transición (Coombs & Keller, 1981).

El colágeno es la principal proteína que se encuentra en el biso de mejillón y componen la mayor parte del núcleo de dichas fibras (Waite, 2002, Qin et al., 1997; Qin & Waite, 1998; Coyne et al., 1997). Son tres los tipos de colágeno presentes: Col-D, Col-P y Col-NG. El Col-D es un homotrímero con peso molecular de 60 kDa, mientras que el Col-P tiene peso molecular de 55 kDa (Qin & Waite, 1998). Extractos del pie de mejillón han sido utilizados para identificar precursores de Col-P y Col-D. Los precursores se

denominan PreCol-P, PreCol-D y PreCol-NG. Estos precursores tienen tres grandes dominios: un dominio de colágeno central, flanqueado a ambos lados por los dominios estructurales. Estos dominios estructurales asemejan a la elastina en el PreCol-P, a la espidroína de la seda de araña en el PreCol-D, y las proteínas de la pared celular ricas en glicina en el PreCol-NG (Qin & Waite, 1998).

Los bisos tienen un núcleo fibroso cubierto por una cutícula protectora delgada. El espesor de esta cutícula oscila entre 2 y 4 μm (Holten-Anderson et al., 2007). Las proteínas cuticulares muestran secuencias altamente repetitivas, dominadas por prolina / hidroxiprolina, lisina y 3,4-dihidroxifenil-L-alanina (DOPA) (Sun & Waite, 2005; Zhao & Waite, 2005). La función de la cutícula es proteger a las fibras de colágeno subyacentes de la abrasión y el ataque microbiano (Holten-Anderson et al., 2007).

Se ha demostrado que existen secuencias ricas en histidina en las regiones terminales de los preCol en el biso de mejillón. Se piensa que las histidinas forman enlaces reversibles con iones de metales de transición tales como zinc (II) y cobre (II). Tales enlaces son reversibles pero poseen sólo la mitad de la fuerza de un enlace covalente (Lee et al., 2006). Además, se piensa que las histidinas juegan un papel integral como enlaces de sacrificio en el rendimiento y auto sanación en la región distal del biso (Waite et al., 2004).

La placa adhesiva situada en el extremo de la fibra está formada por al menos seis tipos diferentes de proteínas conocidas como

"proteínas de pies" (FP por sus siglas en inglés). Estas proteínas toman los nombres de las especies de mejillones donde se han encontrado. Por ejemplo, se han aislado cinco tipos diferentes de proteínas de la placa adhesiva del mejillón de la especie *M. edulis* nombradas como MEFP-1, MEFP-2, MEFP-3, MEFP-4 y MEFP-5 (Inoue et al., 1995; Papov et al., 1995; Rzepecki et al., 1992; Waite, 1983).

En el biso de la mayoría de especies de mejillones se pueden diferenciar dos regiones: una región proximal y otra distal. La región proximal tiene una superficie corrugada, es flexible y representa aproximadamente un tercio de la longitud total del biso, mientras que la región distal es más lisa, más estrecha, rígida y tiene aproximadamente el doble de la longitud de la región proximal.

Estas dos regiones se han identificado en bisos de *M. californianus*, *M. edulis*, *M. trossulus* y *M. galloprovincialis* (Carrington & Gosline, 2004) (Tabla 2.2). Algunas especies de mejillones no muestran diferencias entre los extremos proximal y distal. A modo de ejemplo, los bisos de mejillones sudamericanos *Aulacomya ater* no muestran diferencias morfológicas a lo largo de toda la fibra. Además, se han reportado problemas cuando se trata de caracterizar estas dos regiones del biso de *Bathymodiolus thermophilus*, *Geukensia demissa* y *Dreissena polymorpha* (Carrington & Gosline, 2004).

Tabla 2.2. Longitud de la región distal de biso de diferentes especies de mejillones. Tomado de Bell & Gosline (1996)

Especie	Longitud del biso (cm)	Longitud de la región distal (% de la longitud total)
<i>M. californianus</i>	3.1	78.8
<i>M. trossulus</i>	1.6	73.6
<i>M. galloprovincialis</i>	2.5	65.2
<i>M. edulis</i>	3.1	56

En los bisos en los que se puede distinguir la existencia de estas dos regiones, la parte distal es aproximadamente 10 veces más rígida que la parte proximal (Bell, 1996) y está formado por 2 colágenos conocidos como COL-D y COL-NG. En cambio, la parte proximal está formada por colágeno COL-P y COL-NG (Zhao & Waite, 2006).

La Figura 2.10 muestra curvas representativas de esfuerzo-deformación de las regiones distal y proximal de biso. Se observa que el módulo de elasticidad de la región distal es mayor que el módulo de la región proximal. Además, el esfuerzo máximo de rotura de la región distal es mayor que el esfuerzo último de la región proximal. En cambio, la deformación en el punto de rotura de la región distal es menor que la deformación máxima de la región proximal.

Tabla 2.3. Módulo elástico, esfuerzo máximo y deformación máxima de bisos de *M. californianus*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* y *M. edulis*.

Especie	Módulo elástico (MPa)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación máxima
Región distal			
<i>M. californianus</i>	868.6	73.3	1.09
<i>M. trossulus</i>	109.3	56.2	0.79
<i>M. galloprovincialis</i>	300.4	-	-
<i>M. edulis</i>	<0.005	0.15	<0.001
Región proximal			
<i>M. californianus</i>	15.6	34.6	1.97
<i>M. trossulus</i>	20.6	20.3	1.65
<i>M. galloprovincialis</i>	26.4	17.1	1.64
<i>M. edulis</i>	-	33	-

Los resultados de las pruebas de tracción de bisos de varias especies de mejillones están listados en la Tabla 2.3. Para todas las especies, las regiones distales tienen un módulo elástico mucho mayor (100-900 MPa) que el de las regiones proximales (15-30 MPa). Los resultados muestran que los módulos distales son alrededor de dos veces mayores que los módulos proximales. En cambio, la deformación máxima de las regiones proximales es el doble de la deformación máxima de las regiones distales.

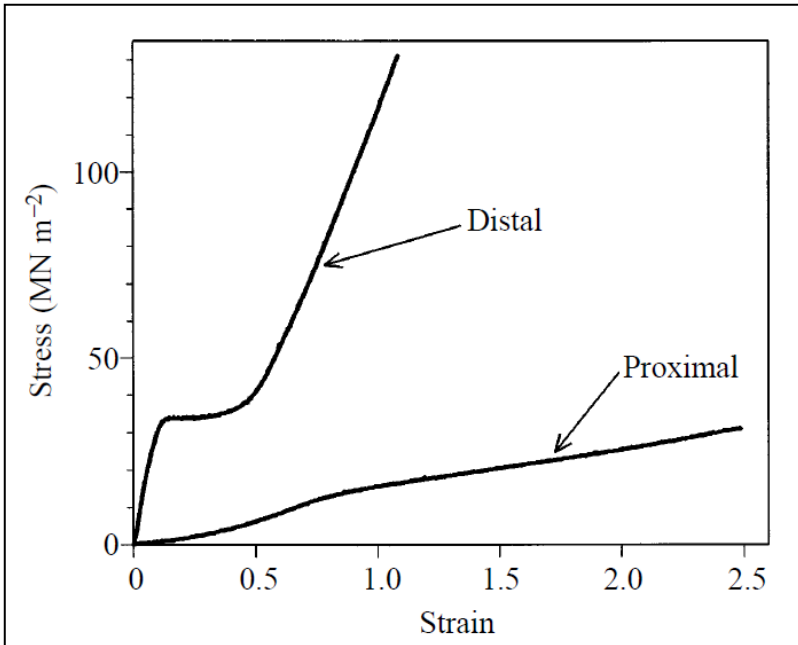


Figura 2.10. Curvas de esfuerzo-deformación de la región distal y la región proximal de bisos de mejillones de la especie *Mytilus californianus*. Tomado de Bell & Gosline (1996).

Los valores del módulo elástico varían según la especie de mejillón. El módulo elástico de la región distal del biso del mejillón *M. californianus* es de 3 a 8 veces mayor al de las otras especies analizadas en la Tabla 2.3.

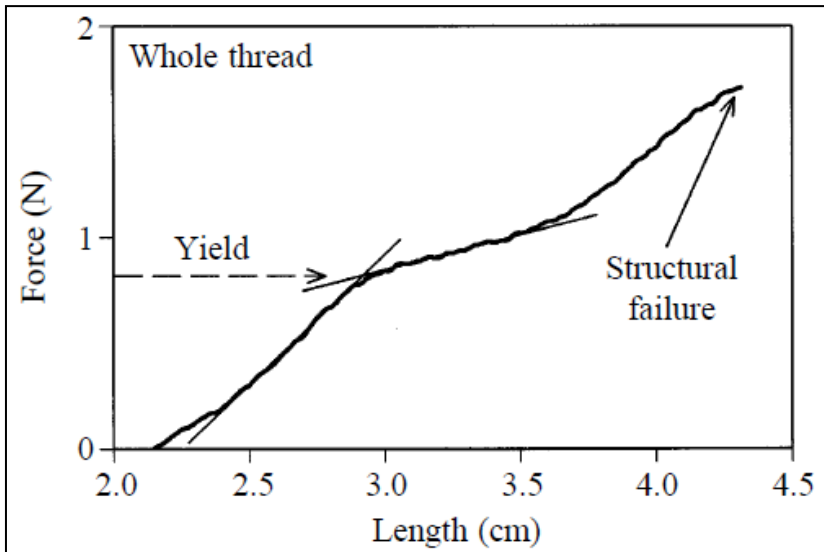


Figura 2.11. Curva representativa de esfuerzo-longitud para un biso entero de *M. californianus*. Tomado de Bell & Gosline (1996).

El comportamiento mecánico de un biso entero del mejillón de la especie *M. californianus* (sin separar las regiones distal y proximal) se puede apreciar en la Figura 2.11. En este caso, la curva de fuerza-longitud tiene una región rígida inicial, seguida por una región que muestra una menor rigidez. Al comparar la gráfica de la Figura 2.11 del biso entero con las gráficas de la región distal y proximal puede intuirse que el comportamiento del biso entero es dominado en un inicio por el comportamiento de la región distal y, en seguida, por el comportamiento de la región proximal. En el caso de los bisos en los que no se encuentra dos regiones definidas (distal y proximal), la curva de fuerza-longitud de todo el biso es

diferente a la curva mostrada para el caso del biso de *M. californianus*.

3. Redes de fibras en 2D: la membrana de huevo

La membrana de huevo (ESM, por sus siglas en inglés) es un tejido que se encuentra entre el cascarón y la clara de los huevos (Figura 2.12). Está constituida por una red bidimensional de fibras que forman una estructura porosa interconectada (Figura 2.13). Se ha reportado que dicha membrana está compuesta principalmente por colágeno tipo I, V y X. Además, se encuentran presentes proteínas como osteopontina, sialoproteína y queratina (Leach, 1982; Nakano et al., 2003).

La membrana del huevo está compuesta a su vez por dos membranas, una interna (en contacto con la clara) y otra externa (en contacto con el cascarón). La Tabla 3 lista los aminoácidos encontrados en las membranas interna y externa de la ESM, junto con los presentes en la cáscara de huevo. Nakano y colaboradores (Nakano et al., 2003) han encontrado que los contenidos de todos los aminoácidos (excepto la glicina, alanina, leucina, prolina, hidroxiprolina) son similares entre las membranas de la cáscara de huevo y cáscara descalcificada.

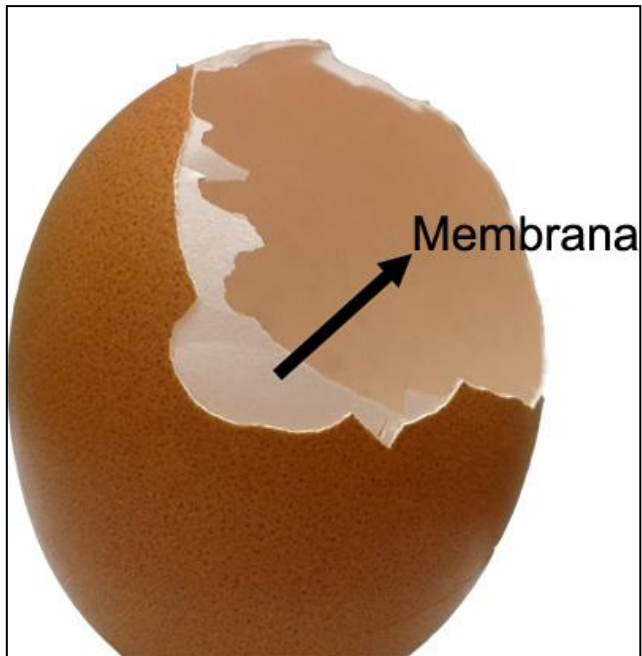


Figura 2.12. Imagen que muestra la membrana de huevo. La membrana se sitúa entre el cascarón y la clara

Tabla 2.3. Aminoácidos presentes en el cascarón descalcificado de huevo, membrana externa e interna de huevo. Adaptada de Nakano et al. (2003).

Aminoácido	Cascarón de huevo descalcificado	Membrana interna	Membrana externa
	Mol %		
Asx	8.1 ± 0.1	8.4 ± 0.4	8.8 ± 0.1
Thr	6.2 ± 0.1	6.9 ± 0.0	6.9 ± 0.2
Ser	9.7 ± 0.1	9.2 ± 0.2	9.2 ± 0.0
Glx	11.8 ± 0.2	11.1 ± 0.4	11.9 ± 0.3
Gly	13.0 ± 0.3	11.1 ± 0.2	10.6 ± 0.2
Ala	6.9 ± 0.4	4.6 ± 0.2	4.1 ± 0.2
Val	7.3 ± 0.1	7.2 ± 0.2	7.9 ± 0.1
Met	2.0 ± 0.2	2.3 ± 1.0	2.3 ± 1.0
Ile	2.6 ± 0.1	3.3 ± 0.4	3.4 ± 0.1
Leu	6.1 ± 0.2	5.6 ± 0.5	4.8 ± 0.2
Tyr	1.8 ± 0.1	2.2 ± 0.1	1.7 ± 0.3
Phe	2.1 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1
His	4.2 ± 0.1	4.1 ± 0.4	4.3 ± 0.4
Lys	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2
Arg	5.9 ± 0.1	5.7 ± 0.3	5.8 ± 0.2
Pro	8.3 ± 0.5	11.6 ± 0.7	12.0 ± 0.9
Hyp	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.4

No se dispone de estudios previos que hayan caracterizado las membranas de huevo desde el punto de vista de la ciencia de materiales. Pese a ello, se dispone de información relativa a las aplicaciones potenciales de dicha membrana debido a que se puede obtener fácilmente como un sub-producto de la industria alimentaria.

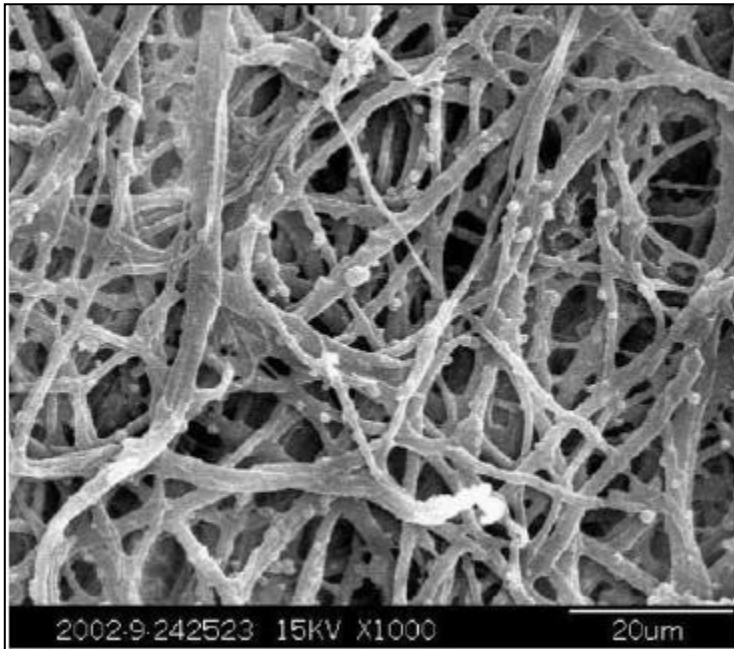


Figura 2.13. Imagen obtenida por microscopía de barrido electrónico de una membrana de huevo. Se puede apreciar que la membrana está formada por una red bidimensional de fibras. Tomado de Yi et al. (2004).

Se ha sugerido que algunas características de la membrana de huevo, como la estructura porosa interconectada y la capacidad para el transporte de nutrientes al embrión en desarrollo, podrían ser aprovechadas para diversas aplicaciones biomédicas. Se ha reportado su uso como membrana para la regeneración de huesos y como parche para el tratamiento de heridas (Durmus et al., 2003; Yang et al., 2003a; Maeda & Sasaki, 1982). Además, Tavassoli (Tavassoli, 1983) ha utilizado la membrana de huevo como un sustrato para el crecimiento celular debido a que su red bidimensional favorecería la adherencia de las células.

Otras aplicaciones reportadas incluyen el uso de la membrana de huevo como material para la inmovilización de enzimas en biosensores de glucosa (Choi et al., 2001), como una plantilla para la fabricación de redes de tubos de ZrO_2 (Yang et al., 2003b), como materia prima para la preparación de películas bioactivas, y para la adsorción de iones metálicos (Ishisawa et al., 2002).

4. Redes de fibras en 3D: el músculo del manto del calamar gigante

Para el presente trabajo se usó el músculo del manto del calamar gigante como un material modelo de una red tridimensional. Para ello, se usó la especie *Dosidicus gigas* (Figura 2.14). Dicha especie es una de las más grandes y abundantes de calamar gigante. Su hábitat se extiende desde California hasta el sur de Chile (Figura 11) (Nigmatullin et al., 2001; Nesis & Levitov, 1987; Taipe et al., 2001; Argüelles et al., 2008; Anderson & Rodhouse, 2001). Las agrupaciones más altas se producen en la costa peruana en el hemisferio sur y en el Golfo de California en el hemisferio norte (Taipe et al., 2001). El *D. gigas* pertenece a la subfamilia *Ommastrephinae*. La longitud del manto dorsal es de 1000-1200 mm y pesa de 30-50 kg.

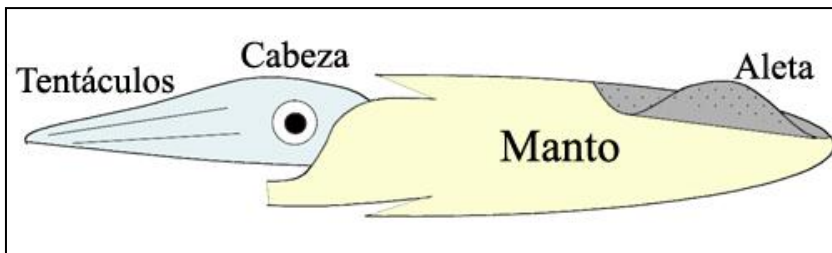


Figura 2.14. Esquema que muestra una visión general del calamar gigante. La morfología es similar a la del calamar común. Se puede apreciar el manto que es la parte de la cual se extrajeron las muestras para este estudio.

La mayoría de los estudios publicados sobre calamares gigantes reportan la caracterización biológica, la estacionalidad de la reproducción y distribución de las distintas especies (Nigmatullin et al., 2001; Zeidberg & Robinson, 2007; Markaida & Nishizaki, 2003; Gilly et al., 2006). Sólo unos pocos estudios han informado de las propiedades mecánicas del músculo del *D. gigas*. Esos estudios se han centrado en el uso de este calamar gigante como un recurso para la industria alimentaria (Campo-Deaño et al., 2009; Gómez-Guillen et al., 1996; Gómez-Guillen et al., 1997; Gómez-Guillen et al., 1998; Gómez-Guillen et al., 2002).

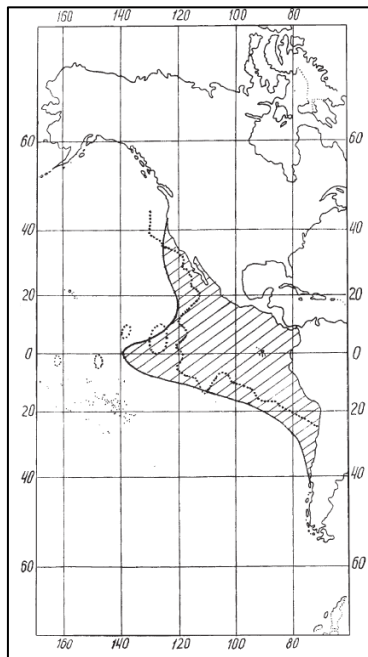


Figura 2.15. Mapa donde se muestra (sombreado con líneas) la zona donde abundan los *D. gigas*. Tomado de Nigmatullin et al. (2001)

Capítulo 3

Parte Experimental

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

1. Materiales

1.1. Biso de mejillones

Los bisos son fibras usadas por los mejillones para fijarse a rocas y otros sustratos. La Figura 3.1 muestra un esquema general donde se puede apreciar la fibra (biso) que al final tiene una placa adhesiva. Como se observa en la Figura 9, las fibras salen de un tallo común que está unido a un músculo dentro del mejillón.

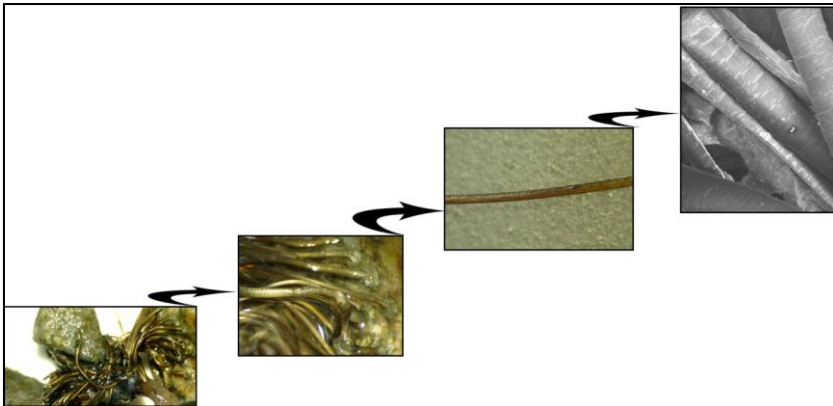


Figura 3.1. Detalle de los bisos de mejillones. Se puede apreciar cómo es que los bisos salen de un tallo común y cómo se adhieren a las rocas. En el presente estudio se utilizaron fibras individuales, seccionadas desde el tallo hasta la placa adhesiva.

Se utilizaron mejillones de la especie *Anlacomya ater* de longitudes entre 5 y 7 cm, los cuales fueron extraídos de una playa Lima (12°09'S; 77°01'W). Los bisos se extrajeron cuidadosamente con pinzas. Luego se limpiaron con agua destilada y fueron almacenados a 20 °C en agua destilada para su posterior uso. En promedio el diámetro de los bisos fue de $184 \pm 26.2 \mu\text{m}$.

1.2. Membrana de huevo

Llamaremos membrana de huevo a la membrana que recubre la parte interior del cascarón de los huevos. Esta membrana se encuentra entre la clara y la parte interior de dicho cascarón. En la Figura 3.2 se puede apreciar la posición de dicha membrana.

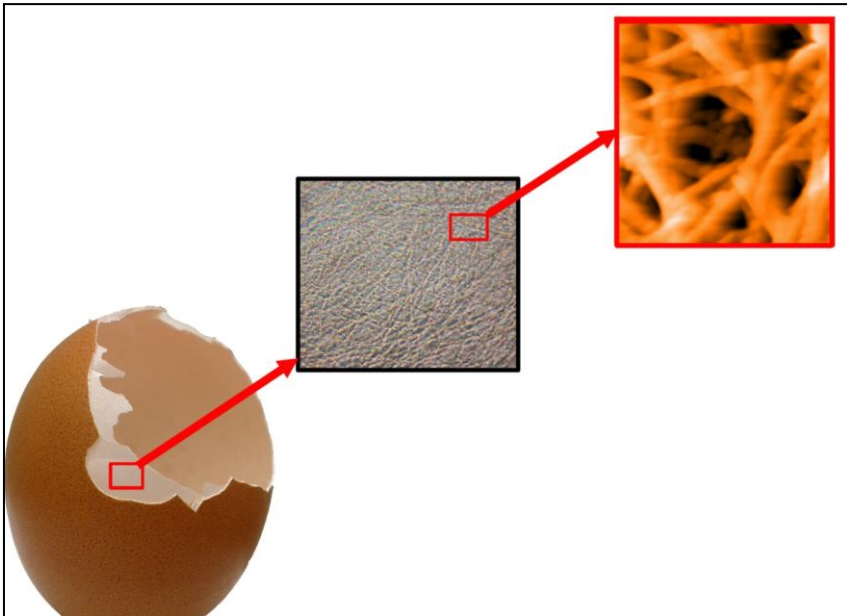


Figura 3.2. Detalle de extracción de la membrana de huevo. Se puede observar que dicha membrana se encuentra al interior del huevo, ente la clara y la parte interior del cascarón. Dicha membrana es una lámina delgada formada por fibras de colágeno.

La membrana de huevo fue obtenida de huevos de *Gallus gallus* de una línea de gallinas comerciales. Las membranas fueron cuidadosamente removidas usando pinzas, lavadas con agua destilada y posteriormente almacenadas en agua destilada o albumen (clara) de los mismos huevos utilizados para obtener la membrana. Las muestras fueron almacenadas a 10 °C para su posterior uso.

1.3. Manto de calamar gigante

El músculo del manto del calamar gigante de la especie *Dosicus Gigas* fue usado en este estudio. Un espécimen del calamar fue conseguido y llevado al laboratorio donde se extrajeron las muestras, se limpiaron y se conservaron refrigeradas a una temperatura de 10 °C. En la Figura 3.3 se observa el detalle de la zona de extracción de la muestra.

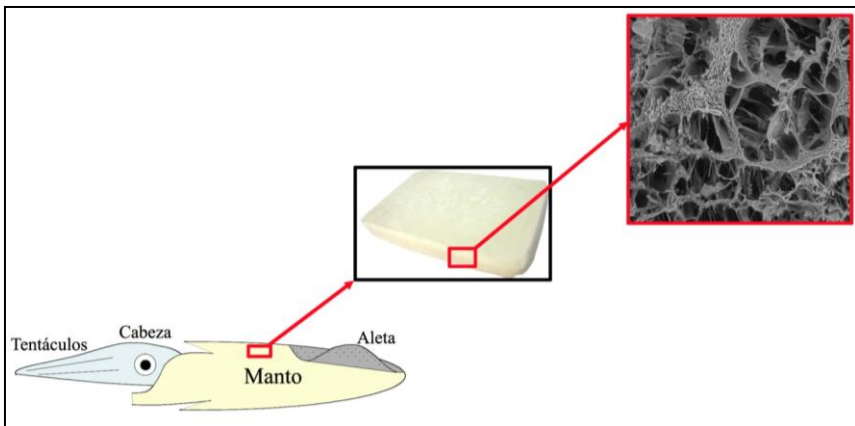


Figura 3.3. Esquema de calamar gigante. Las muestras fueron extraídas del manto que es la parte más grande del animal. Se usaron muestras del centro del manto, alejadas de la cabeza y las aletas.

2. Técnicas de caracterización

2.1. Morfología

Los estudios incluyeron el uso de microscopía óptica (LOM), microscopía estereoscópica, microscopía de barrido electrónico (SEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

Se utilizó un estereoscopio trinocular BRUNEL BMZ y un microscopio invertido BRUNEL. El microscopio electrónico de barrido (SEM) usado fue un Quante FEI, con voltajes en el rango de 10-20 kV. Se utilizó en el modo de bajo vacío. Las muestras no fueron metalizadas.

Se usó un microscopio de fuerza atómica (AFM) NANOSURF EASYSCAN 2 en modo dinámico. Se usó un cantiléver con una constante de 42 Nm^{-1} , una frecuencia de resonancia de 179 kHz y un radio de la punta menor de 10 nm.

Las propiedades geométricas de las muestras (diámetro de fibras y tamaño de poros) fueron evaluadas utilizando las imágenes de SEM y LOM junto con el programa de análisis de imágenes ImageJ (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH, USA).

2.2. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Las muestras almacenadas se trituraron en un mortero para luego ser secados en un desecador por toda la noche. Luego se prensa una pastilla de KBr. Se utilizó un equipo LAMBDA SCIENTIFIC.

2.3. Ensayos de análisis térmico

Se utilizó un calorímetro de barrido diferencial PERKIN ELMER DSC 4000. Las muestras fueron primero liofilizadas para poder evaluar la influencia del contenido de agua en el comportamiento de los materiales a analizar. Las muestras liofilizadas fueron pulverizadas y se les añadió agua destilada para obtener muestras diferentes porcentajes de contenido de agua en peso (ver tabla 1).

Tabla 3.1. Condiciones experimentales usadas en las pruebas de calorimetría diferencial de barrido.

Muestra	Contenido de agua (% en peso)
Biso	0%, 20%, 50% y 80%
Membrana de huevo	0%, 20%, 40% y 60%
Manto de calamar gigante	0%

Luego, las muestras fueron colocadas en crisoles de aluminio y selladas. Se hicieron pruebas con muestras secas para comparación. Las pruebas se hicieron desde 20 °C hasta 450 °C, a una velocidad de 5 °C/min en una atmósfera de nitrógeno. Se realizaron también pruebas en el analizador termogravimétrico (TGA) PERKIN ELMER TGA 400, bajo una atmósfera de nitrógeno desde 20 °C hasta 800 °C a una velocidad de 10°C/min.

2.4. Ensayos de tensión cuasi-estática

Tanto los bisos como las muestras de membrana de huevo fueron sometidos a ensayos de tracción cuasi estáticos. En ellos se fijan las muestras a unas mordazas que se desplazan a una velocidad constante, obteniendo una variación en la longitud ($l(t)$) y un esfuerzo de tracción ($\sigma(t)$) en las muestras. Con ello se calcula la deformación ($\delta = (l_0 - l(t))/l_0$) y el módulo elástico en tracción, conocido como módulo de Young (E).

Se utilizó una máquina de tracción MARK-10 equipada con una celda de carga de $10 \text{ N} \pm 0.5\%$. Se asumió que la deformación de las muestras era igual a la separación entre las mordazas. Esto es razonable al considerar que la compliancia de la máquina es despreciable comparada con la de las muestras (Pérez-Rigueiro et al., 1998). Las dimensiones las muestras (ancho y espesor) fueron medidos con un estereoscopio trinocular BRUNEL BMZ. Se

asumió que la longitud de las muestras era igual a la separación de las mordazas.

Los bisos no pudieron ser montados directamente en las mordazas del equipo de tracción debido al diámetro pequeño de los bisos. Luego, los extremos de las fibras se pegaron a marcos soporte, los cuales fueron sujetos a las mordazas de la máquina de tracción (Figura 3.4), tal como está reportado para el ensayo de tracción de otras fibras (Pérez-Rigueiro et al., 1998). Una vez montadas y alineadas las muestras en la máquina, se cortaron los marcos para iniciar el ensayo.

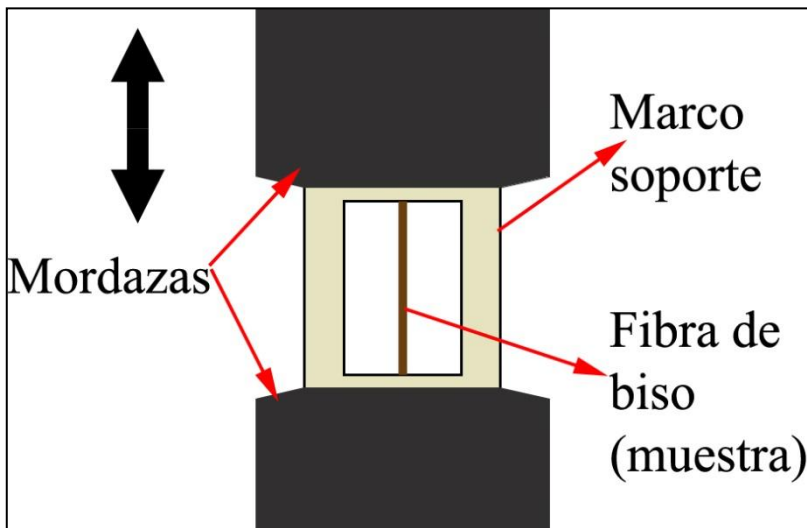


Figura 3.4. Esquema de montaje de las muestras de bisco. Las fibras fueron primero pegadas a marcos soporte de cartón, los cuales fueron alineados y montados en las mordazas de la máquina de tensión. Antes de iniciar el experimento, dichos marcos fueron cortados para así medir la respuesta del bisco.

Para poder hacer ensayos de tensión cuasi-estática con las muestras sumergidas en diferentes medios (agua destilada, agua de mar, albumen, etc.) se adaptó un contenedor de fluidos tal como se muestra en la figura 5.

Las muestras de biso ensayadas tuvieron un diámetro promedio de 184 μm y una longitud de alrededor de 5 cm. Para calcular los valores de esfuerzo los diámetros de cada fibra de biso fueron medidos con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Las muestras de membrana de huevo fueron cortadas hasta alcanzar una forma rectangular (15 mm x 3.5 mm).

Tabla 3.2. Condiciones experimentales de ensayos de tracción cuasi-estática para muestras de biso y de membrana de huevo

	Dirección	Medios usados	Temperaturas de ensayo (°C)
Biso	Longitudinal	Aire	25
		Agua destilada	10, 25, 40, 55, 70
		Agua de mar	25
Membrana de huevo	Longitudinal	Aire	25
		Agua destilada	10, 30, 50, 70
		Albúmina	25

Los ensayos se hicieron en distintas condiciones. La Tabla 3.2 describe las condiciones usadas para cada muestra. Se hicieron al menos cinco repeticiones por cada ensayo con una velocidad de deformación de 10 mm/min.

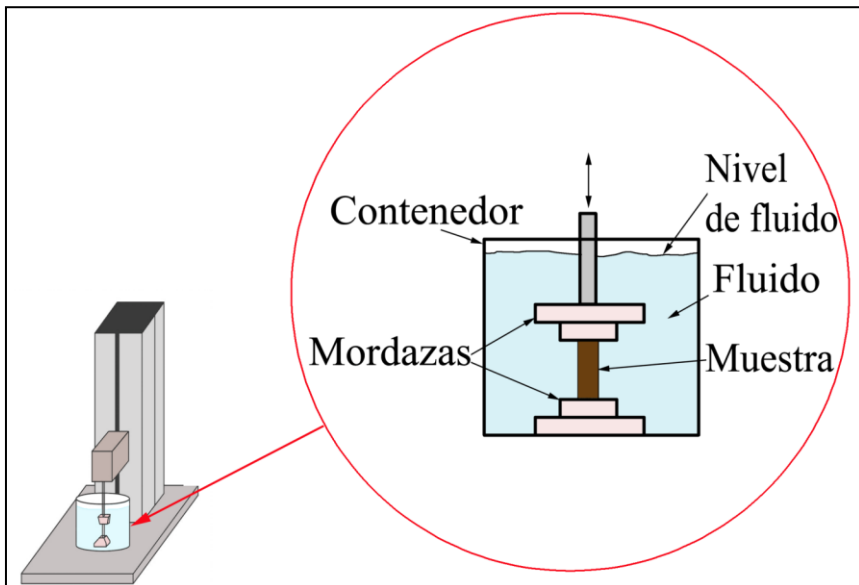


Figura 3.5. Esquema del montaje utilizado para realizar de los ensayos de tensión cuasi-estática con muestras sumergidas en diferentes fluidos.

2.5. Ensayos de nanoindentación

En este estudio se realizaron pruebas de nanoindentación utilizando un AFM NANOSURF EASY SCAN 2. El procedimiento seguido se representa en la figura 3.6a. En un primer momento (1) el cantiléver del AFM se aproxima a la muestra. Luego, la punta del AFM hace contacto con la muestra (2) y a continuación penetra el material (3). Finalmente, el cantiléver es retirado de la muestra. La información que se recoge está graficada en la curva de la figura 3.6b. El eje horizontal corresponde posición vertical (Z) de la punta del cantiléver mientras que el eje vertical corresponde a la deflexión del cantiléver provocada por las fuerzas de interacción entre la punta del cantiléver y la superficie de la muestra. Se ha graficado una curva negra (de 1 a 3) y una curva gris (4).

Las pruebas de nanoindentación se utilizaron para estudiar las propiedades localizadas de las fibras individuales, evitando hacer que el cantiléver se aproxime en los espacios vacíos. Si se considera que la punta de la viga es un material infinitamente rígido sobre una muestra plana blanda, se puede usar el modelo Hertziano para predecir la relación entre la profundidad de indentación y la fuerza de carga (Weisenhorn et al., 1993; Rotsch et al., 1997; Radmacher, 1999; Johnson, 1994).

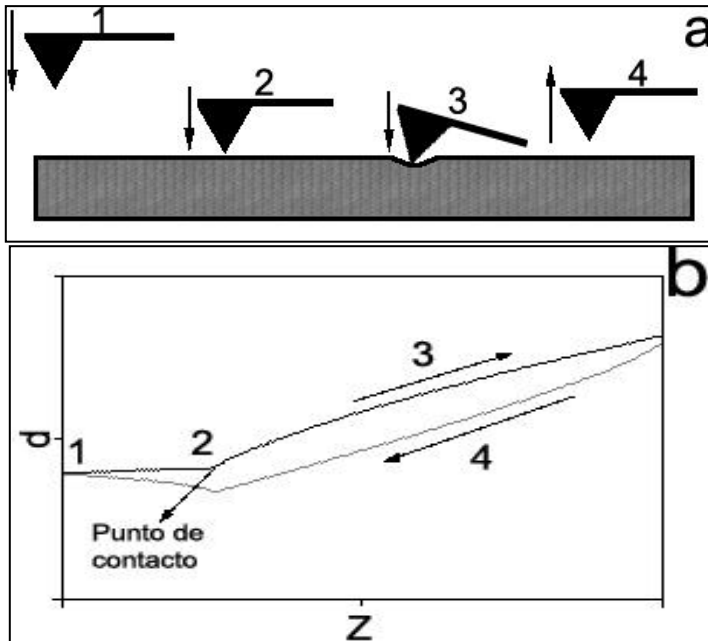


Figura 3.6. Esquema del procedimiento de un ensayo de nanoindentación en un microscopio de fuerza atómica (AFM). La parte (a) indica gráficamente la posición del cantiléver: En (1) se indica el inicio del acercamiento, en (2) se indica el punto exacto en el que la punta del cantiléver penetra la muestra, en (3) ocurre la penetración, mientras que en (4) representa el momento en el que el cantiléver es retirado de la muestra. La parte (b) de la figura presenta las curvas de deflexión “d” del cantiléver con respecto de la altura “z”. Se utilizan los mismos números que en la parte (a) para representar los diferentes momentos del ensayo de nanoindentación. La curva negra indica la penetración y la gris indica la salida del cantiléver. A partir de los datos de los ejes ‘d’ y ‘z’ se puede estimar el módulo de Young de la muestra.

El modulo de Young fue estimado mediante la siguiente expresión:

$$z - z_0 = d - d_0 + \sqrt{\frac{k}{(\pi/2) \left[\frac{E}{(1-\nu^2)} \right] \tan(\alpha)}} \sqrt{d - d_0} \quad \dots \text{(Ec. 3.1)}$$

Donde E es el módulo de Young, ν es el módulo de Poisson (usaremos 0.5 como para un material incompresible), k es la constante de resorte del cantiléver (0.28 N/m), α es el ángulo de la punta del cantiléver (50°), z es la altura en la aproximación y d es la deflexión del cantiléver. El subíndice 0 representa los valores base del AFM.

2.6. Ensayos reológicos

En la reología oscilatoria se aplican pequeñas deformaciones oscilatorias ($\epsilon(t)$) de periodo ω y se mide el esfuerzo resultante ($\sigma(t)$) cuya respuesta tendrá un desfase (δ). Con ello calculan el módulo cortante de almacenamiento ($G' = \sigma_0 \cos(\delta) / \epsilon_0$) y el módulo de pérdidas ($G'' = \sigma_0 \sin(\delta) / \epsilon_0$).

Para este estudio se usó un reómetro TA INSTRUMENTS AR1000 con un plato de 20mm para medir la variación de los módulos G' y G'' en barridos de frecuencia (0.01 – 100 Hz) y de esfuerzo (0.05 – 1000 Pa a 1 Hz).

Capítulo 4

Resultados y discusión

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Una fibra de biopolímeros: El biso de mejillón

1.1. Caracterización morfológica

Para el estudio de las redes de biopolímeros se debe conocer las propiedades de las fibras individuales que forman dichas redes. El colágeno es un biopolímero que está presente en muchas de las redes que se encuentran en los sistemas biológicos como los vasos sanguíneos, piel, tendones, córnea, etc. Debido a ello, se ha tomado el caso de una estructura formada por colágeno (biso de mejillón) para caracterizar su comportamiento mecánico.

Los bisos son fibras producidas por los mejillones usadas por éstos para sujetarse a las rocas. Tal como se mencionó en el capítulo 2 de este trabajo, deben cumplir con ciertas sollicitaciones de rigidez, resistencia, tenacidad y extensibilidad para poder sujetar los mejillones a las rocas aún cuando el agua alcanza velocidades de 10 m/s y aceleraciones de alrededor de 400 m/s^2 (Waite, 1992; Denny,

1985). Se sabe que su alta resistencia y extensibilidad alcanzan valores seis veces mayores a los valores alcanzados por tendones humanos (Gosline et al., 2002).

Las características morfológicas de los bisos han sido reportadas en diferentes estudios (Gosline et al., 2002; Carrington & Gosline, 2004). La Figura 4.1 muestra una imagen de microscopía de un grupo de bisos de la especie *A. ater* que se usó en este trabajo. Se verifica la presencia de las tres partes que forman el sistema de sujeción del mejillón: el tallo, la fibra (biso) y la placa adhesiva (Bairati, 1991). El tallo es la estructura que soporta cada fibra y la placa es la superficie que se forma al final de la fibra y que contiene proteínas adhesivas gracias a las cuales los mejillones se pueden sujetar a las rocas.

La morfología de los bisos varía de una especie a otra (Brazee & Carrington, 2006. Eckroat & Steele, 1993). Un primer parámetro a controlar es el diámetro de los bisos. Para los bisos usados en este estudio, el diámetro varía entre 135 μm y 235 μm . El promedio encontrado fue de $181 \pm 28.1 \mu\text{m}$. Estos resultados concuerdan con los publicados por Bell y Gosline (Bell & Gosline, 1996) en los que se reportan las características de los bisos de diferentes especies de mejillones. Según los resultados publicados por Bell y Gosline (1996), los diámetros entre las especies varían entre 100-275 μm .

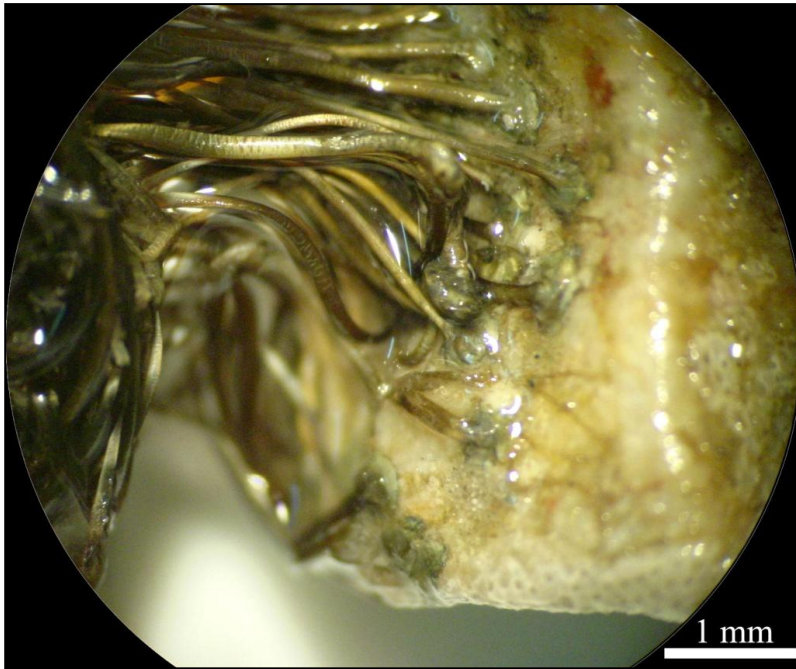


Figura 4.1. Imagen de microscopía óptica de un grupo de bisos de mejillón de *A. ater* adheridos a una roca. Todos los bisos terminan en una placa adhesiva que parece tener una forma elíptica.

La Figura 4.2 muestra la vista detallada del tallo y los bisos. Los hilos surgen a partir de dos lados opuestas del tallo, tal como ha sido reportado en otros estudios para bisos de mejillones de *Mytilus edulis* (Eckroat & Steele, 1993). A diferencia de la Figura 4.1, en la Figura 4.2 los bisos parecen tener una forma de cinta con una sección transversal no circular. Esto se debe a que las muestras observadas en microscopía óptica estaban almacenadas en agua para evitar que se sequen. Cuando los bisos se secan su forma cambia de hilos (con

sección transversal circular) a cintas. Debido a esto, se controló el almacenamiento y el ambiente en los ensayos mecánicos de los bisos. Se llevaron a cabo ensayos con los bisos sumergidos en agua y agua de mar. Además, se llevaron a cabo ensayos de los bisos secos.

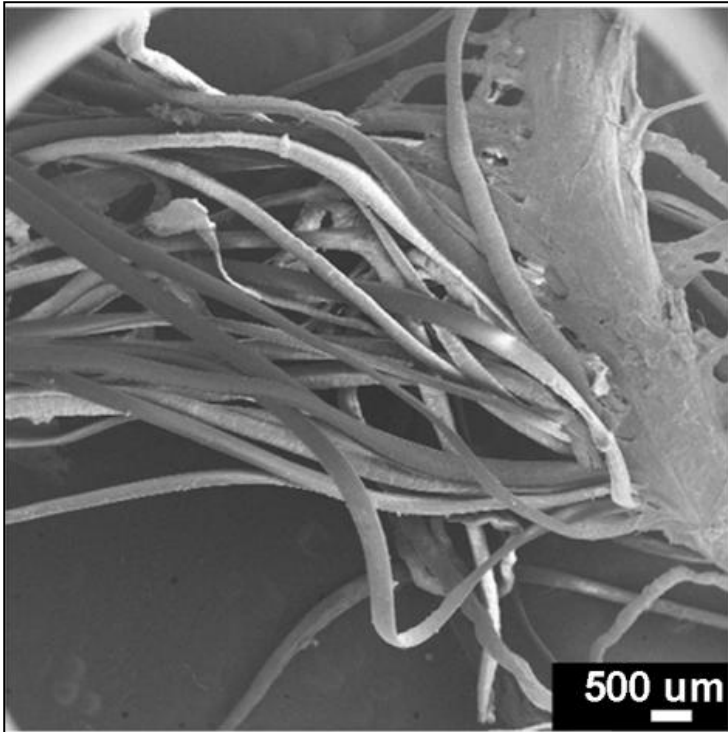


Figura 4.2. Imagen de microscopía de barrido de un grupo de bisos de la especie *A. Ater*. Se puede notar cómo todos los bisos salen de un tallo común.

La morfología de la superficie de los hilos del biso se observa en las Figuras 4.3 y 4.4. Se puede notar que en la superficie de los bisos hay “surcos” o ranuras longitudinales a lo largo de toda la superficie externa. Se piensa que estos surcos son consecuencia del proceso mediante el cual los mejillones producen los bisos. De hecho, se ha reportado que los bisos son secretados en estado líquido y atraviesan las paredes de los órganos ventrales del mejillón en un proceso que recuerda el moldeo por extrusión. Los surcos longitudinales se originarían por el paso por las paredes de los órganos ventrales (Eckroat & Steele, 1993). Una vista más cercana (Figura 4.4) muestra una morfología ondulada en la superficie de los bisos.

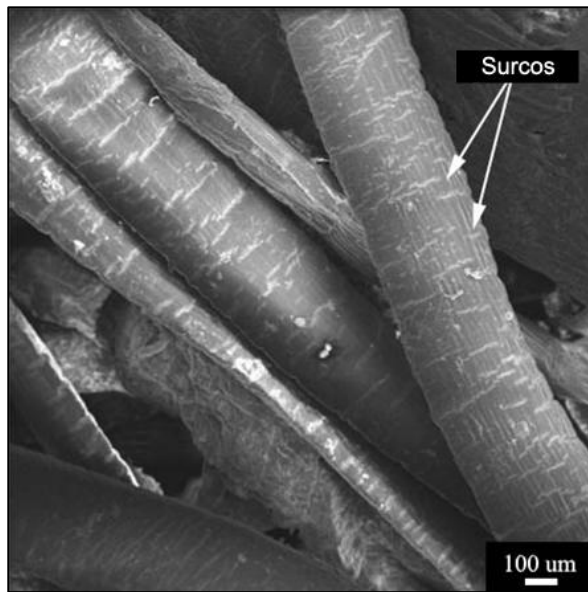


Figura 4.3. Imagen de microscopía de barrido de los bisos de la especie *A. ater*. Se puede notar la presencia de surcos longitudinales a lo largo de toda la superficie de los bisos.

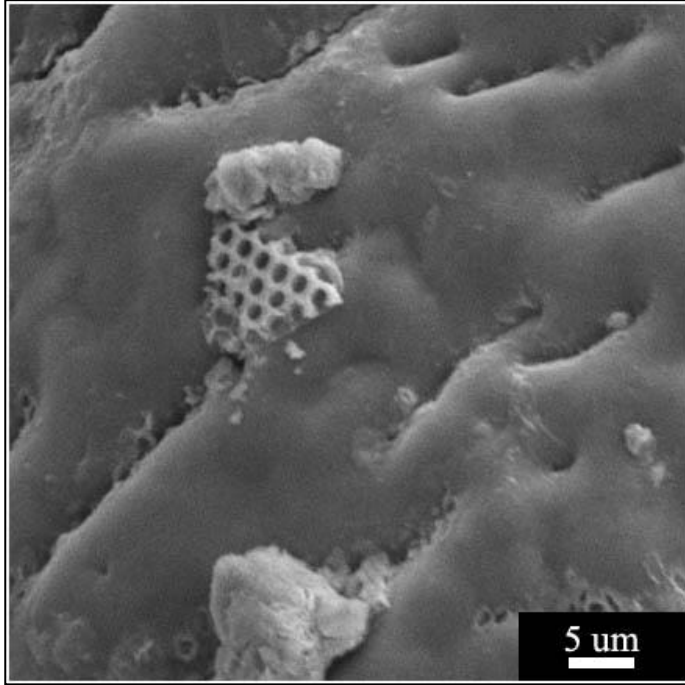


Figura 4.4. Detalle de la morfología de las superficies de los bisos.

En las imágenes analizadas no hay diferencias morfológicas entre las regiones proximales y distales del bicho. Los estudios sobre bisos de distintas especies de mejillones han informado la identificación de dos regiones diferentes a lo largo del bicho, la parte distal (más alejada del tallo) rígida, y la parte proximal flexible (Holten-Andersen et al., 2009). Cada parte está formada por determinados tipos de proteínas de colágeno. La parte distal es aproximadamente 10 veces más rígida

que la parte proximal (Bell & Gosline, 1996) y está formado por 2 colágenos conocidos como COL-D y COL-NG (Zhao, 2006). Por el contrario, la parte proximal es sorprendentemente extensible (>75%) (Holten-Andersen et al., 2009) y está formada por los colágenos COL-P y COL-NG.

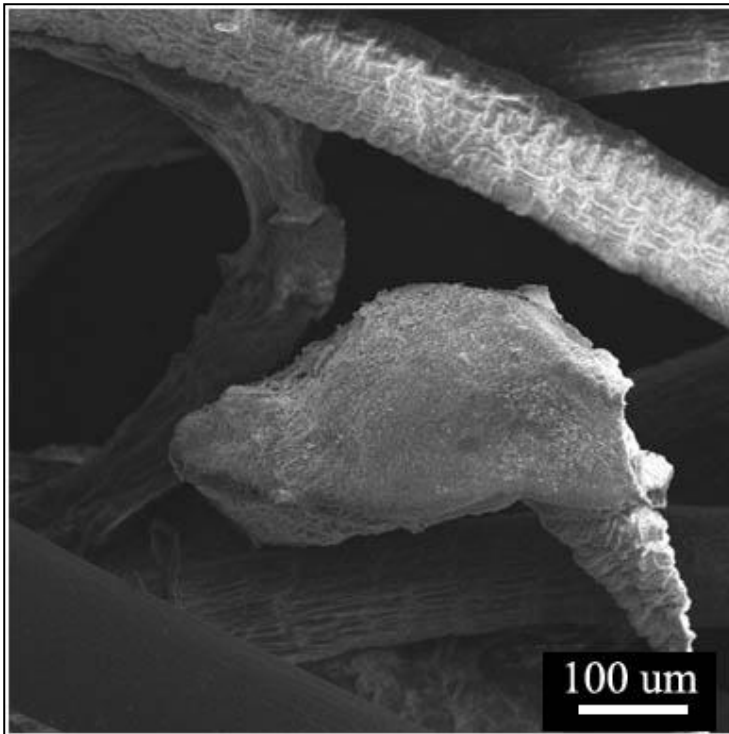


Figura 4.5. Imagen de una placa adhesiva del bisco de mejillón de la especie *A. ater* usada en este estudio.

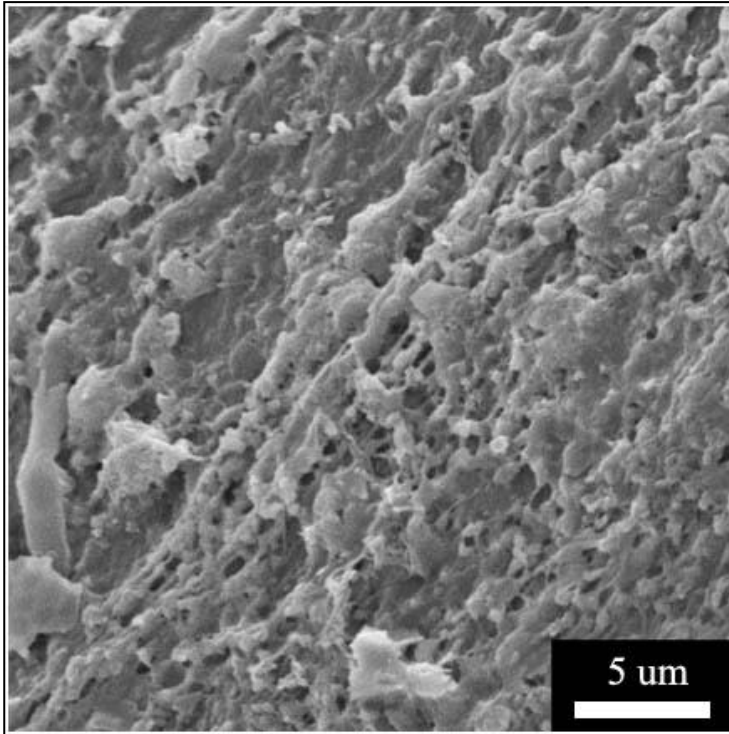


Figura 4.6. Detalle de la morfología exterior de una placa adhesiva de un bisco de la especie *A. ater*. Se pueden notar las diferencias con la morfología de la superficie exterior del bisco mostrada en la Figura 4.4.

Sin embargo, para los bisos estudiados en este trabajo, no hay diferencias morfológicas que permitan distinguir las regiones proximales y distales del bisco. Este también sería el caso de los bisos de otras especies estudiadas como *Bathymodiolus Thermophilus*, *Geukensia Demissa* y *Driessena Pulymorpha* (Brazee & Carrington, 2006). En el caso de los bisos que tienen una región distal y una

región proximal, normalmente se evalúan las propiedades mecánicas de cada región por separado y de las dos regiones juntas. En este trabajo, debido a que no hay realmente dos regiones en el bisco, se han evaluado las propiedades mecánicas del bisco entero.

La morfología externa de las placas adhesivas se muestra en las Figuras 4.5 y 4.6. La imagen que se observa en la Figura 4.5 confirma la forma elíptica de las placas adhesivas que se observó en la Figura 4.1. La Figura 4.6 muestra que la superficie exterior de la placa adhesiva tiene un patrón definido. El patrón superficial mostrado interactúa con una variedad de sustratos orgánicos e inorgánicos en ambientes acuosos, usando una serie de proteínas secretadas por el mejillón como adhesivos (Waite, 2002; Lee et al., 2006; Wiegemann, 2005). Se piensa que la presencia de aminoácidos inusuales conocidos como DOPA (3,4 dihidroxi-L-fenilalanina) es la responsable de la fuerte adhesión del bisco (Waite, 2002; Lee et al., 2006; Wiegemann, 2005).

La presencia del patrón superficial mostrado en la Figura 4.6 podría deberse al papel que juega la geometría superficial sobre la adhesión. Varios estudios han demostrado que dividiendo la superficie de contacto principal en superficies de contacto más pequeñas aumenta la fuerza de adhesión (Varenberg et al., 2006; Artz et al., 2003). Además la fuerza de adhesión ha sido presentada como una función del área de contacto real (Varenberg et al., 2006).

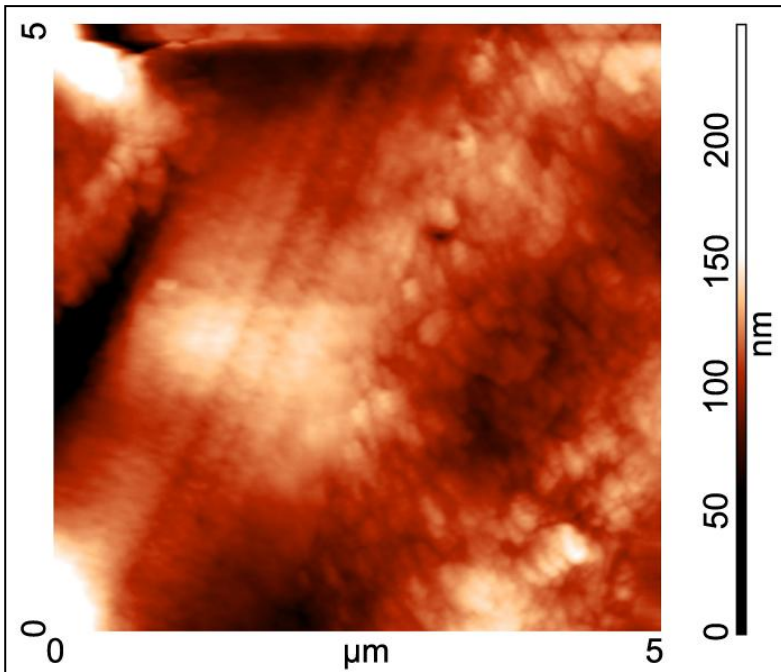


Figura 4.7. Imagen de microscopía de fuerza atómica de la superficie exterior del bico de la especie *A. ater*.

Las imágenes de microscopía de fuerza atómica (Figuras 4.7 y 4.8) muestran la superficie externa del bico y la placa adhesiva. La Figura 4.8 confirma la presencia de un patrón como el que se observó en la Figura 4.6. Se realizó un análisis de la rugosidad del bico (fibra y placa). La rugosidad promedio de la superficie de la placa adhesiva fue de 17.8542 nm, mientras que la rugosidad medida en la superficie del bico fue de 14.2134 nm. Los resultados muestran que la altura pico a pico de la superficie lateral del bico (246.115 nm) es

mayor a la altura de pico a pico encontrada en la placa adhesiva (151.341 nm), lo cual confirma la presencia de ranuras más profundas en la superficie lateral de los hilos (figura 9).

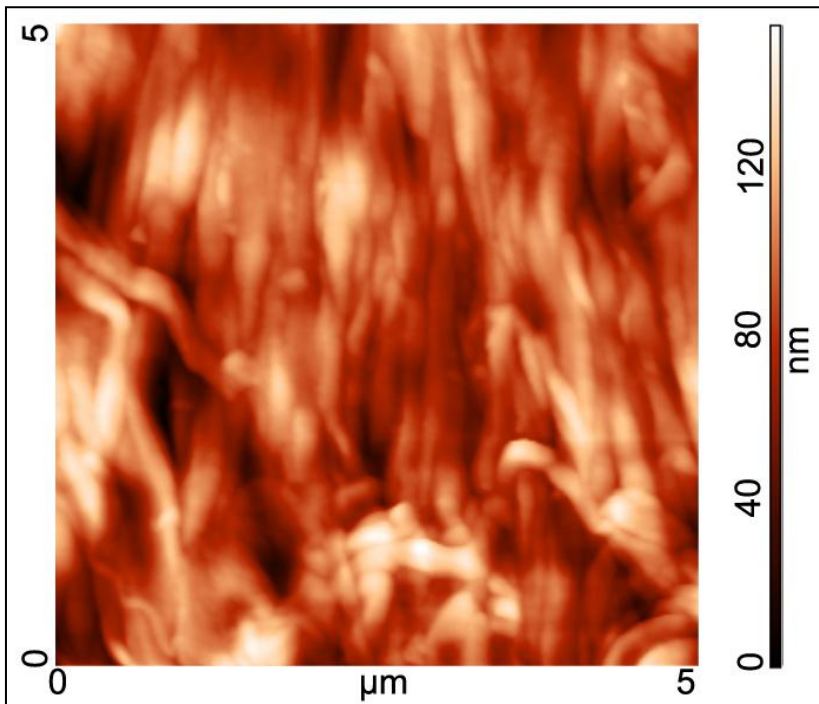


Figura 4.8. Imagen de microscopía de fuerza atómica de la superficie exterior de la placa adhesiva del biso de la especie *A. ater*. Se puede apreciar un patrón en la superficie que difiere de la superficie del hilo del biso mostrado en la Figura 4.7.

1.2. Propiedades mecánicas

Diversos estudios han reportado las propiedades mecánicas de las fibras de mejillones. La mayoría de ellos trabajan con especies como *M. edulis* o *M. californianus*. Para este trabajo se utilizaron bisos de mejillones de una especie sudamericana (*Aulacomya ater*) que no había sido estudiada antes. Se llevaron a cabo ensayos de tensión uni-axial en muestras secas y húmedas (en agua destilada y agua de mar). Además, se hicieron pruebas variando la temperatura de las muestras.

Los resultados de los ensayos de tensión uni-axial están resumidos en la Tabla 4.1. En dicha tabla se lista el esfuerzo máximo de tensión y la deformación máxima alcanzada. Comparando los datos de la Tabla 4.1 con los resultados de otros estudios hechos en bisos de otras especies de mejillones (Tabla 4.2), podemos afirmar que los valores obtenidos están dentro del mismo orden de magnitud de los valores de otros estudios (Brazee & Carrington, 2006; Bell & Gosline, 1996; Smeathers & Vincent, 1979). Tanto el esfuerzo máximo como la deformación máxima de *A. ater* obtenidos en los ensayos realizados con las muestras sumergidas en agua de mar, son mayores a los obtenidos en todos los demás estudios. Esto se puede apreciar también en la Figura 4.9, donde se han graficado curvas de esfuerzo-deformación representativas de ensayos de tensión de diferentes estudios en bisos de mejillones de otras especies.

Tabla 4.1. Resultados de los ensayos de tensión uni-axial del biso de *A. ater* bajo diferentes condiciones. Adaptado de (Troncoso et al., 2008).

Medio de ensayo	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación máxima
Seco	144.71 ± 33.58 ^a	0.27 ± 0.018 ^a
Sumergido en agua destilada	59.47 ± 25.02 ^b	0.84 ± 0.097 ^b
Sumergido en agua de mar	70.16 ± 20.46 ^b	0.79 ± 0.275 ^b

* Los valores son promedios ± DE (desviación estándar). Las letras indican los diferentes grupos de acuerdo con el análisis de varianza llevado a cabo (comparación de Student-Newman-Keuls)

Sin embargo, se debe tomar en cuenta que las desviaciones estándares son relativamente altas y que las pruebas han sido llevadas a cabo en diferentes laboratorios a condiciones experimentales diferentes.

De acuerdo con el análisis de varianza (comparación de Student-Newman-Keuls), los resultados de las pruebas realizadas con los bisos sumergidos en agua destilada no son estadísticamente diferentes a los obtenidos para bisos sumergidos en agua de mar (Tabla 4.1). Es por ello que el análisis de los resultados será hecho comparando los bisos que se ensayaron sumergidos en agua (hidratados) con los bisos que se ensayaron al aire (secos).

Tabla 4.2. Resultados de ensayos de tracción uni-axial de bisos de diferentes especies.

Especie	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación máxima
<i>Bathymodiolus thermophilus</i> ^a	26.19 ± 14.14	0.60 ± 0.27
<i>Guekensia demisa</i> ^a	20.52 ± 10.36	0.71 ± 0.39
<i>Mytilus edilus</i> ^a	20.46 ± 13.56	0.76 ± 0.32
<i>Mytilus edilus</i> ^b	21	0.44
<i>Modiolus modiolus</i> ^a	19.11 ± 18.76	0.50 ± 0.14
<i>Dreissena polymorpha</i> ^a	48.40 ± 26.02	0.61 ± 0.23
<i>Mytilus californianus</i> ^c	34.6 ± 16.41	0.94 ± 0.39
<i>Mytilus trossulus</i> ^c	20.3 ± 10.94	0.66 ± 0.31
<i>Mytilis galloprovincialis</i> ^c	17.1 ± 7.79	0.62 ± 0.17

^aDatos de Brazee y Carrington (2006); sumergido en agua de mar.

^bDatos de Smeathers y Vincent (1979); sumergido en agua de mar.

^cDatos de Bell y Gosline (1996); sumergido en agua de mar.

En la Figura 4.10 se observan curvas representativas de esfuerzo-deformación para muestras ensayadas en tres condiciones diferentes: secas, sumergidas en agua destilada y sumergidas en agua de mar. Se puede verificar que las curvas de los ensayos realizados en agua destilada y en agua de mar son similares. En cambio, la curva del ensayo realizado en seco muestra un comportamiento más rígido, con un esfuerzo máximo mayor que en los otros dos casos. Los bisos ensayados en agua (destilada o de mar) son más flexibles y

alcanzan mayores deformaciones máximas que los bisos ensayados en seco.

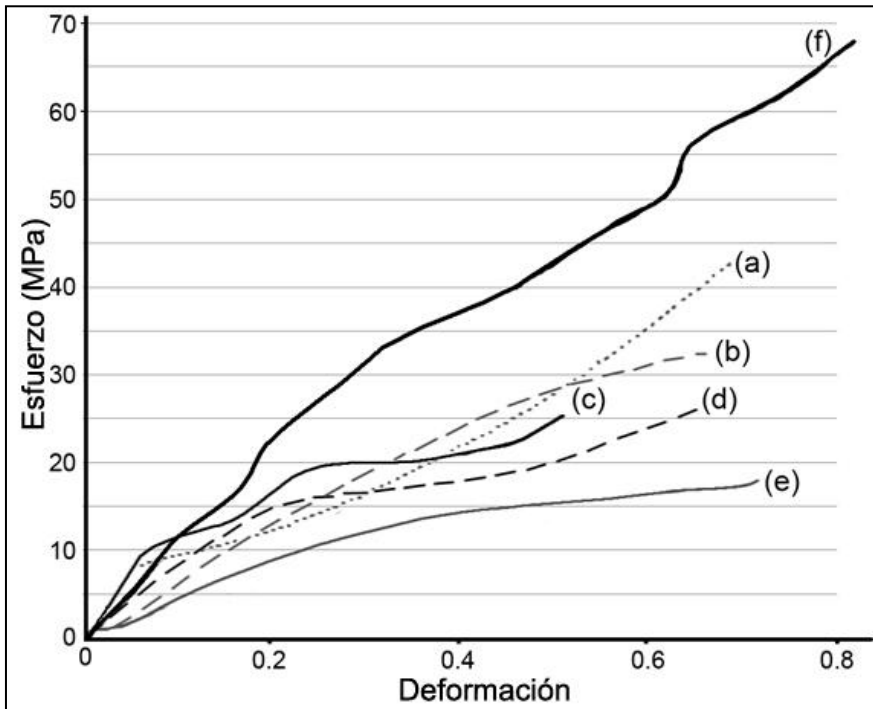


Figura 4.9. Curvas de esfuerzo-deformación de bisos de diferentes especies, incluyendo (a) *Dreissena polymorpha*, (b) *Bathymodiolus thermophilus*, (c) *Modiolus modiolus*, (d) *Mytilus edulis*, (e) *Geukensia demissa* y (f) *Aulacomya ater*

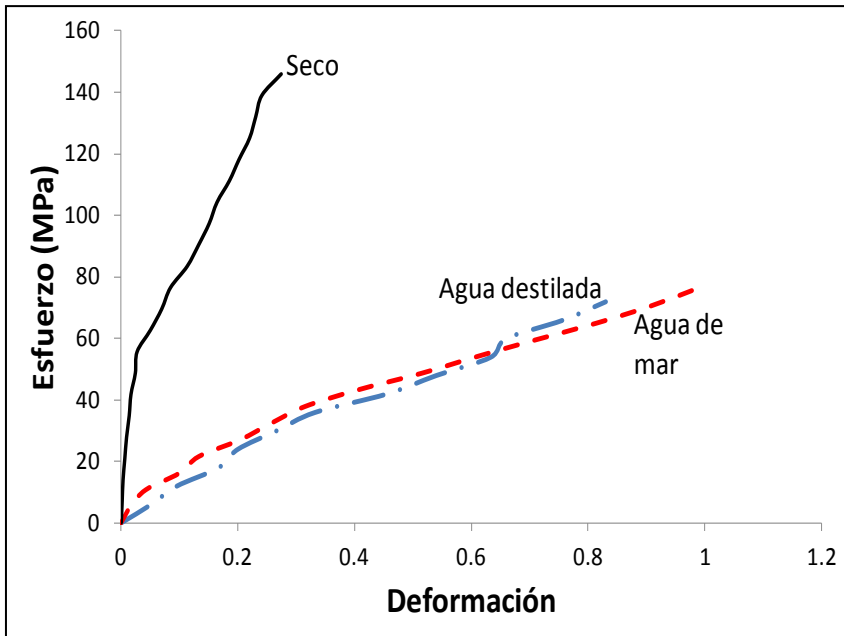


Figura 4.10. Curvas representativas de esfuerzo-deformación de bisos de *A. ater* ensayados en tres condiciones diferentes: en seco (negro), sumergido en agua destilada (azul) y sumergido en agua de mar (rojo). Se puede apreciar que las muestras secas son más rígidas y tienen un esfuerzo máximo mayor que las muestras sumergidas en agua destilada o agua de mar.

El biso seco se comporta como un polímero elasto-plástico (Figura 4.11) mientras que los hilos húmedos inmersos tanto en agua destilada como en agua de mar presentan un comportamiento elastomérico (Figura 4.12). Esto podría ser debido al hecho de que las moléculas de agua actúan como un agente plastificante que interactúa con las moléculas poliméricas que forman los bisos. Se ha observado comportamientos similares en otras fibras naturales

construidas a partir de proteínas, como la seda de araña (Pérez-Rigueiro et al., 1998; Pérez-Rigueiro et al., 2003).

El comportamiento elasto-plástico de los bisos secos puede ser observado en la Figura 4.11. La curva representativa de dicha figura muestra que hay dos regiones claramente definidas. Inicialmente, el bisco tiene un comportamiento elástico lineal ($E = 1746.3 \pm 256.4$ MPa) a deformaciones pequeñas, hasta que alcanzan una deformación crítica (0.0364 ± 0.0090) donde comienza la deformación plástica.

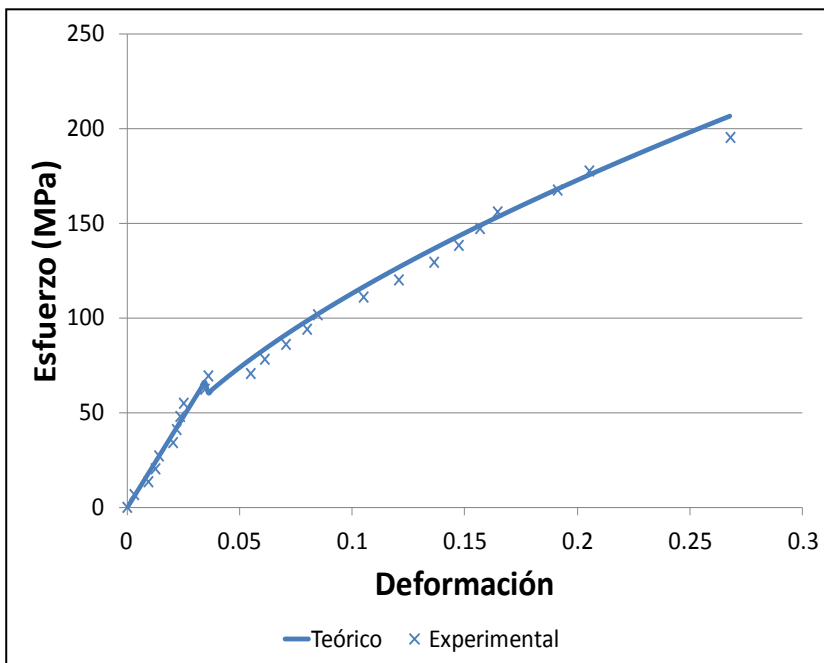


Figura 4.11. Curva representativa de esfuerzo-deformación de un bisco seco. Se muestran los valores experimentales (x) y los valores teóricos (-). Tomado de (Troncoso et al., 2008).

La región lineal se ha modelado usando la ley de Hooke (línea recta en la Figura 4.11). Para la región plástica, se ha utilizado una ecuación de ley de potencia con la siguiente forma:

$$\sigma = K * \varepsilon^n \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Donde σ y ε son: el esfuerzo y la deformación la zona plástica, respectivamente. K y n son constantes empíricas determinadas por el ajuste del modelo a los datos experimentales. El valor de n puede obtenerse a partir de:

$$n = \frac{d \log(\sigma)}{d \log(\varepsilon)} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Los valores promedio de n y K son 0.599 ± 0.034 y 358.92 ± 63.27 , respectivamente. De acuerdo con lo que se aprecia en la Figura 4.11, los datos experimentales se ajustan bien al modelo de ley de potencia usado para describir el comportamiento del biso seco en la zona plástica.

A diferencia del biso seco, las curvas de esfuerzo-deformación de los bisos sumergidos en agua son similares a las que se obtienen con los elastómeros. Para modelar los resultados de estas curvas se utilizó la teoría de la elasticidad del caucho, en particular el modelo de Mooney-Rivlin. El modelo de Mooney-Rivlin ha sido usado anteriormente para modelar la deformación de materiales similares al caucho y se ha aplicado al estudio de los tejidos blandos, tales

como tendones y ligamentos (DeFrate & Li, 2007; Weiss & Gardiner, 2001).

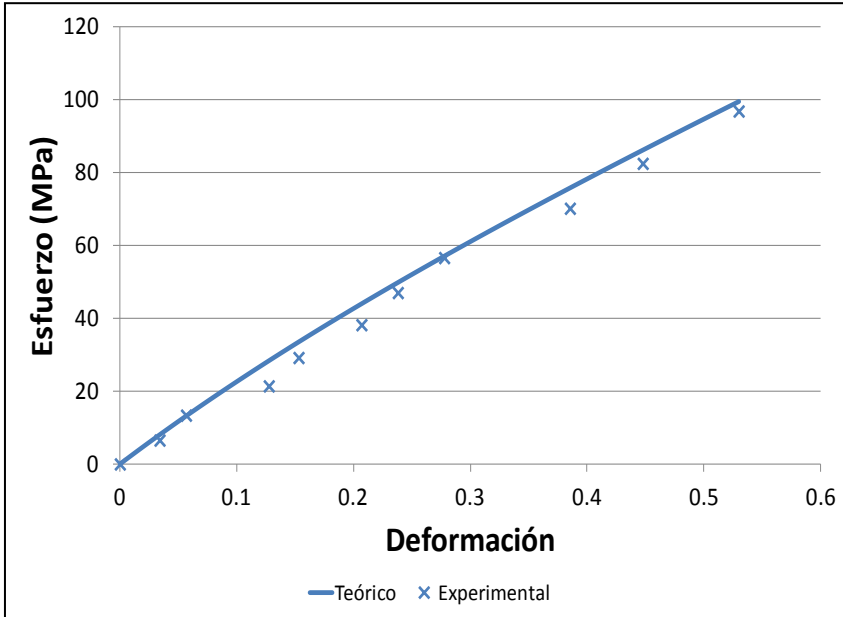


Figura 4.11. Curva representativa de esfuerzo-deformación para un bisco de *A. ater* sumergido en agua. Se pueden apreciar los datos experimentales (x) y los valores teóricos (-). Tomado de Troncoso et al. (2008).

El modelo de Mooney-Rivlin se basa en una ecuación semi-empírica que relaciona el esfuerzo real¹ ($\sigma_T = \sigma(1+\epsilon)$) con el ratio de

¹ El esfuerzo real se calcula dividiendo la fuerza aplicada entre el área real de la sección transversal a través de la cual opera la carga. Nótese que para el cálculo del esfuerzo (de ingeniería), se utiliza el área inicial de la sección transversal, la cual se considera constante durante todo el ensayo de tensión.

estiramiento ($\lambda=\epsilon+1$), mediante el uso de dos constantes (C_1, C_2), que representan las propiedades de los materiales. Se obtienen a partir de resultados experimentales cuando el esfuerzo reducido ($[\sigma_T]$) se traza contra la inversa del ratio de estiramiento ($1/\lambda$) de acuerdo con:

$$[\sigma_T] = \frac{\sigma_T}{\lambda-1/\lambda^2} = 2C_1 + \frac{2C_2}{\lambda} \quad (\text{Ec. 4.3})$$

La curva representativa de esfuerzo-deformación para el biso hidratado se muestra en la Figura 4.11. Los puntos experimentales se ajustan bien al modelo. Los valores promedio de C_1 y C_2 para los bisos en agua destilada son 10.54 ± 3.72 y 24.24 ± 8.07 MPa, respectivamente, mientras que para los bisos sumergidos en agua de mar C_1 y C_2 son 5.63 ± 4.70 y 18.01 ± 10.10 MPa, respectivamente.

En los materiales que tienen un comportamiento mecánico similar al caucho (elastoméricos) la deformación tiene un origen entrópico. Estos materiales se encogen con el calor y se vuelven más rígidos con el aumento de temperatura. Cuando los materiales elastoméricos se estiran, las fuerzas entrópicas promueven la retracción de la red, haciendo que el elastómero vuelva a su estado original (no deformado). La contracción que se produce cuando se calientan se debe a que la energía térmica acciona el sistema en la dirección del

incremento de entropía. La relación entre el módulo de corte (G) y la temperatura (T) de estos materiales está dada por:

$$G = \frac{\rho RT}{M_c} \quad (\text{Ec. 4.4})$$

donde, R representa la constante universal de gases, ρ la densidad del material y M_c el peso molecular de las cadenas. La ecuación (4) muestra que el módulo de Young de los materiales elastoméricos aumenta con la temperatura.

Para averiguar el efecto de la temperatura en el comportamiento mecánico de las fibras de biso, se llevaron a cabo pruebas con las muestras sumergidas en agua destilada a diferentes temperaturas.

La Tabla 4.3 muestra los resultados de los ensayos de tensión realizados en los bisos hidratados a diferentes temperaturas. Se registraron los valores de la resistencia máxima, la deformación máxima y el módulo de Young. Los resultados revelan que no hay relación clara entre la temperatura y el esfuerzo máximo, ni entre la temperatura y la deformación máxima.

Sin embargo, se ha verificado que el módulo de Young se ve claramente afectado por la temperatura. Podemos clasificar los valores de los módulos de Young en dos grupos de valores. El primer grupo se obtuvo en las pruebas que fueron llevadas a cabo a temperaturas en el rango de 10-25 °C, donde los valores del módulo de Young estuvieron entre 47.73 y 56.65 MPa. El segundo grupo de

valores se obtuvo con las pruebas en el rango de 40-70 °C con valores del módulo de Young entre 111.97 y 143.32 MPa.

Tabla 4.3. Resultados del ensayo de tensión uni-axial del biso de *A. ater* sumergido en agua destilada a diferentes temperaturas. Adaptado de (Torres et al., 2013).

Temperatura (°C)	Esfuerzo máximo (MPa)	Deformación Máxima	Módulo de Young (MPa)
10	30.66 ± 4.62	0.62 ± 0.13	47.73 ± 3.82
25	21.97 ± 1.37	0.40 ± 0.09	56.65 ± 12.34
40	30.61 ± 10.69	0.28 ± 0.03	115.89 ± 36.10
55	42.71 ± 0.63	0.23 ± 0.09	143.32 ± 42.71
70	55.98 ± 4.51	0.53 ± 0.16	111.97 ± 30.91

En la Figura 4.12, se aprecian 5 curvas representativas de esfuerzo-deformación, a cinco temperaturas diferentes (10, 25, 40, 55 y 70 °C). El hecho de que el valor del módulo de Young sea superior a altas temperaturas confirma que la naturaleza entrópica de la deformación de los bisos sumergidos en agua.

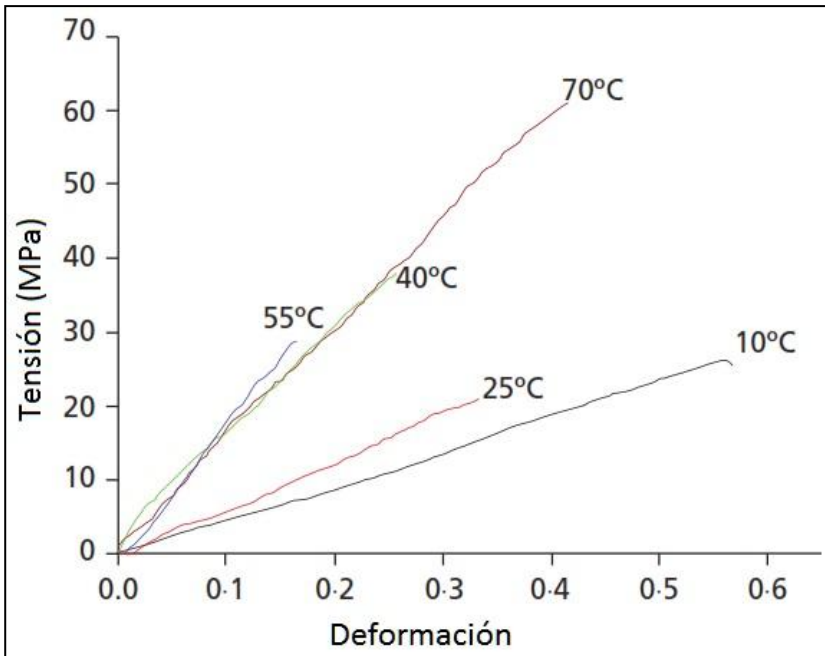


Figura 4.12. Curvas representativas de esfuerzo-deformación de bisos de *A. ater* a 5 temperaturas diferentes (10-70 °C). Tomado de (Torres et al., 2013).

El cambio en el valor del módulo de Young a 40°C podría estar relacionado con algún tipo de fenómeno térmico que ocurra en el biso. Para evaluar el comportamiento térmico de los bisos, se llevaron a cabo ensayos en el calorímetro de barrido diferencial y la balanza termo-gravimétrica. La Figura 4.13 muestra un termograma representativo de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de las fibras de biso y un termograma similar de un tendón de colágeno.

Las muestras de biso de mejillón mostraron un pico endotérmico aproximadamente a 100°C. Este pico es similar al pico mostrado por otras estructuras formadas por colágeno como cartílagos, huesos y piel. En estos casos, el pico puede estar asociado con la desnaturalización del colágeno. La temperatura de inicio de un proceso de desnaturalización de este tipo es aproximadamente 45°C para los bisos de mejillón, que está acorde con el endurecimiento de las muestras en los ensayos de tracción.

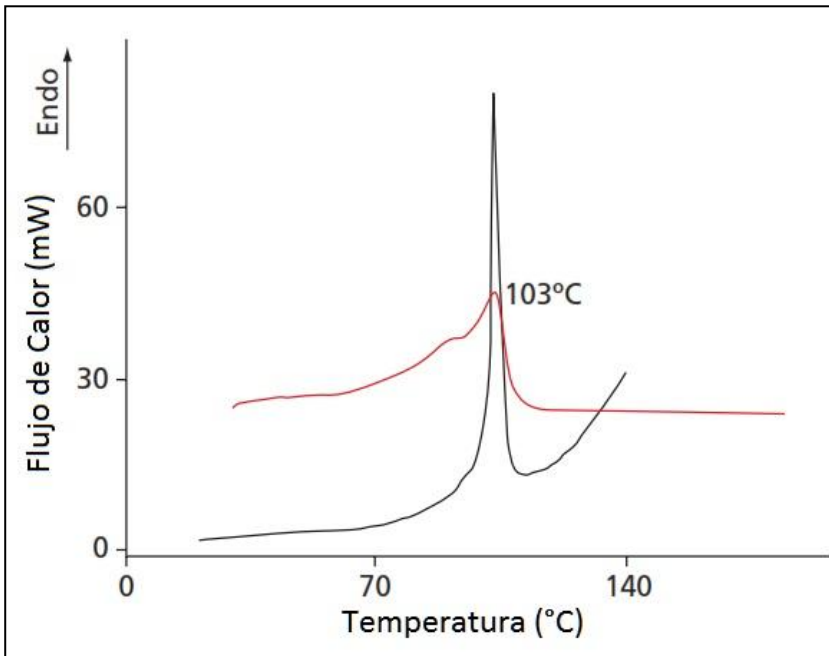


Figura 4.13. Curva de variación del flujo de calor con respecto a la temperatura obtenida en un ensayo de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de biso de mejillón (rojo) y colágeno de tendones de bovinos (negro). Tomado de (Torres et al., 2013).

Debido a que el comportamiento elastomérico de los bisos solo se da cuando las pruebas de tensión se realizan con las muestras sumergidas en agua, se realizaron ensayos en el DSC con muestras de humedad controlada. Se tomaron bisos liofilizados a los que se les agregó agua en cantidades adecuadas para obtener muestras con porcentajes de agua en peso de 0%, 20%, 50% y 80%. La Figura 4.14 muestra los resultados de estos ensayos. Se encontró la presencia de dos picos endotérmicos aproximadamente a 100 y 280°C. El primer pico está presente en todos los termogramas y no parecen seguir una tendencia con respecto al contenido de agua. El segundo pico aparentemente desaparece en la muestras de alto contenido de agua (50 y 80%). Este pico debería ser relacionado con la degradación térmica del mejillón. Dicha degradación es confirmada por el termograma de análisis termogravimétrico mostrado en la Figura 4.15 donde la degradación térmica comienza aproximadamente a 280°C.

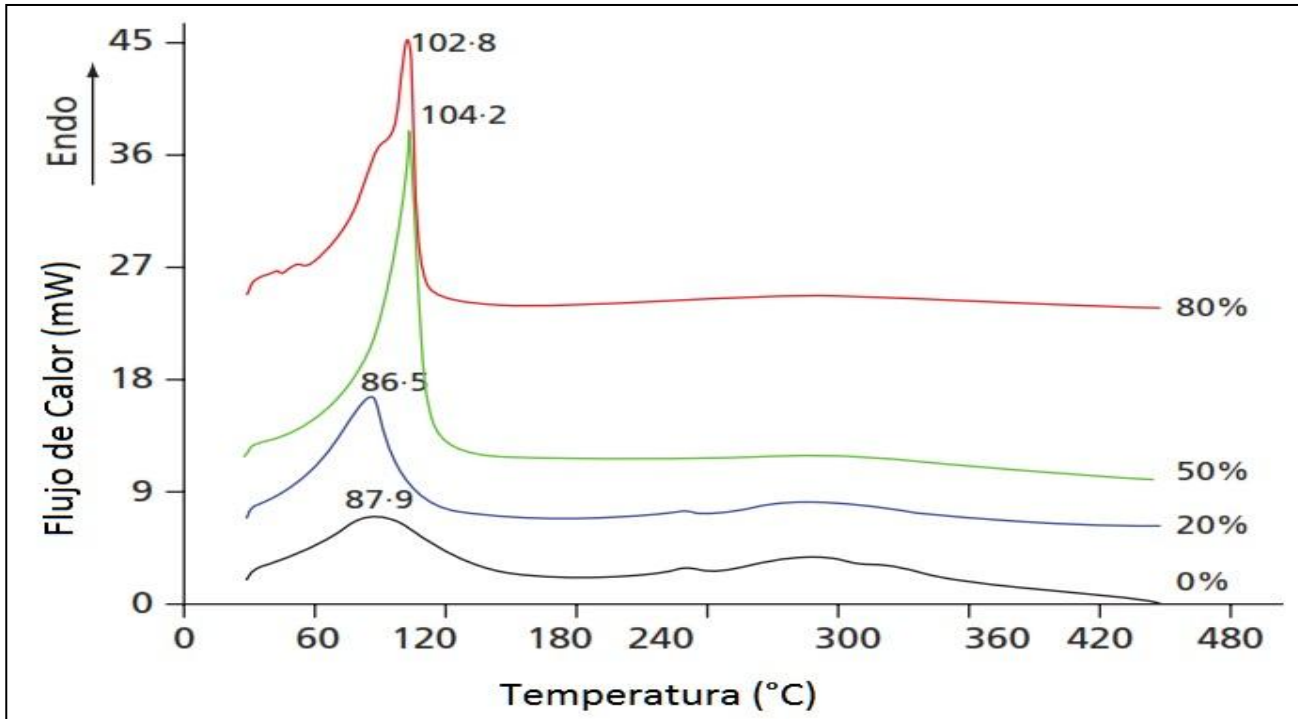


Figura 4.14. Curvas representativas de la variación del flujo de calor con la temperatura de muestras de biso de *A. ater* a diferentes niveles de hidratación.

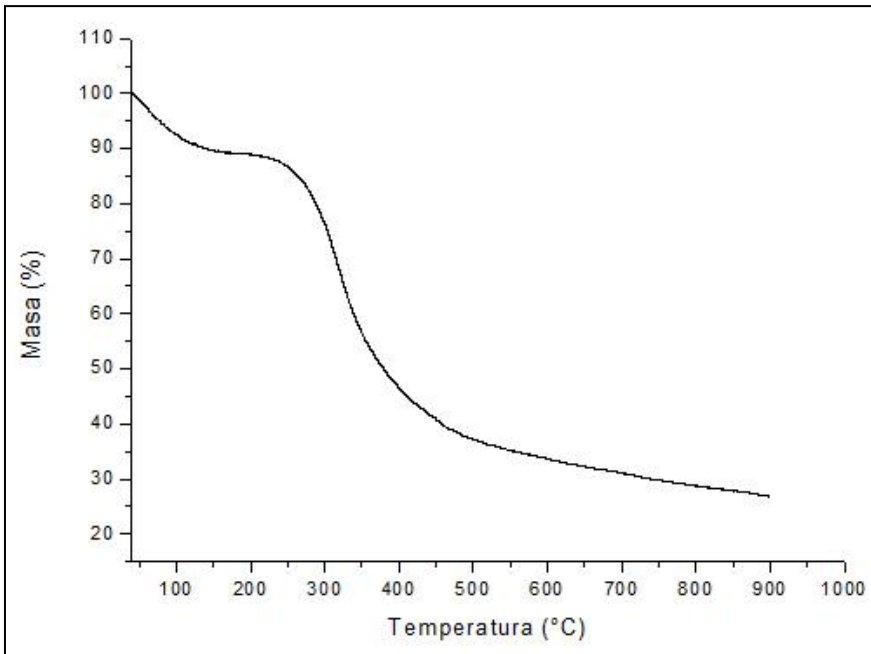


Figura 4.15. Variación de la masa dependiendo de la temperatura de una muestra de biso de *A. ater* obtenida por medio de una ensayo de termogravimetría (TGA). Tomado de Torres et al. (2013).

Pese a que el valor del módulo de Young sí guarda relación con la temperatura, ni el esfuerzo máximo, ni la deformación máxima parecen tener una relación con la temperatura. Esto podría ser explicado por la morfología de las muestras. Se encontraron algunas ranuras, que deben tomarse en cuenta, en la superficie de las muestras. La imagen de SEM en la Figura 4.16 muestra algunas de las ranuras longitudinales y radiales que se encontraron en las muestras. Estas ranuras podrían crear zonas de concentración de esfuerzos, lo que finalmente provocaría la falla del material. Luego, la aparición del esfuerzo y la deformación máxima estaría

relacionada con la presencia de dichas fallas. Como se mencionó en la sección anterior, se cree que las ranuras longitudinales son consecuencia del proceso mediante el cual se forman los bisos (Eckroat & Steele, 1993).

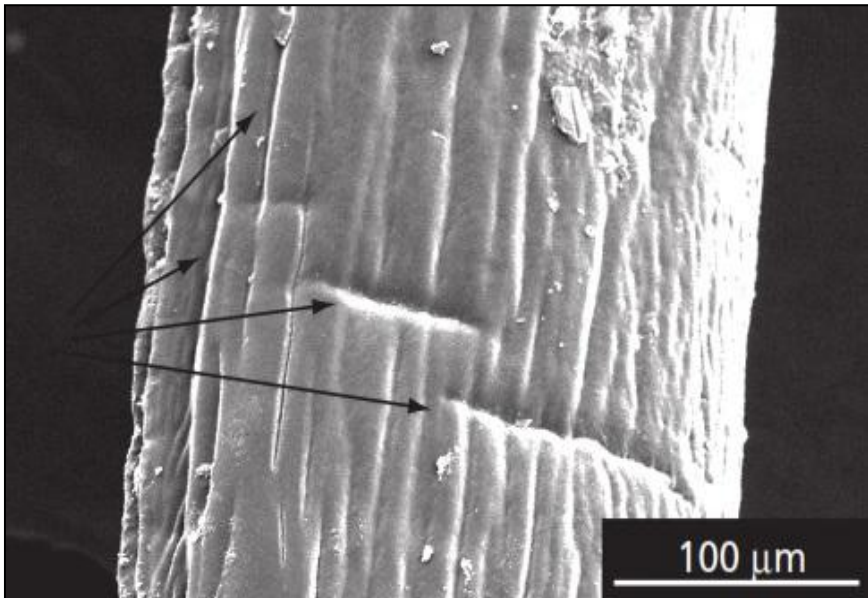


Figura 4.16. Micrografía SEM de una fibra de biso de mejillón *A. ater*. Las flechas muestran los defectos y ranuras presentes en la superficie. Tomado de (Torres et al., 2013).

Finalmente, para confirmar la presencia de colágeno en los bisos se llevó a cabo un ensayo de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). El espectro de la Figura 4.17 revela la presencia de los grupos amida. La banda de absorción de C=O a 1665 cm^{-1} está relacionada con la presencia de amida 1. La banda a

1555 cm^{-1} corresponde al grupo amida II (N-H). El enlace C-N localizado en 1235 cm^{-1} está asociado con el grupo amida III. La banda ancha a 3300 cm^{-1} se debe a los enlaces N-H. Las bandas más estrechas aproximadamente en 2900 cm^{-1} corresponden a vibraciones de enlaces C-H. La vibración de C-H aparece aproximadamente a 1450 cm^{-1} .

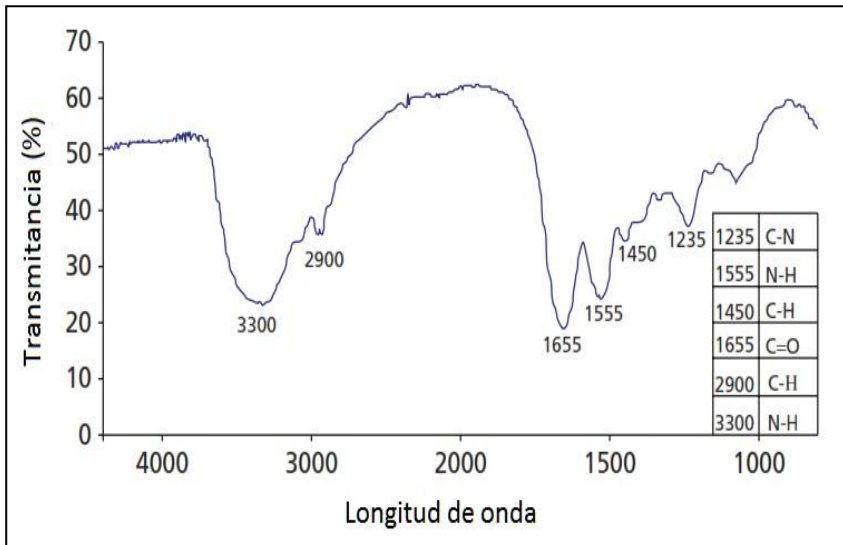


Figura 4.17. Espectro FTIR de un bisco de *A. ater*. Tomado de Torres et al. (2013).

2. Red de biopolímeros: La membrana de huevo

2.1. Caracterización morfológica

Luego de haber caracterizado y analizado el comportamiento mecánico de una fibra construida a partir de colágeno, se presenta la caracterización de una membrana bidimensional formada por fibras en un arreglo tipo red. La membrana de huevo (ESM, por sus siglas en inglés) se encuentra entre el cascarón y la clara del huevo (Figura 2.12). Su función es servir como límite y protección entre el caparazón y la clara, debiendo ser permeable para permitir el paso de gases.

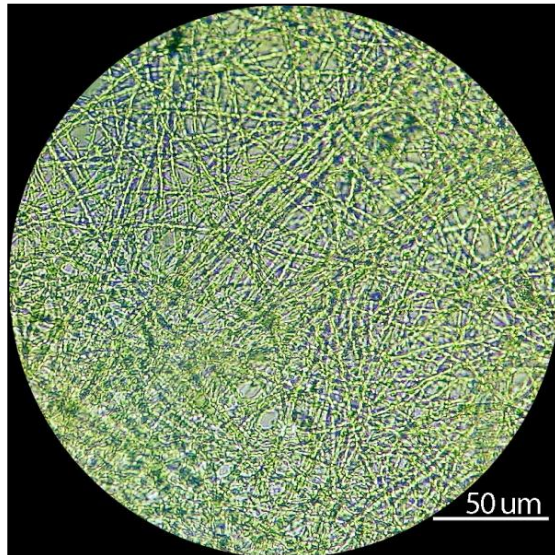


Figura 4.18. Micrografía óptica de la membrana de huevo. Tomado de (Torres et al., 2010).

Para caracterizar la morfología de esta red bidimensional tomaremos dos medidas importantes: el diámetro de las fibras que forman la red y el espacio formado por las partes vacías o poros de la red en estudio. La medida de dicho espacio se conoce como “tamaño de malla” (*mesh size*).

En la Figura 4.18 se observa la morfología de la red de la membrana de huevo vista en un microscopio óptico. Se observa que las fibras no están ordenadas en ninguna dirección determinada. Mediante análisis de imágenes se midió las características de la red. El diámetro promedio de las fibras es de $1.95 \pm 1.28 \mu\text{m}$ y el tamaño promedio de malla es de $3.96 \pm 3.70 \mu\text{m}$.

La Figura 4.19 muestra la membrana de huevo vista en un microscopio de barrido electrónico. En esta figura no se puede distinguir una red como en la Figura 4.18. La morfología de la muestra cambió debido al vacío al que fue sometido la muestra durante el ensayo, las fibras perdieron agua, se secaron y se perdió el arreglo tipo red. En cambio, la parte interna del caparazón mostrado en la Figura 4.20 no fue afectado por el vacío debido a que es una estructura mineralizada con muy poco contenido de agua.

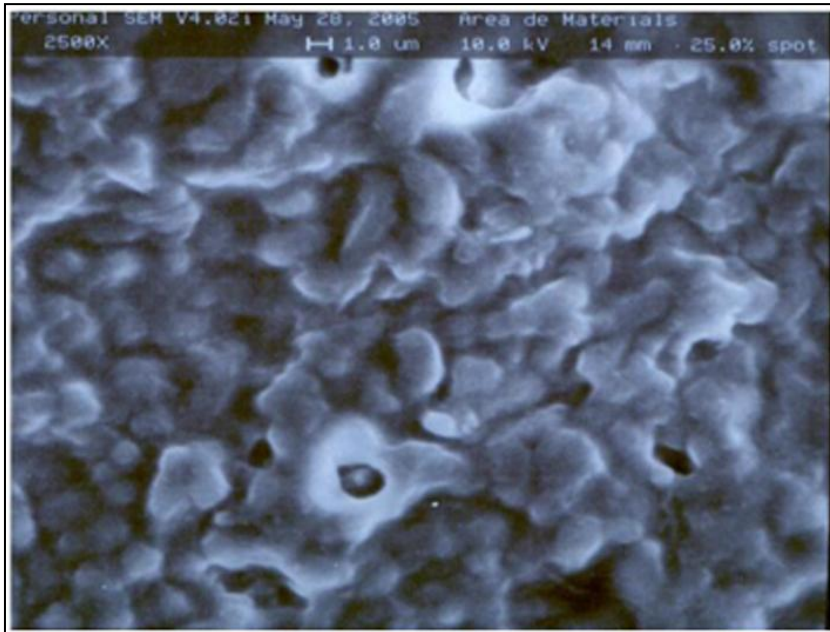


Figura 4.19. Imagen de microscopía de barrido electrónico de membrana de huevo. La muestra fue previamente metalizada y la prueba se realizó con vacío.

Las Figuras 4.21, 4.22 y 4.23 muestran la red observada bajo un microscopio de fuerza atómica (AFM). En la Figura 4.21 se puede observar la red coherente bidimensional, tal como se veía en la Figura 4.18. Utilizando análisis de imágenes se midieron las propiedades de esta red. El diámetro de las fibras es de alrededor de $2.87 \mu\text{m}$ y la distancia entre fibras (tamaño de malla) es de $4.02 \mu\text{m}$.

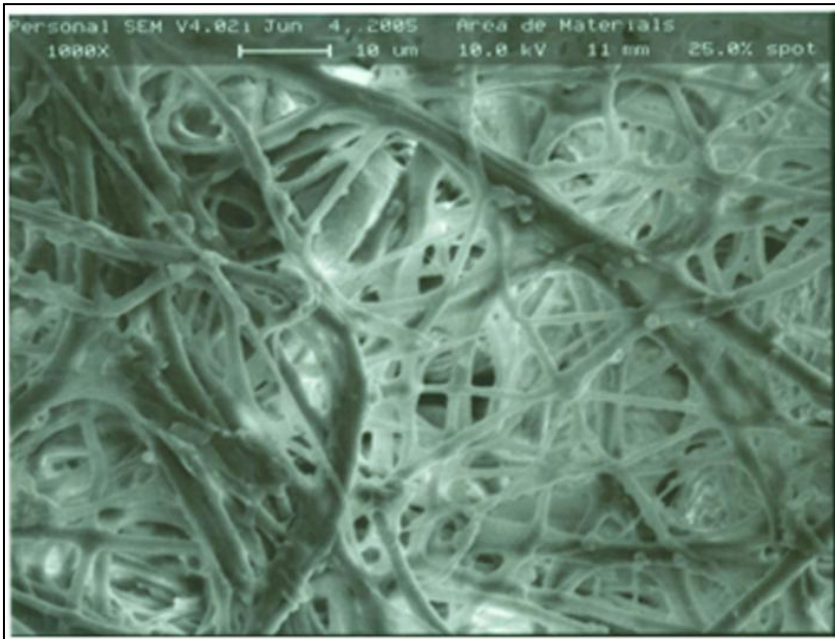


Figura 4.20. Imagen de microscopía de barrido electrónico de la parte interna del caparazón de huevo. La muestra fue previamente metalizada y la prueba se realizó con vacío.

La diferencia entre las medidas tomadas de las imágenes del microscopio óptico y el AFM pueden deberse a las condiciones experimentales. En el caso de las imágenes con microscopio óptico, la membrana de huevo se mantiene hidratada durante todo el tiempo. En cambio para tomar las imágenes en el AFM, es necesario secar (al aire) primero la membrana debido al tipo de AFM que se usó.

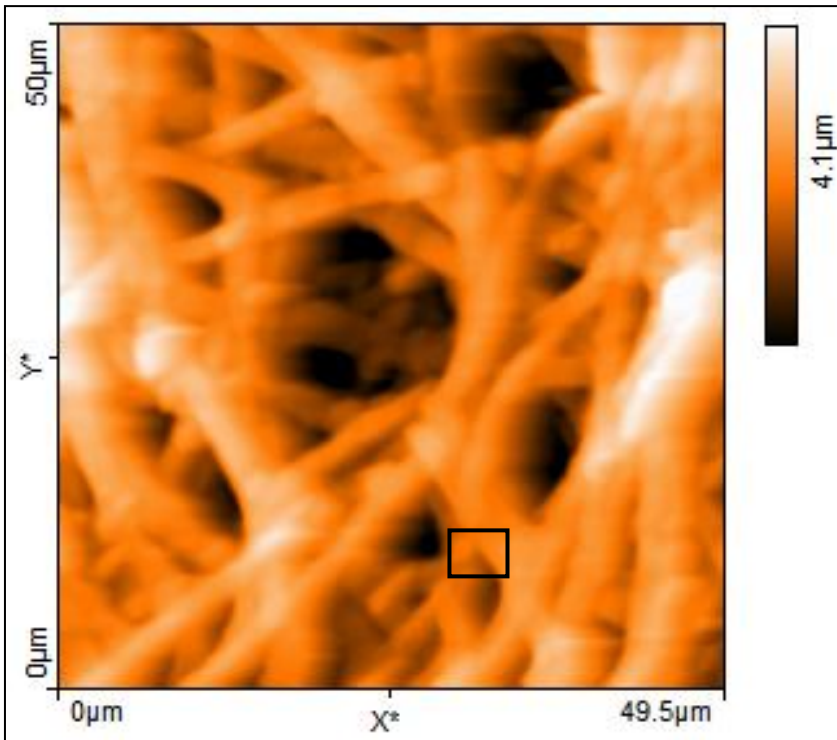


Figura 4.21. Imagen de microscopía de fuerza atómica de membrana de huevo. Se puede observar que la membrana está formada por una red coherente de fibras. Tomado de Torres et al. (2010).

La Figura 4.22 muestra una de las fibras que conforma la red de la membrana de huevo. Esta figura se obtuvo haciendo un acercamiento a la Figura 4.21 (rectángulo marcado). La fibra que se está observando en esta imagen tiene un diámetro de $2.21 \mu\text{m}$. La Figura 4.23 es, a su vez, un acercamiento hecho a la Figura 4.22. Esta figura sugiere que las fibras tienen una estructura jerárquica, ya

que la fibra parece estar formada por varias fibrillas. La fibrilla observada tiene una altura de 102 nm y un ancho de 370 nm.

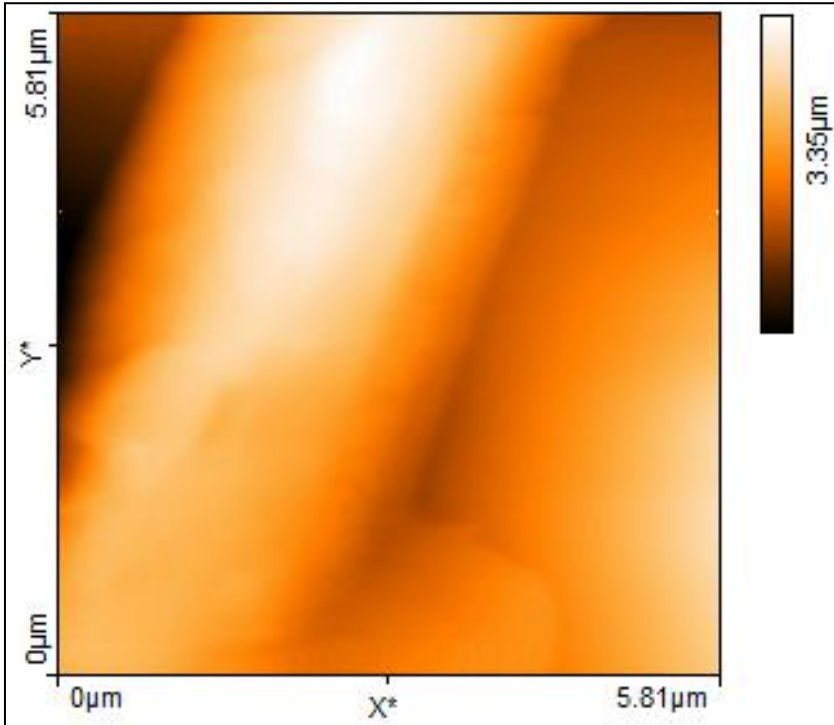


Figura 4.22. Imagen de microscopía de fuerza atómica de de una de las fibras que forma la membrana de huevo. Tomado de Torres et al. (2010).

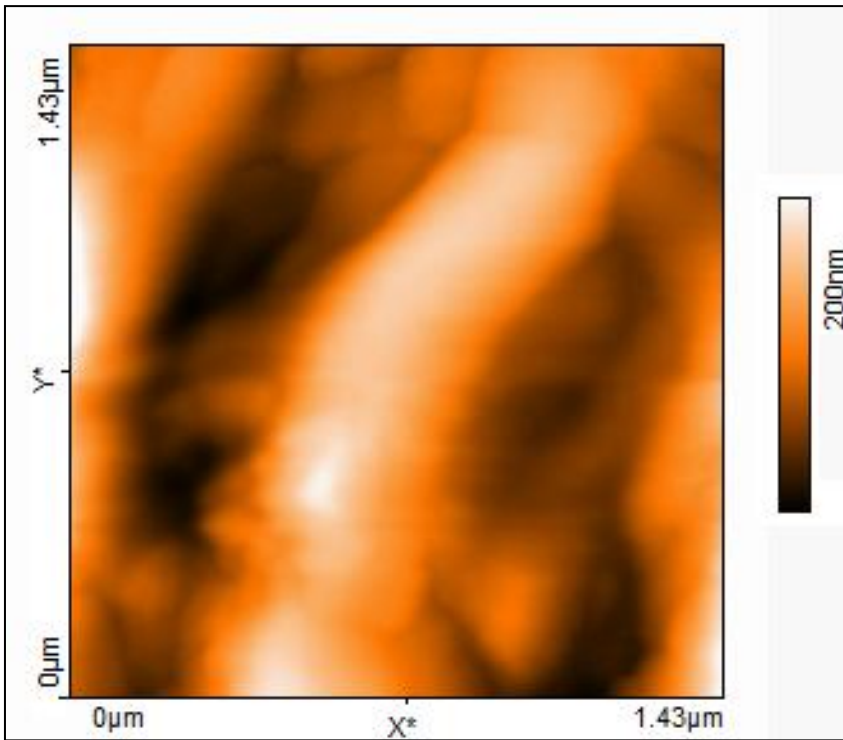


Figura 4.23. Acercamiento de la imagen de la Figura 4.22. Se observa la topografía de una de las fibras que forman la membrana de huevo. Tomado de Torres et al. (2010).

Los valores promedios de diámetro y tamaño de malla presentados no son suficientes para describir la morfología de la red debido a que en realidad se encuentra una dispersión en el valor de esos parámetros. La Figura 4.24 muestra la dispersión en los valores de los diámetros de fibras medidos usando un software de análisis de imágenes (los resultados mostrados son de las imágenes de microscopía óptica). Se puede observar que los diámetros varían

entre 1 a 5 μm . La mayoría de los diámetros (más del 40%) tienen un valor de alrededor de 2 μm y alrededor del 80% se encuentran entre 1-3 μm .

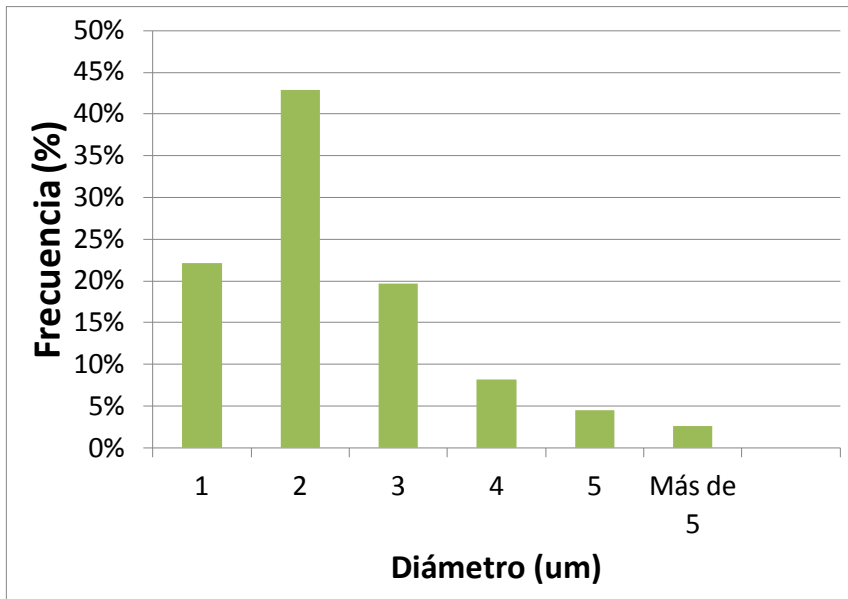


Figura 4.24. Diagrama de frecuencia de las medidas de los diámetros de las fibras que forman la red de la membrana de huevo. Tomado de (Torres et al., 2010).

La Figura 4.25 muestra la dispersión que hay en los valores del tamaño de malla. Estos valores se encuentran en el rango de 1 a 10 μm . Alrededor del 25% de los valores está dentro de 1 μm . A diferencia de la distribución de diámetros de fibra, en este caso los valores siguen una distribución bimodal.

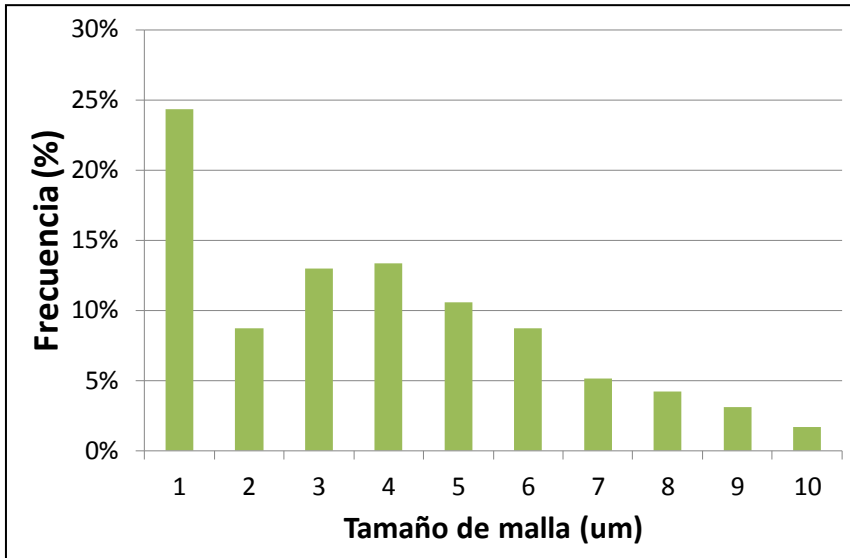


Figura 4.25. Diagrama de frecuencia del tamaño de malla de la red de la membrana de huevo. Tomado de (Torres et al., 2010).

2.2. Propiedades mecánicas

Para esta membrana se han estudiado las propiedades mecánicas en dos niveles diferentes. En el primer nivel se han analizado las propiedades de las fibras individuales que componen la red. En el segundo nivel, se han medido las propiedades de la red completa (membrana). Se han utilizado los resultados del análisis del primer nivel junto con un marco teórico adecuado para estimar las propiedades de la red completa a partir de las propiedades de las

fibras individuales. Las predicciones teóricas se han comparado con los resultados experimentales.

2.3. Análisis de las propiedades de las fibras individuales

Debido a las dimensiones de las fibras individuales sus propiedades mecánicas no pueden medirse mediante un ensayo de tensión, sino que debe usarse una técnica diferente. Para este estudio se usaron pruebas de nanoindentación llevadas a cabo en un microscopio de fuerza atómica (AFM). En los ensayos de nanoindentación el cantiléver del AFM es acercado a la muestra hasta hacer que la penetre (carga) y, luego, es retirado (descarga). Durante toda la prueba se registra la deflexión en el cantiléver junto con la distancia entre la muestra y el cantiléver (altura Z).

La Figura 4.26 muestra los resultados de la prueba de nanoindentación. A medida que el cantiléver se acerca a la muestra, el valor de la deflexión es constante hasta que la punta hace contacto con la superficie de la muestra. El cambio brusco del valor de la deflexión se debe a las fuerzas atractivas entre la punta y la muestra (por ejemplo interacciones de van der Waals).

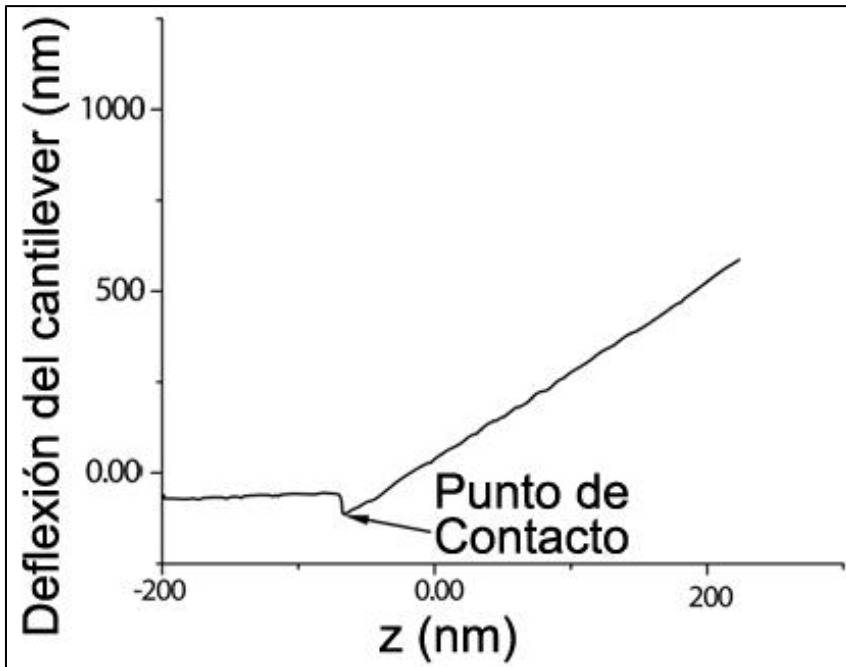


Figura 4.26. Curva obtenida en el ensayo de nanoindentación en la que se grafica la deflexión del cantiléver en función de su altura vertical (con respecto a la muestra). Tomado de (Torres et al., 2010).

Se ha utilizado la ecuación 3.1 (ver capítulo 3) para calcular el módulo de Young. Los valores del módulo de Young para las fibras están entre 4.2 y 38.1 MPa, con un valor promedio de 19.8 ± 14.3 MPa. Pruebas similares realizadas en otras estructura de colágeno tipo I han dado valores de 0.25 – 3 GPa (Strasser et al., 2007). Esta diferencia podría deberse a que las fibras de esta membrana no están formadas por colágeno puro sino por colágeno y otras proteínas,

además debe tenerse presente el error experimental de este tipo de prueba.

El módulo de Young de las fibras individuales puede ser usado para estimar el módulo de la red. Para ello usamos el análisis de sólidos celulares realizado por Gibson y Ashby (Gibson & Ashby, 1999). Este análisis ha sido usado también para estimar las propiedades de redes de actina (Satcher & Dewey, 1996). De acuerdo con este análisis, las propiedades mecánicas de las redes pueden ser aproximadas en términos de las propiedades de las fibras individuales y constantes empíricas. El módulo de Young de la red (E_n) se relaciona con el módulo de la fibra (E_f) y la densidad relativa (ρ_n/ρ_f) mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{E_n}{E_f} = A_1 \left(\frac{\rho_n}{\rho_f} \right) \quad \dots \text{(Ec. 4.5)}$$

donde A_1 es una constante empírica y ρ es la densidad de los materiales. Los subíndices n y f se refieren a las propiedades de la red (n) y de las fibras individuales (f). Los datos experimentales de otros estudios en sólidos celulares muestran que el valor de A_1 puede asumirse como 1. La porosidad de la red fue estimada mediante análisis de imágenes. La densidad relativa se calcula en base a la ecuación 4.6:

$$P = 1 - \left(\frac{\rho_n}{\rho_f} \right) \quad \dots \text{(Ec. 4.6)}$$

Luego el módulo de Young de la red es alrededor de 4.55 MPa. Este valor es similar a los valores obtenidos experimentalmente (Tabla 4.4).

2.4. Análisis de las propiedades de la red

Como en el caso del biso, el comportamiento mecánico de las estructuras de colágeno genera curvas con gráficas no lineales. La Figura 4.27 muestra una curva representativa, similar a la que se observa en pruebas de estructuras de colágeno como tendones (Buehler & Wong, 2007; Misof et al., 1997; Fratzl et al., 1997; Freed and Doehring, 2005; Roeder and Kokini, 2002). Se reportan tres regiones diferentes. En la primera región (1, “toe región”) se necesita poco esfuerzo para deformar la red. En la segunda región (2, “*hill region*”) la rigidez de la red se incrementa con la deformación.

Finalmente, se alcanza una región lineal en la que el material obedece la ley de Hooke.

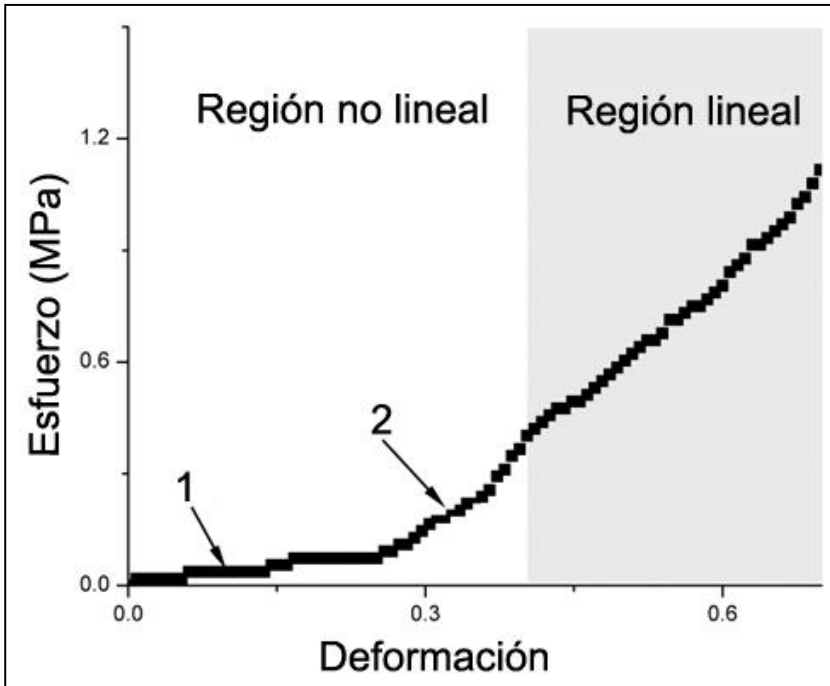


Figura 4.27. Curva representativa de esfuerzo-deformación para la membrana de huevo. Tomado de (Torres et al., 2010).

En los tendones, la región 1 está presente hasta que la deformación es aproximadamente un 4% (Silver et al., 1992). Estudios de sistemas de colágeno realizados con microscopía de luz polarizada muestran que las fibras de colágeno no sometidas a deformaciones presentan zonas con la presencia de “rizos macroscópicos” (Silver et al., 1992; Abrahams, 1967). La primera región (1) en las curvas de esfuerzo-deformación ha sido relacionada con un proceso mediante

el cual se inicia la desaparición de dichos “rizos” en las fibras de colágeno. Además, algunos estudios hechos en moléculas de tropocolágeno sugieren que esta región es una consecuencia de la elasticidad entrópica del colágeno (Buehler and Wong, 2007).

Este tipo de elasticidad entrópica también se encuentra en otras biomoléculas como el DNA. En el caso del DNA, la elasticidad entrópica incluye pequeñas desviaciones del eje molecular debido a fluctuaciones térmicas (Smith et al., 1996). Las moléculas de DNA han sido modeladas como resortes entrópicos y su comportamiento se ha descrito por el modelo WLC (“*worm like chain model*”) (Bustamante et al., 1994; Marko et al., 1995; Odijk et al., 1995). Sin embargo, llegado cierto nivel de deformación (cuando la extensión de la molécula de DNA es mayor que su longitud de contorno), el comportamiento de la molécula de DNA se desvía del modelo WLC y entra en un régimen dominado por la elasticidad entálpica (Bauman et al., 1997). Buehler y Wong (2007) han reportado que las moléculas de colágeno siguen un comportamiento similar el cual explicaría la transición que ocurre en la Figura 4.27 desde la región 1 (dominada por la elasticidad entrópica) a las regiones (2) y (3) dominadas por la elasticidad entálpica.

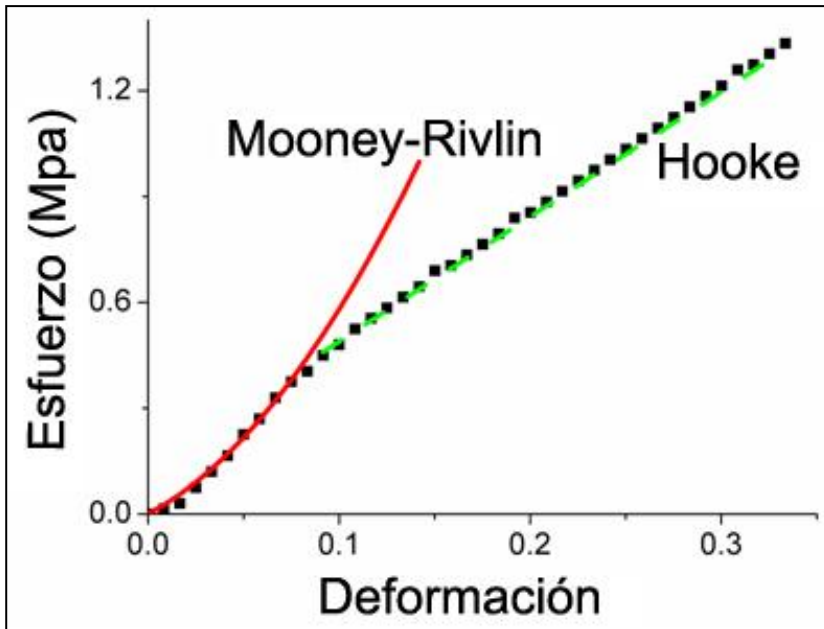


Figura 4.28. Curva de esfuerzo-deformación representativa para la membrana de huevo sumergida en agua. Los datos experimentales (•) están graficados junto con las estimaciones teóricas hechas con la expresión de Mooney-Rivlin (-) y la relación lineal de la ley de Hooke (- -). Tomado de (Torres et al., 2010).

Como en el caso del biso, se puede usar la ecuación de Mooney-Rivlin (Ec. 4.3) para modelar la zona no lineal de la curva obtenida. En la Figura 4.28, se muestran los valores experimentales y los cálculos teóricos para una curva representativa. Cabe recordar que la relación de Mooney-Rivlin es usada típicamente para estudiar la elasticidad del caucho (dominada por efectos entrópicos). El caucho es un elastómero formado por una red de cadenas de polímeros entrecruzados cuya deformación tiene un origen entrópico. Según

las curvas obtenidas en este estudio podríamos sugerir que la deformación de estas redes tiene también un origen entrópico.

Tabla 4.4. Propiedades mecánicas de la membrana de huevo sumergida en agua destilada para dos direcciones diferentes de carga.

	Dirección horizontal	Dirección vertical
Módulo de Young (MPa)	4.00 ± 1.27^a	5.50 ± 3.26^a
Esfuerzo máximo (MPa)	1.72 ± 0.62^a	1.42 ± 1.01^a
Deformación máxima (%)	42.3 ± 9.6^a	38.3 ± 9.4^a

* Los valores son promedios \pm DE (desviación estándar). Las letras indican los diferentes grupos de acuerdo con el análisis de varianza llevado a cabo (comparación de Student-Newman-Keuls).

El comportamiento mecánico de membrana de huevo también se relaciona con los diferentes niveles de organización de dicho sistema. En el nivel más bajo, los arreglos de proteína fibrosas forman las fibras de la membrana. En el nivel superior, estas fibras forman la red observada en las Figuras 4.18-4.23. La región modelada con la relación de Mooney-Rivlin se relaciona con el nivel más bajo de organización donde las proteínas fibrosas sufren una deformación entrópica. Por otro lado, el nivel superior está relacionado con el comportamiento lineal de la red similar al

descrito por Gibson (Gibson & Ashby, 1999) en su trabajo sobre los sólidos celulares.

En la Tabla 4.4 se listan los valores del módulo de Young (calculado en la región lineal de la curva), el esfuerzo máximo y la deformación máxima para pruebas de tensión uni-axial de la membrana de huevo sumergida en agua destilada. Se puede apreciar que las pruebas se han llevado a cabo seleccionando muestras extraídas en dos direcciones diferentes: horizontal y vertical. La dirección horizontal es la que está sobre las líneas hemisféricas, mientras que la vertical es la que está sobre la línea ecuatorial. No se obtuvo resultados estadísticamente independientes al variar la dirección de la muestra. La caracterización morfológica no mostró que las fibras de la red tuvieran ningún tipo de alineamiento en alguna dirección preferente. Al estar las fibras distribuidas al azar, sin ninguna dirección preferente, las propiedades mecánicas de la red serían iguales en todas las direcciones.

En la Tabla 4.5 están listados los valores del módulo de Young, el esfuerzo máximo y la deformación máxima para los ensayos de tensión realizados en agua, clara y aire. El análisis de varianza ANOVA indica que los valores son estadísticamente independientes para los tres medios. La desviación estándar es menor en las pruebas realizadas en clara ($\approx 10 - 25\%$), comparada con la desviación estándar obtenida en las pruebas hechas en agua ($\approx 25 - 70\%$) y aire ($\approx 35 - 60\%$). Esta alta variabilidad en los resultados podría estar relacionada con las condiciones experimentales. Al parecer las

muestras conservan mejor su estructura cuando son ensayadas en su ambiente natural (clara).

Tabla 4.5. Propiedades mecánicas de la membrana de huevo ensayada en tres medios diferentes. Adaptada de (Torres et al., 2010).

	Agua	Clara	Aire
Módulo de Young (MPa)	5.50 ± 3.26 ^a	5.03 ± 0.61 ^b	235.24 ± 86.47 ^c
Esfuerzo máximo (MPa)	1.42 ± 1.01 ^a	1.84 ± 0.53 ^b	6.40 ± 2.52 ^c
Deformación máxima (%)	38.3 ± 9.4 ^a	37.3 ± 5.1 ^b	4.8 ± 2.8 ^c

Los valores son promedios ± DE (desviación estándar). Las letras indican los diferentes grupos de acuerdo con el análisis de varianza llevado a cabo (comparación de Student-Newman-Keuls).

El módulo de Young de los sistemas basados en biopolímeros depende en gran medida del medio en el que se realice el ensayo. Las muestras secas de membrana de huevo ensayadas en aire mostraron el mayor módulo de Young (235.24 MPa). La dependencia de las propiedades mecánicas en el medio indica que el agua y la albumina (clara) actúan como agentes plastificantes que interactúan con las moléculas de polímeros que forman las fibras de la membrana de huevo. Se han observado comportamientos similares en otras fibras naturales de proteínas, como la seda *Bombyx mori* y la seda de araña

(Perez-Rigueiro et al., 2003; Perez-Rigueiro et al., 2000). Cuando se secan las muestras de membrana de huevo habría un aumento en el número de enlaces de hidrógeno que se establecen entre las cadenas de colágeno, por lo tanto se puede observar un aumento de rigidez a la tracción.

Al igual que en el caso de los bisos de mejillones, se hicieron ensayos de tensión con las muestras sumergidas en agua a temperaturas controladas para evaluar el efecto de la temperatura en las propiedades mecánicas de la red. Las curvas representativas de esfuerzo-deformación de las muestras de membrana de huevo ensayadas en agua a 10, 30, 50 y 70 °C se muestran en la Figura 4.29. Estas curvas se asemejan a las curvas de esfuerzo-deformación de otros sistemas biológicos tales como tendones (Buehler & Wong, 2007; Fratzl et al., 1997; Freed & Doehring, 2005; Misof et al., 1997; Roeder & Kokini, 2002).

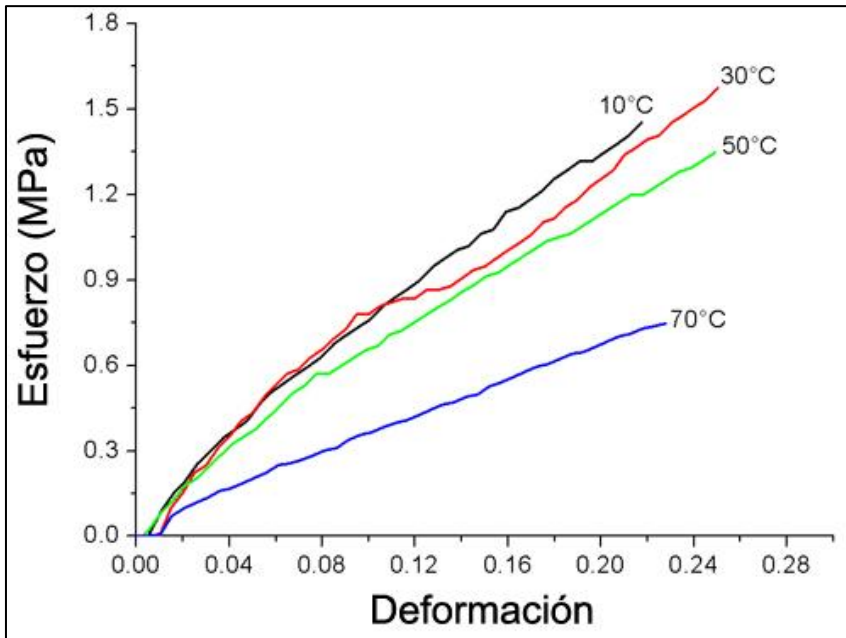


Figura 4.29. Curvas representativas de esfuerzo-deformación de muestras de membrana de huevo sumergida en agua y ensayadas a 10, 30, 50, y 70°C. Tomado de (Torres et al., 2013).

Los resultados muestran que el valor del módulo de Young depende de la temperatura de la muestra. Los valores superiores se alcanzan a 10 °C, mientras que los valores más bajos corresponden a las muestras analizadas a 70 °C. Este tipo de dependencia se ha reportado para muchos polímeros incluyendo el polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo, PPTA (Kevlar®), tereftalato de polietileno (PET), entre otros. En estos polímeros, para las regiones lejos de cualquier transición térmica, el módulo de Young es una

función lineal de temperatura con una pendiente negativa (Lagakos et al., 1986).

Para los datos experimentales presentados, el módulo de Young (E) está relacionado con la temperatura (T) de acuerdo con la siguiente expresión:

$$E = -0.75T + 6.17 \quad (\text{Ec. 4.7})$$

Watts et al. (Watts et al., 1987) llevaron a cabo ensayos de compresión sobre las estructuras a base de dentina y mostraron que el módulo de elasticidad a la compresión de tales estructuras muestra una dependencia lineal con la temperatura. La misma dependencia de la temperatura con el módulo de Young se ha observado para cartílagos, queratina, seda de araña y otras estructuras de proteínas. (Bonser & Purslow, 1995; Chae et al., 2003).

Como ya se ha discutido, la evidencia sugiere que parte de la deformación de la membrana de huevo se debe en parte a la elasticidad entrópica que gobierna el comportamiento de las moléculas de colágeno (para ciertos niveles de deformación) y en parte se debe a la elasticidad entálpica (cuando se han superado niveles iniciales de deformación). La relación inversa de la temperatura de ensayo con módulo de Young medido en los experimentos presentados acá, sugiere que la deformación tiene un origen predominantemente entálpico. Análogamente al análisis realizado para los bisos de mejillones, si se analiza la Ec. 4.4 se puede concluir que en los materiales elastoméricos como el caucho

(donde el modo de deformación es entrópico), el módulo está en relación directa con la temperatura (a mayor temperatura, mayor módulo).

La Tabla 4.6 muestra los módulos de Young, resistencia máxima y deformación máxima obtenidas en los ensayos de tensión uni-axial. Estos valores son similares a los de las Tablas 4.4 y 4.5. El análisis de ANOVA confirma que los módulos de Young encontrados para cada temperatura son estadísticamente independientes.

Tabla 4.64 Propiedades mecánicas de las muestras de membrana de huevo sumergidas en agua a diferentes temperaturas. Adaptada de (Torres et al., 2013).

Temperatura (°C)	10	30	50	70
Módulo de Young (MPa)	5.95 ± 0.27 ^a	4.56 ± 0.543 ^b	3.75 ± 1.01 ^c	3.21 ± 0.17 ^d
Esfuerzo máximo (MPa)	1.83 ± 0.66 ^a	1.23 ± 0.55 ^b	1.28 ± 0.43 ^c	0.99 ± 0.43 ^d
Deformación máxima (%)	0.27 ± 0.08 ^a	0.27 ± 0.09 ^b	0.30 ± 0.1 ^c	0.31 ± 0.13 ^d

* Los valores son promedios ± DE (desviación estándar). Las letras indican los diferentes grupos de acuerdo con el análisis de varianza llevado a cabo (comparación de Student-Newman-Keuls).

Por el contrario, el esfuerzo máximo y la deformación máxima no parecen depender de la temperatura de la muestra. Otros resultados de las pruebas encontradas en la literatura para fibras a base de colágeno han demostrado que el límite de la extensibilidad de tales estructuras es de alrededor de 4% de deformación (Feughelman, 2002). Se ha sugerido que a esta deformación se alcanza la máxima deformación admisible de las moléculas de colágeno, las cuales empezarían a desnaturalizarse (ruptura de la triple hélice que forma las moléculas de colágeno) dando lugar a una falla mecánica (Feughelman, 2002).

El comportamiento térmico de la membrana de huevo muestra un patrón similar en comparación con el biso de mejillones estudiado en este trabajo o las escamas de pescado (Bonser & Purslow, 1995). La Figura 4.30 muestra las curvas de DSC de las muestras de membrana de huevo con 0, 20, 40 y 60% de contenido de agua. Las muestras con contenido de agua al 0, 20 y 40% muestran dos picos endotérmicos mientras que la muestra con 0% de contenido de agua muestra solo un pico.

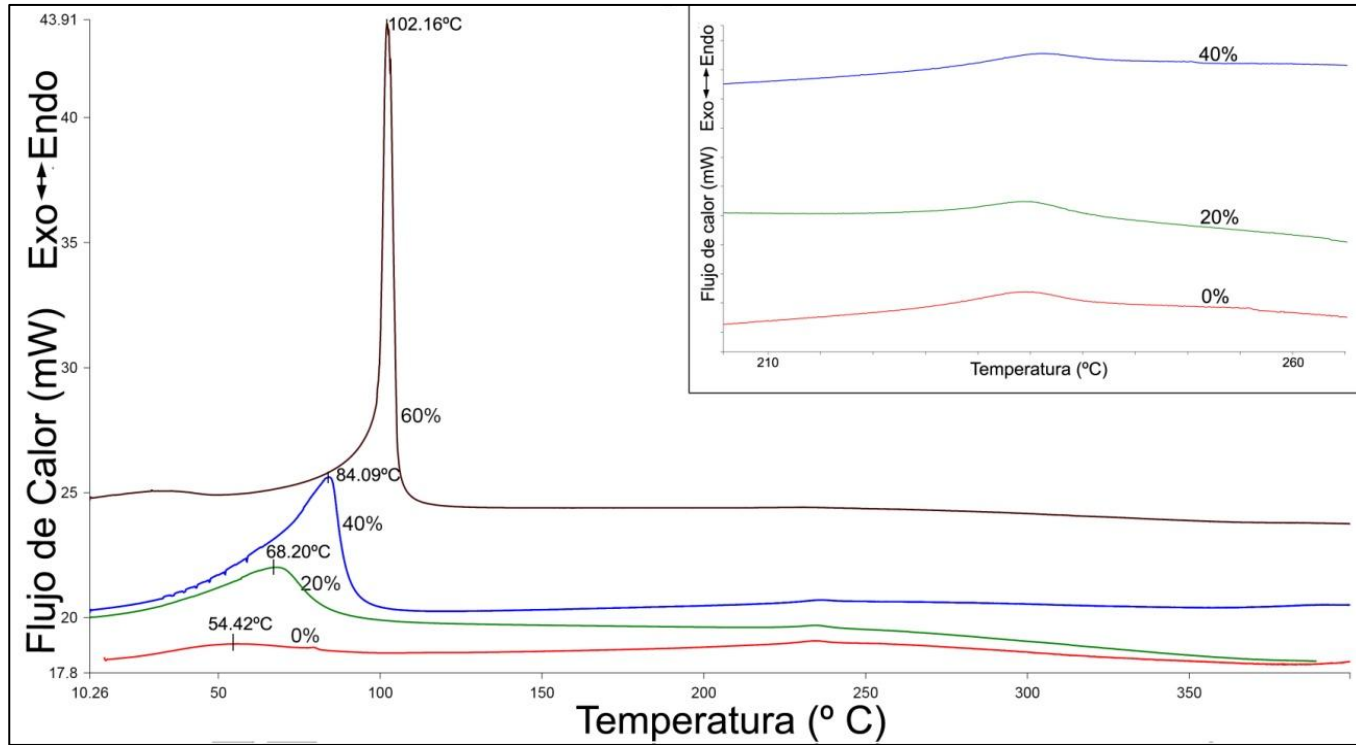


Figura 4.30. Curva representativa de DSC de las muestras con diferentes contenidos de agua. Tomado de (Torres et al., 2013).

El primer pico endotérmico observado en estos experimentos se produce a 50-55 °C para muestras secas y a 70-100 °C para muestras con contenido de agua en el rango de 20-60% y puede estar asociado con la desnaturalización térmica del colágeno. De acuerdo con Miles y Bailey (2001), la desnaturalización del colágeno es un proceso que implica la ruptura de enlaces de hidrógeno y un reordenamiento de la triple hélice de colágeno en una configuración de cadena al azar (*random coil*).

Otros estudios que han publicado pruebas de DSC realizadas en muestras de colágeno de otras fuentes como tendones humanos y de animales muestran un pico endotérmico a 60-65 °C (Wiegand et al., 2010; Willet et al., 2007). Esto concuerda con el pico observado en las muestras secas del presente estudio (≈ 65 °C). Trębacz y Wójtowicz (Trębacz & Wójtowicz, 2005) han reportado que la temperatura de desnaturalización del colágeno del tendón de un bovino tiene lugar a 82 °C. Miles y Ghelashvili (Miles & Ghelashvili, 1999) reportaron que la temperatura de desnaturalización del colágeno del tendón de una rata se daba a 65.5 °C en fibras que contienen 11.5% de agua.

El segundo pico se produce casi a la misma temperatura (235 °C) para las muestras de contenido de agua igual a 0, 20 y 40%. Este pico es mucho más pequeño que el primero. Podría darse debido a la degradación térmica del colágeno. Tal degradación es confirmada por la curva de TGA mostrada en la Figura 4.31 donde la degradación térmica comienza alrededor de 250 °C.

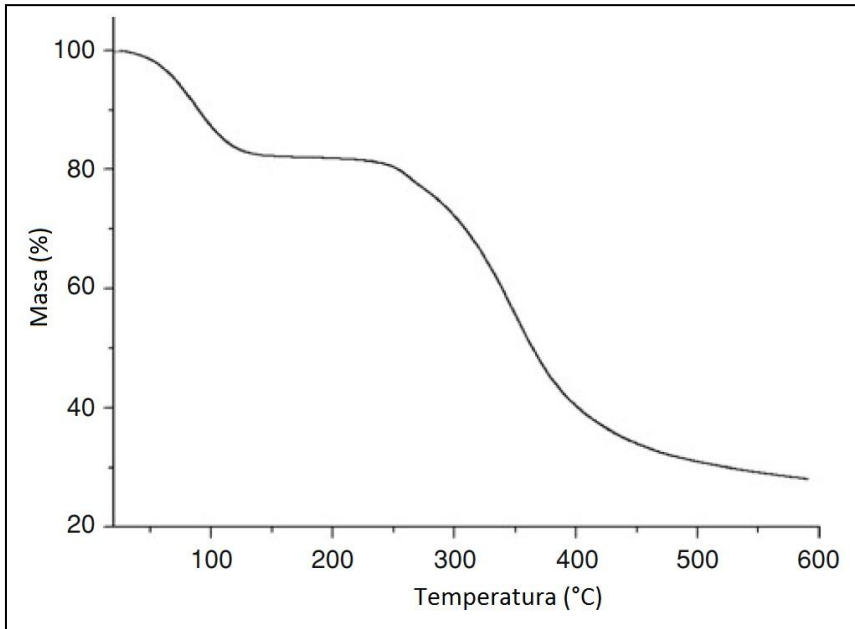


Figura 4.31. Variación de la masa con respecto a la temperatura de una muestra de membrana de huevo obtenida en un analizador termogravimétrico. Tomado de (Torres et al., 2013).

Se sabe que el agua puede inducir cambios estructurales en los polímeros. Las moléculas de agua pueden formar enlaces de hidrógeno con los grupos amida. El agua actúa como un plastificante y modifica las propiedades mecánicas tales como el módulo de Young y la resistencia máxima de varios polímeros. Además, puede bajar la temperatura de transición vítrea de los biopolímeros semicristalinos (Vollrath & Porter, 2006).

Diferentes estudios han sugerido que el agua juega un papel importante en el mantenimiento de la conformación de las moléculas de colágeno (Bigi et al., 1987; Bella et al., 1995; Miles et al., 1995). Bella et al. (Bella et al., 1995) han propuesto que la triple hélice de colágeno está recubierta por un cilindro de hidratación en el que las moléculas de agua crean enlaces de puentes de hidrógeno que unen los grupos carbonilo o hidroxilo de las tres cadenas de colágeno.

Algunos autores (Miculescu, 2012; Sionkowska, 2000; Sionkowska & Kamińska, 1999) han sugerido que los picos endotérmicos de las pruebas de DSC también pueden ser originados por la liberación de enlaces de agua. El enlace de agua usualmente se fija por los puentes de hidrogeno entre las fibrillas de colágeno y entre la triple hélice (Sionkowska & Kamińska, 1999). Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar cuantitativamente el efecto de los enlaces de agua en los picos observados en los experimentos realizados en este trabajo.

La Figura 4.30 muestra un desplazamiento del pico de desnaturalización en relación con el contenido de agua de las muestras. Es decir, el contenido de agua afecta a la temperatura a la que se produce el pico de desnaturalización. Las muestras secas muestran este pico alrededor de 65 °C, mientras que para las muestras con 60% de contenido de agua, el pico se produce aproximadamente a los 100 °C. Estudios previos realizados sobre estructuras a base de colágeno, tales como huesos muestran un patrón térmico diferente en el que la deshidratación de colágeno

induce una mayor rigidez en esas estructuras ni un aumento en su estabilidad térmica (Kopp et al., 1990; Miles & Ghelashvili, 1999).

3. Red tridimensional: El manto del calamar gigante

3.1. Caracterización morfológica

El último material de análisis en este trabajo es el músculo del manto del calamar gigante de la especie *Dosicus gigas*. Las imágenes de microscopía revelan que este material puede ser considerado como una red tridimensional. La Figura 4.32 muestra una micrografía de la sección transversal de un manto liofilizado de *D. Gigas* (DGM). Se observó un gran número de cavidades porosas e irregulares que recuerdan la morfología de celdas abierta donde las celdas están separadas por paredes delgadas (Figura 4.32 b).

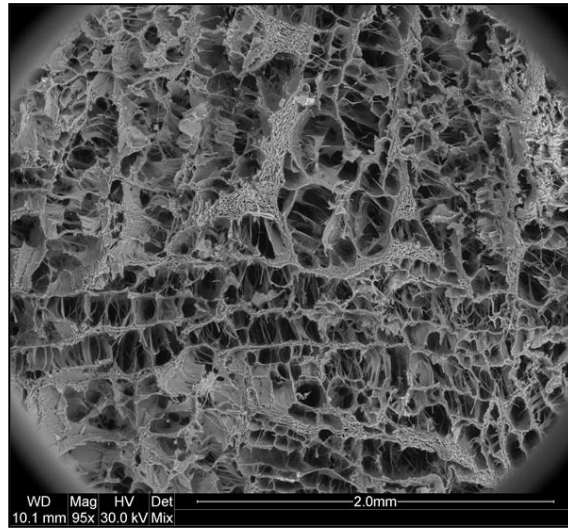


Figura 4.32a. Imagen de microscopía electrónica de barrido de muestra del músculo del manto de *D. gigas*. Se puede observar una estructura porosa con poros abiertos y paredes delgadas.

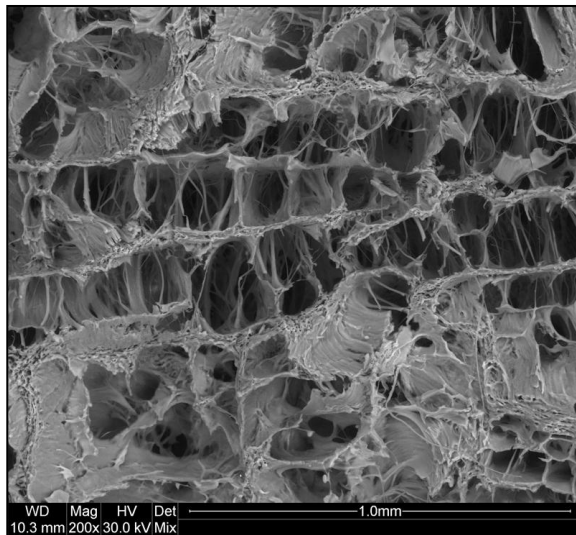


Figura 4.32b. Imagen de microscopía electrónica de barrido de muestra del músculo del manto de *D. gigas*. Se puede observar la presencia de fibras en las paredes y los poros.

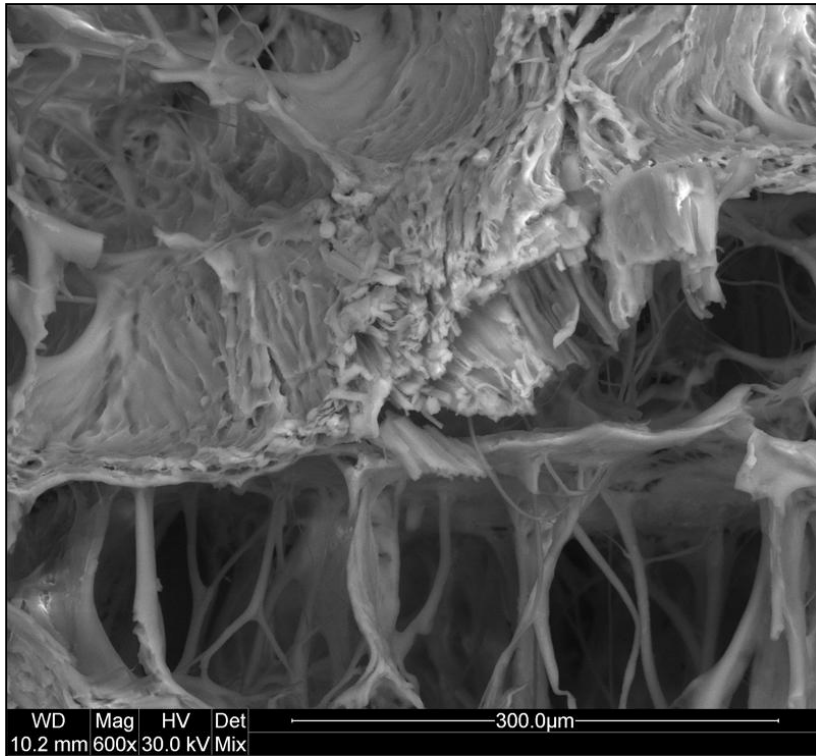


Figura 4.32c. Imagen de microscopía electrónica de barrido de muestra del músculo del manto de *D. gigas*. Detalle de una de las paredes que muestra el agrupamiento de fibras.

Se utilizó el análisis de imagen con el fin de realizar una medición de las dimensiones de las cavidades. Las celdas abiertas observadas en las muestras miden entre 50-250 µm aproximadamente (Figura 4.33). El espesor de pared de las cavidades de células se estimó a partir de las micrografías SEM aproximadamente en 10 µm.

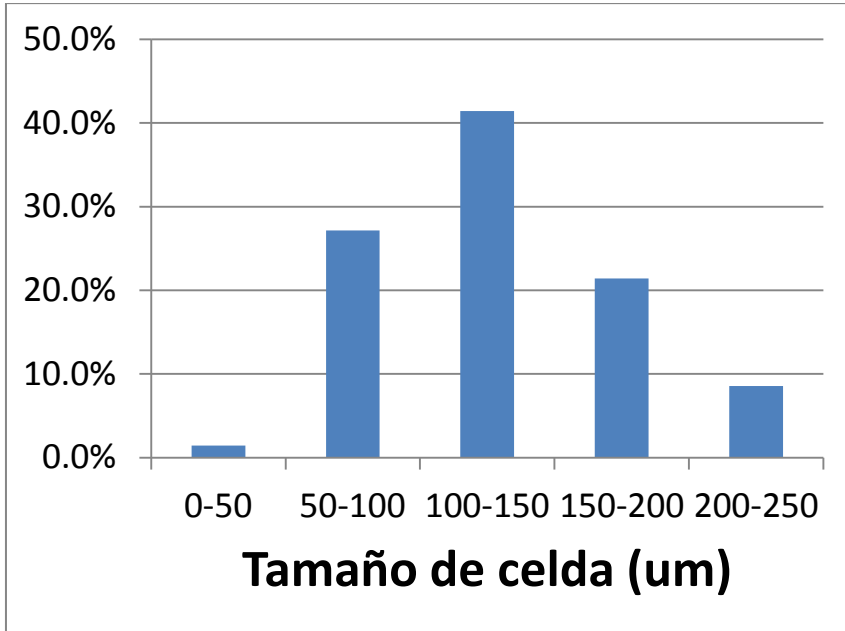


Figura 4.33. Distribución de tamaños de celdas encontradas en las muestras del músculo del manto de *D. gigas*.

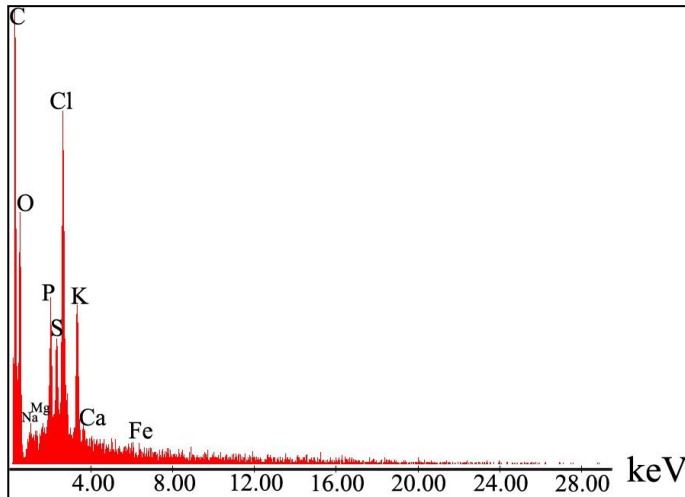


Figura 4.34. Espectro de EDX de una muestra del músculo del manto de *D. gigas*

La Figura 4.34 muestra la composición elemental del DGM. Se han encontrado altas concentraciones de carbono, oxígeno, cloro, fósforo, potasio y azufre. Por otra parte, también se encontraron bajas concentraciones de sodio, magnesio, calcio, hierro y silicio.

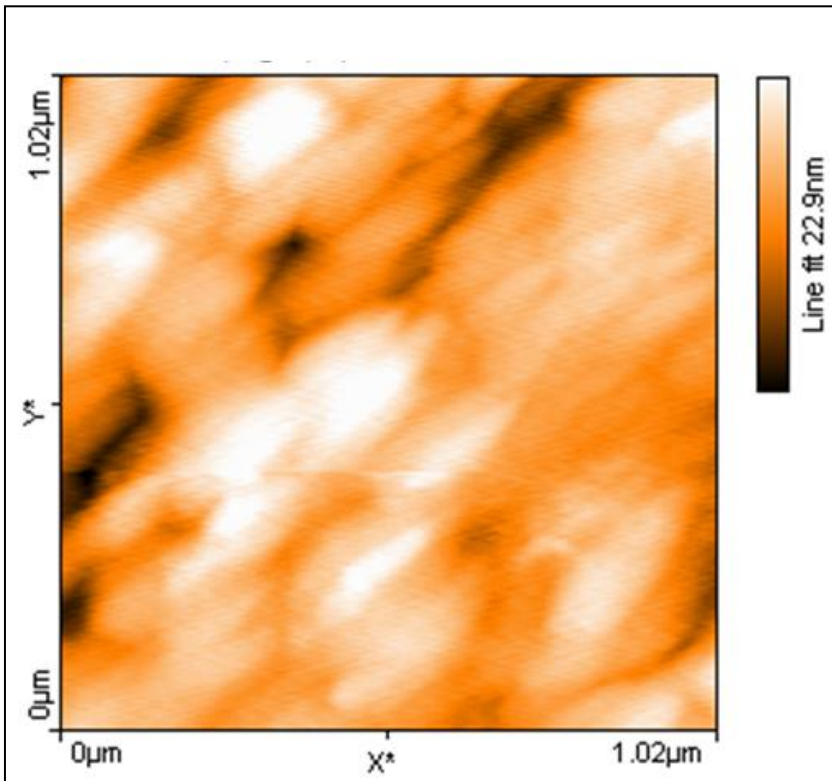


Figura 4.35a. Imagen de microscopía de fuerza atómica de muestra del músculo del manto de *D. gigas*.

Las imágenes de microscopía de fuerza atómica se muestran en la Figura 4.35. A diferencia de las imágenes de SEM, con el AFM no es posible ver la estructura de celdas abiertas debido a que para estos ensayos se usó una muestra secada al aire (con una deformación de la red al perder agua). Sin embargo, se puede apreciar la topografía de una estructura porosa.

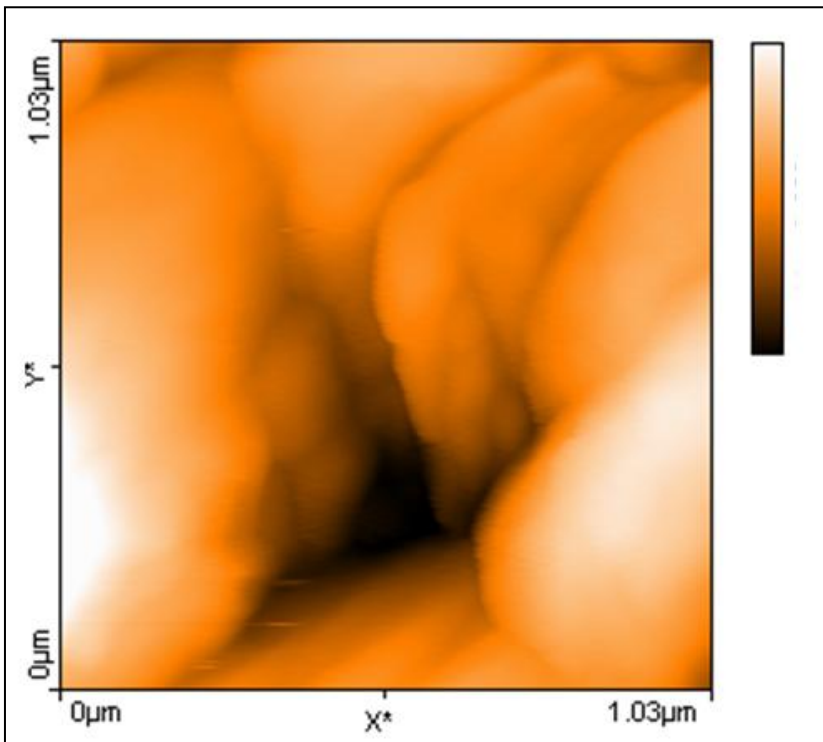


Figura 4.35b. Imagen de microscopía de fuerza atómica de muestra del músculo del manto de *D. gigas*. Detalle de una celda.

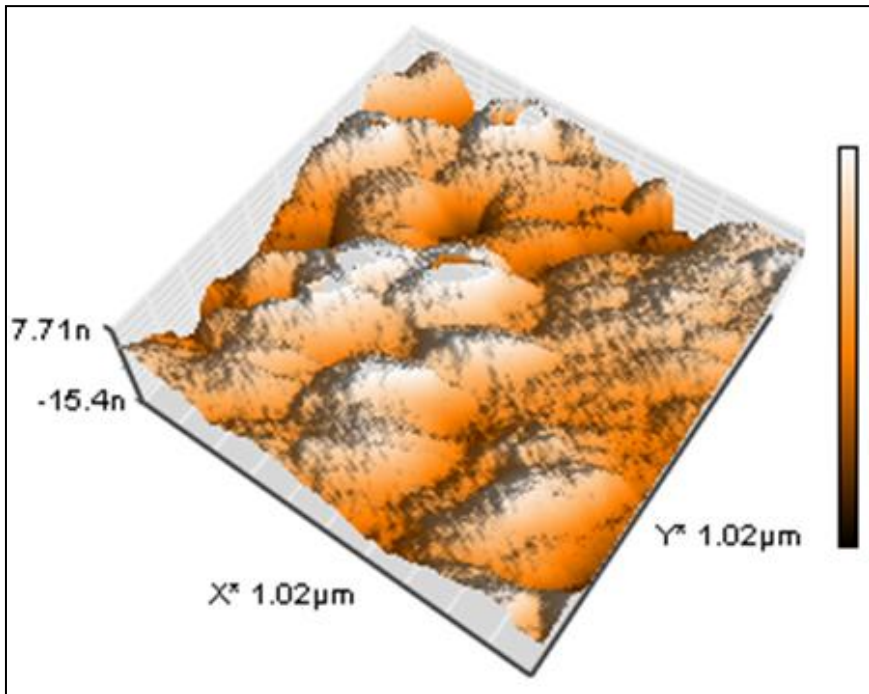


Figura 4.35c. Imagen de microscopía de fuerza atómica de muestra del músculo del manto de *D. gigas*. Topografía exterior.

3.2. Análisis reológico y térmico

Se utilizó ensayos de calorimetría de barrido diferencial (DSC) para estudiar las transiciones térmicas que ocurren en las muestras de DGM. Se hicieron las pruebas de DSC tanto para muestras frescas (recién extraídas) como para muestras liofilizadas. En el caso de las

muestras frescas (Figura 4.36), se halló un pico endotérmico entre 90-120 °C. Este pico endotérmico puede asociarse a la evaporación del agua en la muestra. El análisis termo-gravimétrico (TGA) de una muestra fresca (Figura 4.38) revela que el contenido de agua es de alrededor de 85%. Esta cantidad alta de agua junto con el hecho de que el DGM no puede rehidratarse luego de perder agua recuerda las características de otra estructura natural, la celulosa bacteriana.

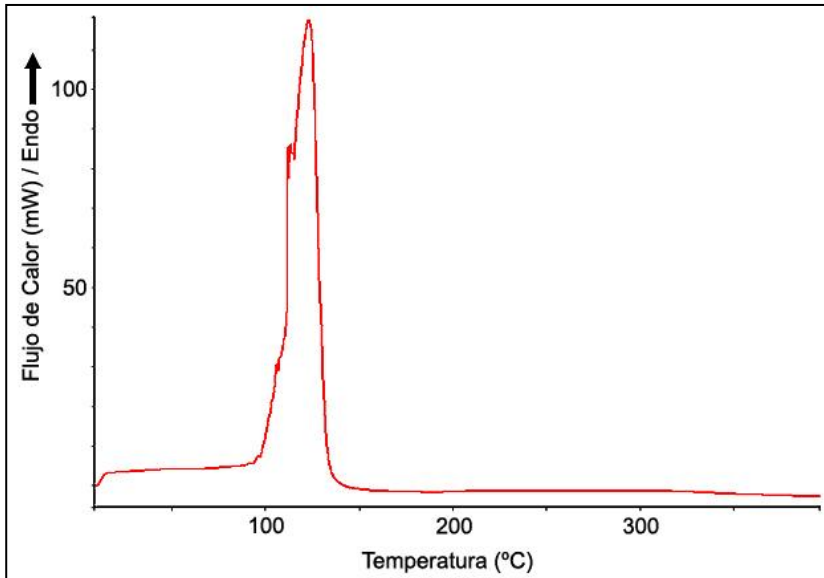


Figura 4.36. Curva de flujo de calor en función de la temperatura de una muestra recién extraída del manto de *D. gigas*.

La celulosa bacteriana es un gel formado por una red de nanofibras de celulosa. Iguchi (Iguchi et al., 2006) ya ha reportado que los geles de celulosa bacteriana no pueden rehidratarse una vez que pierden agua. Cabe resaltar que posteriormente las similitudes entre la celulosa bacteriana y el DGM se extienden a su respuesta mecánica ante la aplicación de un esfuerzo. Dichas similitudes serán discutidas luego.

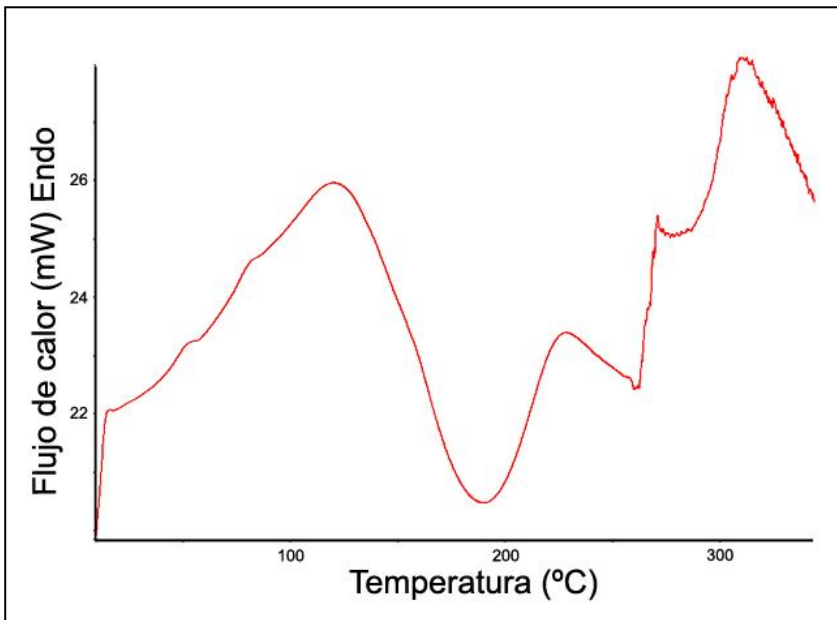


Figura 4.37. Curva de flujo de calor en función de la temperatura de una muestra liofilizada del manto de *D. gigas*.

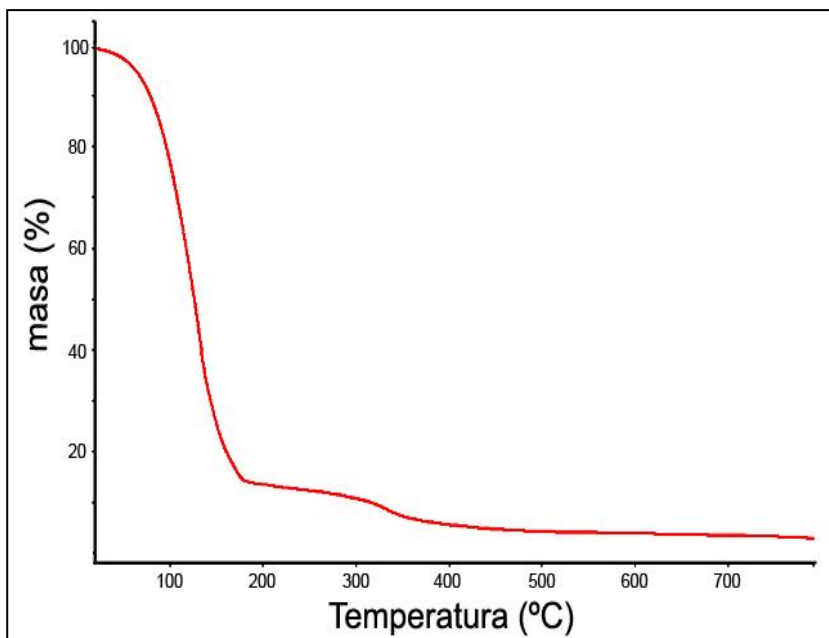


Figura 4.38. Variación de la masa con respecto a la temperatura de una muestra fresca de *D. gigas*. El contenido de agua de la muestra es de 85%.

Para evitar la influencia del agua en el estudio de las propiedades térmicas del DGM, se hicieron pruebas con muestras liofilizadas. La Figura 4.37 muestra diferentes picos endotérmicos alrededor 120 °C, 220 °C y 315 °C. Estos picos se han encontrado también en otros estudios (Paredi et al., 1996; Rodger, et al., 1984; Hasting et al., 1985). Sikorski y colaboradores (Sikorski et al., 1986) afirman que el colágeno es la proteína principal en el DGM (alrededor de 3-11% de la masa total), dependiendo de la especie. Según Paredi y colaboradores (Paredi et al., 1996), los picos endotérmicos que se aprecian en los Termogramas de DSC deben ser atribuidos a los procesos de las proteínas que forman el DGM.

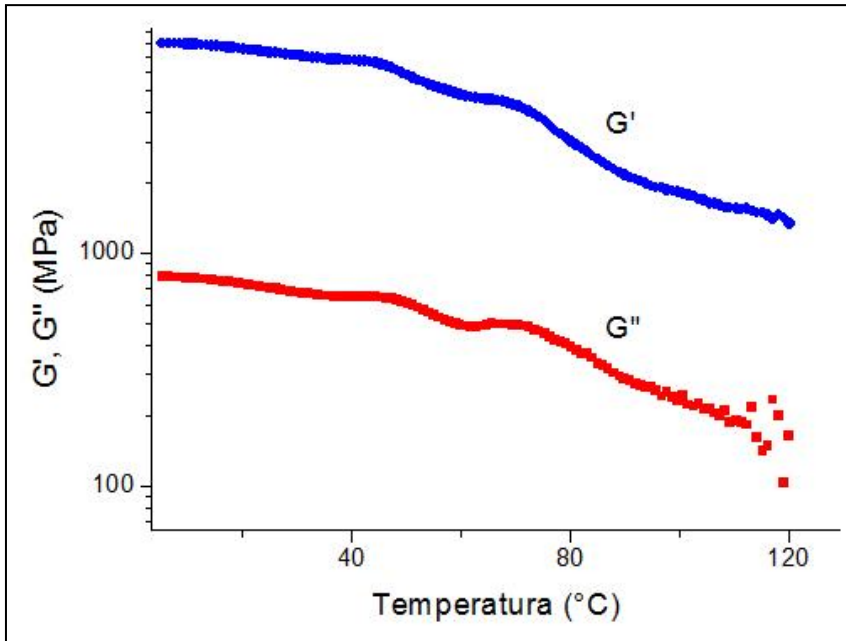


Figura 4.39. Variación del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') con respecto a la temperatura de una muestra del manto de *D. gigas*.

El efecto de la desnaturalización de las proteínas también puede observarse en las pruebas reológicas. La Figura 4.39 presenta la variación del módulo de almacenamiento (G') y del módulo de pérdida (G'') con respecto a la temperatura. Se observa un cambio gradual en G' y G'' a partir de 50-70 °C.

La Figura 4.40 muestra el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') como una función de la frecuencia aplicada. Hasta 8 Hz, los valores de G' y G'' dependen de la frecuencia

siguiendo una ley de potencia con exponentes 0.056 y 0.071, respectivamente. Para este nivel de frecuencia la muestra tiene comportamiento predominantemente elástico ($G' > G''$). Más allá de los 8 Hz, los módulos no siguen ninguna ley de potencia y a partir de los 20 Hz el comportamiento viscoso se vuelve predominante.

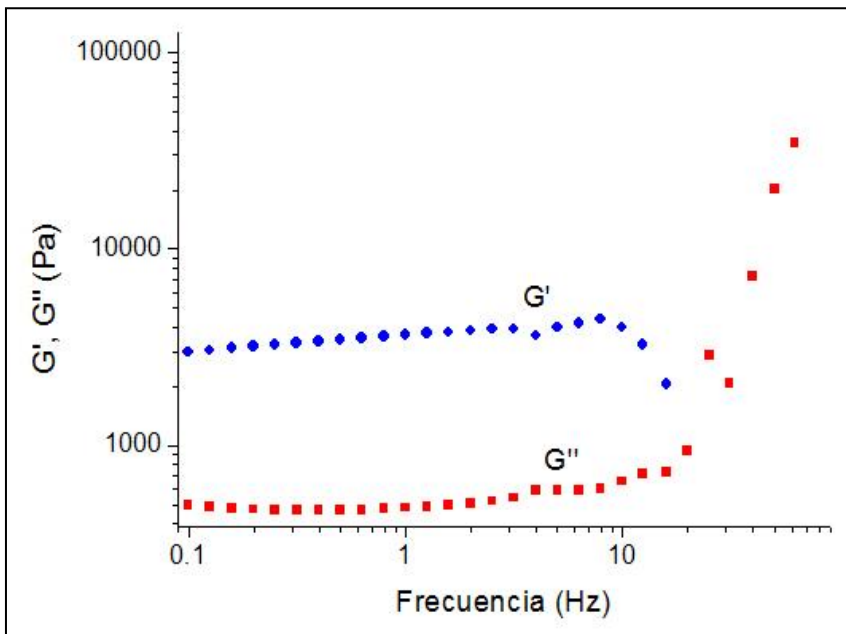


Figura 4.40. Variación del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') con respecto a la frecuencia de una muestra del manto de *D. gigas*

La Figura 4.41 muestra el módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdidas (G'') como una función del esfuerzo oscilatorio aplicado. Cuando el esfuerzo aplicado es menor de 1 Pa, las curvas de G' y G'' muestran una región lineal casi donde los valores de los módulos son casi constantes.

Cuando el esfuerzo está entre 1 Pa y 100 Pa, los módulos de almacenamiento (G') y de pérdidas (G'') siguen un comportamiento que se conoce como “ablandamiento por esfuerzo reversible” (RSS, *reversible stress softening*). Las flechas en la Figura 4.41 indican que el ensayo se ha llevado a cabo en dos ciclos sucesivos (barrido de esfuerzo desde 0 Pa hasta 100 Pa e, inmediatamente después, barrido desde 100 Pa hasta 0 Pa). En el primer ciclo se observa que el valor de G' comienza a caer (ablandamiento) y el valor de G'' comienza a subir a partir de 10 Pa. Notar que este ablandamiento es reversible porque en el segundo ciclo el valor de G' se recupera gradualmente hasta llegar a los valores iniciales del primer ciclo.

El fenómeno de ablandamiento (caída del valor de G' al aumentar el valor del esfuerzo aplicado) es típico de tejidos vivos blandos y se conoce como el efecto Mullins (Chu et al., 1972). El efecto Mullins fue reportado originalmente para materiales similares a la goma rellenas o no rellenas (Mullins, 1947).

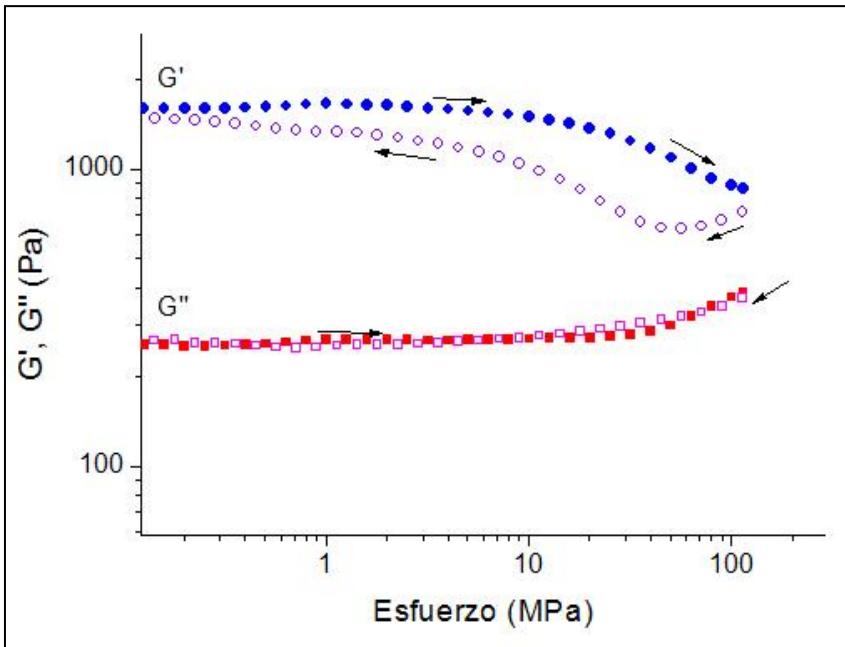


Figura 4.41. Variación del módulo de almacenamiento (G') y el módulo de pérdida (G'') con respecto al esfuerzo aplicado de una muestra del manto de *D. gigas*.

En el caso de tejidos vivos, Volokh (Volokh, 2008) propone que este ablandamiento se debe a la falla mecánica de los tejidos al producirse rupturas en las fibras y otros elementos que los forman. El ablandamiento de las redes de F-actina/ α -actinina (Xu et al., 2000), F-actina/gelosina (Janmey et al., 1990) y de las redes de microtúbulos (Lin et al., 2007) se han explicado en términos de la rotura de las fibras que forman dichas redes. En este contexto, este ablandamiento se ha entendido como una alteración permanente de

las redes a causa del rompimiento de las fibras (Mackintosh et al., 2007).

Nuestros resultados muestran que después de un ciclo de carga, donde ocurre el ablandamiento, G' recuperan sus valores iniciales una vez que se reduce el esfuerzo (aunque se observe algo de histéresis). Este fenómeno de RSS se ha reportado ampliamente para otros tipos de redes de biopolímeros, como las redes de actina y celulosa (Chaudhuri et al., 2007; Speich et al., 2005). Para el caso del RSS, la recuperación del valor de módulo de almacenamiento indica que el ablandamiento no puede ser explicado por la rotura estructural de la red. Es razonable pensar que exista otro mecanismo que cause el ablandamiento inicial.

Por ejemplo, en el caso de las redes de actina, se cree que la reversibilidad ocurre debido a que al aumentar el esfuerzo las fibras fallan por pandeo, lo que provoca la disminución de la rigidez de la red. Las fibras que fallan por pandeo no colapsan por completo y luego recuperan sus propiedades una vez que se reduce el esfuerzo, haciendo que el proceso de ablandamiento sea reversible (Figura 4.42).

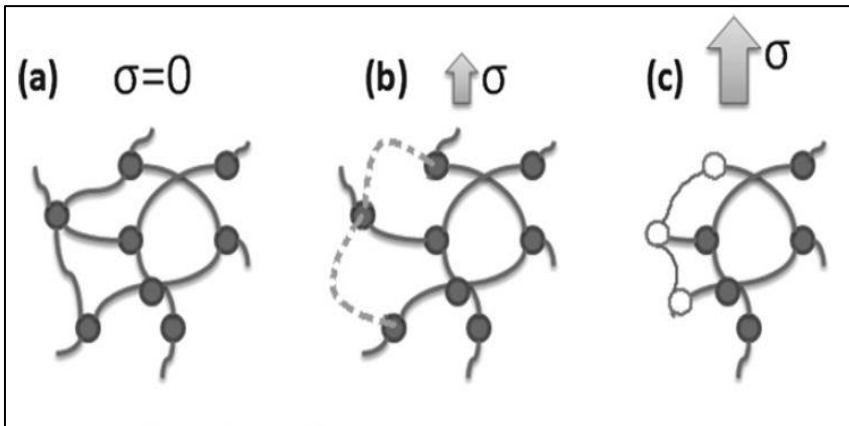


Figura 4.42. Esquema que describe el mecanismo mediante el cual el ablandamiento por esfuerzo podría ser reversible en redes. Al inicio se tiene una red no cargada (a), luego el esfuerzo comienza a transmitirse a las fibras y algunas de ellas pandean (líneas discontinuas), de esa forma disminuye la rigidez de la red, finalmente cuando el esfuerzo es retirado (c) las fibras recuperan su forma inicial y la red recupera su rigidez inicial. Adaptado de Torres et al., 2009

El RSS observado en las muestras de D. Gigas, también podría ocurrir debido a la deformación reversible de las paredes de la cavidad. Este comportamiento parece estar de acuerdo con el mecanismo de pandeo reversible que se produce en las redes formadas por túbulos o fibras biológicas.

El RSS también se presenta en otros sistemas biológicos. Por ejemplo, en las redes de celulosa bacteriana también se ha reportado el RSS (Torres et al., 2009). Estas redes están formadas por nanofibras de celulosa unidas por entrecruzamientos físicos que no son permanentes, sino pueden ser destruidos y formados de nuevo. Los estudios de las redes de celulosa sugirieron que el RSS podría

ser el mecanismo que permite a las paredes de las células vegetales expandirse y crecer, y soportar la llamada presión de turgencia que impulsa el crecimiento de las plantas.

Por otro lado, las redes de actina también presentan el fenómeno de RSS. Las redes de actina son de estructuras que simulan el exoesqueleto de células animales. Las células animales, incluyendo células humanas son conocidas por tener respuestas ante distintos estímulos mecánicos (Banes et al., 1995; Chiquet et al., 2003; Liu et al., 2006). Por ejemplo, la mecano-transducción en las células es un proceso en el que los cambios en la forma del citoesqueleto transmiten información (estímulos) al núcleo celular sobre las condiciones del ambiente alrededor de la célula (forma, flujo, presión, etc.) (Dalby, 2005).

El fenómeno de RSS ocurre en estas redes (DGM, celulosa y actina) pese a que presentan diferencias estructurales. El DGM tiene fibras de alrededor de 400 nm de diámetro, mientras que las redes de celulosa bacteriana están formadas por nanofibras de alrededor de 100 nm de diámetro y las redes de actina están formadas por nanofibras de alrededor de 7 nm de diámetro. Debido a la diferencia en las escalas de tamaño, el RSS en redes de actina ha sido estudiado en el pasado por medio de ensayos en un microscopio de fuerza atómica (AFM), mientras que un reómetro estándar se utilizó para estudiar RSS en celulosa bacteriana y DGM.

Además, la naturaleza de los enlaces es diferente. Estudios llevados a cabo sugieren la presencia de colágeno entrecruzado insoluble en el manto de los calamares (Ando et al., 1999) mientras que las

nanofibras de actina presentan enlaces químicos (Chaudhuri et al., 2007; Shin et al., 2003). Por el contrario, las fibras de celulosa bacteriana tienen enlaces físicos.

Los resultados presentados aquí, confirman que el fenómeno de RSS se produce en diferentes sistemas biológicos como las redes de actina, celulosa bacteriana y el DGM. Se necesitan más investigaciones para determinar las características comunes de las redes que muestran RSS.

Capítulo 5
Conclusiones

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Para los tres sistemas estudiados se logró relacionar los resultados experimentales con modelos que contribuyen a explicar el funcionamiento de dichos materiales. Por ejemplo, para los bisos de mejillones se encontró que la respuesta mecánica dependía fuertemente del medio en el que está el material. En aire, el biso seco responde como un material elasto-plástico y los resultados experimentales pueden ser modelados con una ley de potencia. En cambio, en agua (destilada o de mar) los resultados experimentales pueden ser modelados usando la ecuación de Mooney-Rivlin, desarrollada para elastómeros. Esto sugiere que el biso se comporta como un elastómero y que su deformación se debe principalmente a mecanismos entrópicos. Ello fue verificado con los ensayos de tensión a diferentes temperaturas en los que se vio que el módulo de Young de las fibras estaba en relación directa con la temperatura del medio.

En el caso de la membrana de huevo hubo similitudes con los bisos de mejillones. Incluso, de nuevo se usó la ecuación de

Mooney-Rivlin para modelar los resultados experimentales de una región de la curva de esfuerzo-deformación. Con ello se vio que la respuesta mecánica dependía de mecanismos entrópicos y entálpicos. Sin embargo se encontró que la contribución entálpica era más importante y, a diferencia de los bisos de mejillones, el módulo de Young de la membrana tiene una relación inversa con la temperatura. Además se aplicó el análisis de sólidos celulares de Gibson para relacionar las propiedades mecánicas de las fibras individuales con las propiedades mecánicas de la red.

El caso del músculo del manto del calamar gigante fue utilizado para estudiar una red tridimensional coherente. Se encontró que esta red también ocurre el fenómeno de ablandamiento por esfuerzo reversible. Dicho fenómeno ocurre en varios sistemas biológicos y está relacionado con las funciones que dicho sistema debe cumplir. Por ejemplo, en las redes de celulosa, el ablandamiento reversible podría jugar un rol importante en la división de las células vegetales.

Capítulo 6

Referencias Bibliográficas

CAPITULO 6. REFERENCIAS

Abrahams, M., Mechanical behavior of tendon in vitro, *Med Biol Eng*, 5: 433–43, 1967.

Aldred, N.; Ista, L.K.; Callow, M.E.; Callow, J.A.; Lopez, G.P.; Clare, A.S.; Mussel (*Mytilus edulis*) byssus deposition in response to variations in surface wettability; *J R Soc Interface* 3: 37–43. 2006.

Allen, J.A.; Cook, M.; Jackson, D.J.; Preston, S.;Worth, E.M.; Observations on the rate of production and mechanical properties of the byssus threads of *Mytilus edulis*; *J. moll. Stud.* 42: 279–289. 1976.

Anderson, C.I.H., Rodhouse, P.G. Life cycles, oceanography and variability: ommastrephid squid in variable oceanographic environments, *Fish. Res.* 54 (2001) 133–143. Anderson & Rodhouse, 2001.

Ando, M.; Ando, M.; Tsukamasa, Y.; Makinodan, Y.; Miyoshi, M., Muscle firmness and structure of raw and cooked arrow squid mantle as affected by freshness, *J. Food Sci.* 64, 659–662, 1999.

Argüelles, J., Tafur, R., Taipe, A., Villegas, P., Keyl, F., Domínguez, N., Salazar, M. Size increment of jumbo flying squid *Dosidicus gigas* mature females in Peruvian waters, 1989–2004, *Prog. Oceanogr.* 79 (2008) 308–312. Argüelles et al, 2008.

Artz, E.; Gorb, S.; Spolenak, R. From micro to nano contacts in biological attachment devices. *PNAS*, 100(19): 10603-10606. 2003.

Bairati, A. The byssus of the mussel *Mytilus* from the molecules to the organ: functional performance resides in the ultrastructural

assembly. In: Lanzavecchia G, Valvassori R, editors. Form and function in zoology. Modena: Mucchi Editore; p. 163–77. 1991.

Banes, A. J.; Tsuzaki, M.; Yamamoto, J.; Brigman, B.; Fischer, T.; Brown, T.; Miller, L., Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals, *Biochem. Cell Biol.* 73, 349–365, 1995

Baumann, C. G.; Smith, S. B.; Bloomfield, V. A.; Bustamante, C., Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules, *PNAS* 94, 6185–6190, 1997.

Bell, E. C.; Gosline, J. M. Mechanical design of mussel byssus: material yield enhances attachment strength. *The Journal of Experimental Biology*, 199, 1005–1017. 1996.

Bella, J.; Brodsky, B.; Berman, H. M., Hydration structure of a collagen peptide, *Structure*, 3: 893–906, 1995.

Bhattacharjee A., Bansal, M.: Collagen structure: The Madras triple helix and the current scenario. *IUBMB Life* 57, 161, 2005.

Bigi, A.; Cojazzi, G.; Roveri, N.; Koch, M. H. J., Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction study of tendon collagen thermal denaturation, *Int J Biol Macromol*, 9: 363–7, 1987.

Birk, D.E., Fitch, J.M., Babiarz, J.P., Linsenmayer, T.F. Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma, *J. Cell Biol.* 106, 999–1008. 1988.

Boedtker, H., Doty, P. The native and denatured states of soluble collagen. *Journal of the American Chemical Society*, 78(17), 4267–4280. 1956.

Bonser, R. H. C.; Purslow, P. P., The Young's modulus of feather keratin, *J Exp Biol*, 198: 1029–33, 1995.

- Borel J.P., Monboisse, J.C.: Collagens—Why such a complicated structure. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 187, 124, 1993.
- Brazeo, S. L.; Carrington, E.; Interspecific comparison of the mechanical properties of mussel byssus. *Biol Bull*; 211: 263-274. 2006.
- Buehler, M. J.; Wong, S. Y., Entropic Elasticity controls nanomechanics of single tropocollagen molecules, *Biophys J*, 93: 37–43, 2007.
- Buehler, M.J. Atomistic and continuum modeling of mechanical properties of collagen: Elasticity, fracture, and self-assembly. *J. Mater. Res.*, Vol. 21, No. 8. 2006.
- Bustamante, C.; Marko, J. F.; Siggia, E. D.; Smith, S.; Entropic elasticity of lambda-phage DNA, *Science*, 265:1599-1600,1994.
- Campo-Deaño, L., Tovar, C.A., Pombo, M.J., Solas, M.T., Borderías, A.J. Rheological study of giant squid surimi (*Dosidicus gigas*) made by two methods with different cryoprotectants added, *J. Food Eng.* 94 (2009) 26–33. Campo-Deaño et al, 2009.
- Carrington, E.; Gosline, J.M.; Mechanical design of mussel byssus: load cycle and strain rate dependence; *American Malacological Bulletin* 18:135-142. 2004.
- Chae, Y.; Aguilar, G.; Lavernia, E. J.; Wong, B. J. F., Characterization of temperature dependent mechanical behavior of cartilage, *Lasers Surg Med*, 32: 271–8, 2003.
- Chaudhuri, O.; Parekh, S. H.; Fletcher, D. A., Reversible stress softening of actin networks, *Nature* 445, 295–298, 2007.
- Chiquet, M.; Sarasa-Renedo, A.; Huber, F.; Fluck, M., How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production? *Matrix Biol.* 22, 73–80, 2003.

Choi MMF, Pang WSH, Xiao D, Wu X. An optical glucose biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Analyst*;126:1558–63. 2001.

Chu, B. M.; Frasher, W. G.; Wayland, H., Hysteretic behavior of soft living animal tissue, *Ann. Biomed. Eng.* 1, 182–203, 1972.

Coombs, T.L.; Keller, P.J.; Mytilus byssal threads as an environmental marker for metals; *Aquat. Toxicol.* 1: 291–300. 1981.

Coyne, K.J.; Qin, X.X.; Waite, J.H.; Extensible collagen in mussel byssus: a natural block copolymer; *Science* 277: 1830–1832. 1997.

Dalby, M. J., Topographically induced direct cell mechanotransduction, *Med. Eng. Phys.* 27, 730–742, 2005.

DeFrate, L. E.; Li, G., The prediction of stress-relaxation of ligaments and tendons using the quasi-linear viscoelastic model, *Biomechan Model Mechanobiol*; 6:245–51. 2007.

Denny, M. W. Wave forces on intertidal organisms: a case study. *Limnol Oceanogr*; 30:1171–87. 1985.

Dolmer, P.; Svane, I.; Attachment and orientation of *Mytilus edulis* in flowing water; *Ophelia* 40: 63–74. 1994.

Durmus E, Celik I, Ozturk A, Ozkan Y, Aydin MF. Evaluation of the potential beneficial effects of ostrich eggshell combined with eggshell membranes in healing of cranial defects in rabbits. *J Int Med Res*; 31:223–30. 2003.

Eckroat, L.; Steele, L. M. Comparative morphology of the byssi of *Dreissena polymorpha* and *Mytilus edulis*. *American Malacological Bulletin*; 10(1): 103-108. 1993.

Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., ... & Sato, C. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with

- chronic hepatitis C virus 1b infection. *New England Journal of Medicine*, 334(2), 77-82. 1996.
- Feughelman M. Natural protein fibers, *J Appl Polym Sci*, 83: 489–507, 2002.
- Fleischmajer, R., MacDonald, E.D., Perlish, J.S., Burgeson, R.E., Fisher, L.W. Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules, *J. Struct. Biol.* 105, 162– 169. 1990.
- Fratzl, P. *Collagen. Structure and Mechanics.* Springer Science & Business Media. 2008.
- Fratzl, P., Weinkamer, R. Nature's hierarchical materials. *Prog Mater Sci* 52: 1263-1334. 2007.
- Fratzl, P.; Misof, K.; Zizak, I.; Rapp, G.; Amenitsch, H.; Bernstorff, S., Fibrillar structure and mechanical properties of collagen, *J Struct Biol*, 122: 119–22, 1997.
- Freed, A. D.; Doehring, T. D., Elastic model for crimped collagen fibrils, *J Biomech Eng*, 127: 587–93, 2005.
- Gardner, J.P.A.; Skibinski, D.O.F.; Biological and physical factors influencing genotype-dependent mortality in hybrid mussel populations; *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71: 235–243. 1991.
- Gelse, K., Pöschl, E., Aigner, T. Collagens—structure, function, and biosynthesis, *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1531–1546. 2003.
- Gibson LJ, Ashby MF. *Cellular Solids: Structure and Properties.* Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
- Gilly, W.F., Markaida, U., Baxter, C.H., Block, B.A., Boustany, A., Zeidberg, L., Reisenbichler, K., Robinson, B., Bazzino, G., Salinas, C. Vertical and horizontal migrations by the jumbo squid *Dosidicus gigas* revealed by electronic tagging, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 324 (2006) 1–17. Gilly et al, 2006.

Gómez-Guillén, C., Borderías, J., Montero, P. Salt, nonmuscle proteins, and hydrocolloids affecting rigidity changes during gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*), *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 616–621. Gómez-Guillén et al, 1997.

Gómez-Guillén, C., Solas, T., Borderías, J., Montero, P. Ultrastructural and rheological changes during the gelation of giant squid (*Dosidicus gigas*) muscle, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 202 (1996) 215–220. Gómez-Guillén et al, 1996.

Gomez-Guillén, M. C., Hurtado, J. L., & Montero, P. Autolysis and protease inhibition effects on dynamic viscoelastic properties during thermal gelation of squid muscle. *Journal of Food Science*, 67(7), 2491–2496. 2002.

Gomez-Guillén, M. C., Montero, P., Solas, M. T., & Borderías, A. J. Thermally induced aggregation of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle proteins. Physicochemical contribution of added ingredients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3440–3446. 1998.

Gosline, J.M.; Lillie, M.; Carrington, E.; Guerette, P.A.; Ortlepp, C.S.; Savage, K.N.; Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Phil Trans R Soc Lond* 357:121-132. 2002.

Gosling, E.M.; Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: Gosling, E.M. (Ed.); *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture Developments in Aquaculture and Fisheries*, pp. 1–20. Elsevier, Amsterdam. 1992.

Gupta, H.S., Seto, J., Wagermaier, W., Zaslansky, P., Boesecke, P., Fratzl, P. Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *PNAS* 103: 17741-17746. 2006.

Hall, C. E., Slayter, H. S. The fibrinogen molecule: its size, shape, and mode of polymerization. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*, 5(1), 11-27. 1959.

Harger, J.R.E.; The effect of wave impact on some aspects of the biology of sea mussels; *Veliger* 12: 401–414. 1970.

Harrington, M.J.; Waite, J.H.; Holdfast heroics: comparing the molecular and mechanical properties of *Mytilus californianus* byssal threads; *J. Exp. Biol.* 210: 4307-4318. 2007.

Hasting, R.J.; Rodger, G.W.; Park, R.; Matthews, A.D.; Anderson, E.M. Differential scanning calorimetry of fish muscle; the effect of processing and species variation, *J. Food Sci.*, 50: 503-506, 1985.

Hellmich C., Ulm, F.J.: Are mineralized tissues open crystal foams reinforced by crosslinked collagen? Some energy arguments. *J. Biomech.* 35, 1199, 2002.

Holten-Andersen, N.; Fantner, G.; Hohlbauch, S.; Waite, J.H.; Zok, F.W.; Protective coatings on extensible biofibres; *Nature Materials* 6: 669-672. 2007.

Hulmes, D.J., Miller, A. Molecular packing in collagen, *Nature* 293, 234– 239. 1981.

Iguchi, M.; Yamanaka, S.; Budhiono, A.; Bacterial cellulose – a masterpiece of nature’s arts, *J. Mater. Sci.*, 35, 261-270, 2000.

Inoue, K.; Takeuchi, Y.; Miki, D.; Odo, S.; Mussel adhesive plaque proteins is a novel member of epidermal growth factor- like gene family; *J. Biol. Chem.* 270: 6698–6701. 1995.

Ishikawa S, Suyama K, Arihara K, Itoh M. Uptake and recovery of gold ions from electroplating wastes using eggshell membrane. *Bioresour Technol*;81:201–6. 2002.

Janmey, P.A.; Hvidt, S.; Lamb, J.; Stossel, T.P., Resemblance of actin-binding protein/actin gels to covalently crosslinked networks, *Nature* 345, 89–92, 1990.

Johnson, K. L. *Contact Mechanics*. Cambridge University Press, Cambridge. 1994.

- Kononov, S., Brewer, K., Sakai, H., Cavalcante, F. S., Sabayanagam, C. R., Ingenito, E. P., & Suki, B. Roles of mechanical forces and collagen failure in the development of elastase-induced emphysema. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(10), 1920-1926. 2001.
- Kopp, J.; Bonnet, M.; Renou, J. P., Effect of cross-linking on collagen-water interactions (a DSC investigation), *Matrix*, 9: 443–50, 1990.
- Lagakos, N.; Jarzynski, J.; Cole, J. H.; Bucaro, J.A., Frequency and temperature dependence of elastic moduli of polymers, *J Appl Phys*, 59: 4017–31, 1986.
- Leach, R.M. Biochemistry of the organic matrix of the eggshell, *Poult. Sci.* 61, 2040–2047. 1982.
- Lee, C.Y.; Lim, S.S.; Owen, M.D.; The rate and strength of byssal reattachment by blue mussels (*Mytilus edulis* L.); *Can. J. Zool.* 68: 2005–2009. 1990.
- Lee, H.; Scherer, F.; Messersmith, P. B.; Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *PNAS*, 103(35): 12999-13003. 2006.
- Liao, Y., McGee, D. L., Cooper, R. S., & Sutkowski, M. B. E. How generalizable are coronary risk prediction models? Comparison of Framingham and two national cohorts. *American heart journal*, 137(5), 837-845. 1999.
- Lin, Y.; Koenderink, G. H.; Mackintosh, F. C.; Weitz, D. A., Viscoelastic properties of microtubule networks, *Macromolecules* 40, 7714–7720, 2007.
- Liu, J.; Liu, T.; Zheng, Y.; Zhao, Z.; Liu, Y.; Cheng, H.; Luo, S.; Chen, Y.; Early responses of osteoblast-like cells to different mechanical signals through various signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 1167–1173, 2006.

Mackintosh, F.C.; Kas, J.; Janmey, P.A.; Elasticity of semiflexible biopolymer networks, *Phys. Rev. Lett.*, 75:4425,1995.

Maeda, K.; Sasaki, Y., An experience of hen-egg membrane as a biological dressing. *Burns*; 8:313–6, 1982.

Markaida, U., Sosa-Nishizaki, O. Food and feeding habits of jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Gulf of California, Mexico, *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 83 (2003) 507–522. Markaida & Nishizaki, 2003.

Martínez-Lage, A.; González-Tizón, A; Méndez, J.; Chromosomal markers in three species of the genus *Mytilus* (Mollusca: Bivalvia); *Heredity* 74: 369–375. 1995.

Mayne, R. Cartilage collagens—what is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum.* 32-3, 241– 246. 1989.

Mayne, R., Burgeson, R.E. *Structure and Function of Collagen Types, Biology of Extracellular Matrix: A Series.* Academic Press. 1987.

Miculescu, F.; Stan, G. E.; Ciocan, L. T.; Miculescu, M.; Berbecaru, A.; Antoniac, I., Cortical bone as resource for producing biomimetic materials for clinical use, *Dig J Nanomater Biostruct*, 7: 1667–77, 2012.

Miles, C. A.; Bailey, A. J., Thermally labile domains in the collagen molecule, *Micron*, 32: 325–32, 2001.

Miles, C. A.; Burjanadze, T. V.; Bailey, A. J., The kinetics of the thermal denaturation of collagen in unrestrained rat tail tendon determined by differential scanning calorimetry, *J Mol Biol*, 245: 437–46, 1995.

- Miles, C. A.; Ghelashvili, M., Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers, *Biophys J*, 76: 3243–52, 1999.
- Misof, K. Landis, W.J., Klaushofer, K., Fratzl, P. Collagen from the osteogenesis imperfect mouse model shows reduced resistance against tensile stress. *J Clin Invest* 100: 40-45. 1997.
- Moeser, G.M.; Carrington, E. Seasonal variation in mussel byssal thread mechanics; *The Journal of Experimental Biology* 209:1996-2003. 2006.
- Mullins, L., Effect of stretching on the properties of rubber, *J. Rubber Res.* 16, 275–300, 1947
- Nakano, T., Ikawa N. I. and Ozimek, L. Chemical Composition of Chicken Eggshell and Shell Membranes, *Poultry Science* 82: 510-514, 2003.
- Nesis, K. N., Levitov, B. S. *Cephalopods of the world: squids, cuttlefishes, octopuses, and allies.* L. A. Burgess (Ed.). TFH. 1987.
- Nigmatullin, Ch.M., Nesisb, K.N., Arkhipkinc, A.I. A review of the biology of the jumbo squid *Dosidicus gigas* (Cephalopoda: Ommastrephidae), *Fish. Res.* 54 (2001) 9–19. Nigmatullina et al, 2001.
- Niyibizi, C., Eyre, D.R. Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site, *Connect. Tissue Res.* 20, 247– 250. 1989.
- Papov, V.V.; Diamond, T.V.; Biemann, K.; Waite, J.H.; Hydroxyarginine- containing polyphenolic proteins in the adhesive plaques of the marine mussel *Mytilus edulis*; *J. Biol. Chem.* 270: 20183–20192. 1995.
- Paredi, M.E.; Tomas, M.C.; Crupkin, M.; Añon, M.C.; Thermal denaturation of muscle proteins from male and female squid (*Illex*

argentines) at different sexual maturation stages. A differential calorimetric study, *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3812-3816, 1996.

PaszeK, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A; Weaver, V. M. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell*, 8(3), 241-254. 2005.

Pearce, T.; LaBarbera, M. (2009); A comparative study of the mechanical properties of Mytilid byssal threads; *Journal of Experimental Biology* 212: 1442-1448.

Pérez-Rigueiro, J.; Elices, M., Guinea, G. V., Controlled supercontraction tailors the tensile behaviour of spider silk. *Polymer*; 44: 3733–6. 2003.

Pérez-Rigueiro, J.; Viney, C.; Llorca, J., Elices, M., Silkworm silk as an engineering material, *J Appl Polym Sci*; 70:2439–47. 1998.

Perez-Rigueiro, J.; Viney, C.; Llorca, J.; Elices, M., Mechanical properties of silkworm silk in liquid media, *Polymer*; 41: 8433–9, 2000.

Price, H.A.; An analysis of factors determining seasonal variation in the byssal attachment strength of *Mytilus edulis*; *J. mar. biol. Ass.U.K.* 62, 147–155. 1982.

Price, H.A.; Seasonal variation in the strength of byssal attachment of the common mussel *Mytilus edulis* L; *J. mar. biol. Ass. U.K.* 60, 1035–1037. 1980.

Qin, X.; Coyne, K.J.; Waite, J.H.; Tough tendons: mussel byssus has collagen with silk-like domains; *J Biol Chem* 272: 32623-32627. 1997.

Qin, X.X.; Waite, J.H.; A potential mediator of collagenous block copolymer gradients in mussel byssal threads; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:10517-10522. 1998.

Radmacher, M. Single molecules feel the force. *Physics world*, 12(9), 33-37. 1999.

Rodger, G.; Weddle, R.B.; Carig, P.; Hastings, R.; Effect of alkaline protease activity on some properties of comminuted squid, *J. Food Sci.*, 49: 117-119-1984.

Roeder, B. A.; Kokini, K., Tensile mechanical properties of threedimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure, *J Biomech Eng*, 124: 214–22, 2002.

Rosert, J., de Crombrughe, B. Type I collagen: structure, synthesis and regulation, in: J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan (Eds.), *Principles in Bone Biology*, Academic Press, Orlando, pp. 189–210. 2002.

Rotsch, C., Braet, F., Wisse, E., & Radmacher, M. AFM imaging and elasticity measurements on living rat liver macrophages. *Cell biology international*, 21(11), 685-696. 1997.

Rzepecki, L.M., Hansen, K.M.; Waite, J.H.; Characterization of a cysteine-rich polyphenolic protein family from *Mytilus edulis*; *Biol. Bull.* 183: 123–137. 1992.

Satcher, R. L.; Dewey, C. F., Theoretical estimates of mechanical properties of the endothelial cell cytoskeleton, *Biophys J*, 71: 109–18, 1996.

Seed, R.; Suchanek, T.H.; Population and community ecology of *Mytilus*. In Gosline, E.G.; *The Mussel Mytilus: Ecology, Physiology, Genetics and Culture*, pp. 87–169. New York: Elsevier 1992.

Shin, J. H.; Gardel, M.L.; Mahedevan, L.; Matsudaira, P.; Weitz, D. A., Relating microstructure to rheology of a bundled and cross-linked F-actin network in vitro, *PNAS* 101, 9636–9641, 2003.

- Sikorski, Z.E.; Kolodziejska, I.; The composition and properties of squid meat, *Food Chem.*, , 20: 213-224, 1986.
- Silver, F. H.; Kato, Y. P.; Ohno, M.; Wasserman, A. J., Analysis of mammalian connective tissue: relationship between hierarchical structures and mechanical properties. *J Long-Term Eff Med Implants*, 2: 165–98, 1992.
- Sionkowska A. Modification of collagen films by ultraviolet irradiation, *Polym Degrad Stab*, 68: 147–51, 2000.
- Sionkowska, A.; Kamińska, A., Thermal helix-coil transition in UV irradiated collagen from rat tail tendon. *Int J Biol Macrol*, 24: 337–40, 1999.
- Smith, S. B.; Cui, Y.; Bustamante, C.; Overstretching B-DNA: The Elastic Response of Individual Double-Stranded and Single-Stranded DNA Molecules, *Science* 1996, 271, 795.
- Smeathers, J.E.; Vincent, J.F.V.; Mechanical properties of mussel byssus threads; *J. moll. Stud.* 45: 219–230. 1979.
- Speich, J. E.; Borgsmiller, L.; Call, C.; Mohr, R.; Ratz, P.H., ROK-induced cross-link formation stiffens passive muscle: reversible strain-induced stress softening in rabbit detrusor, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289, 12–21, 2005.
- Strasser, S.; Zink, A.; Janko, M.; Heckl, W.M., Thalhammer S. Structural investigations on native collagen type I fibrils using AFM, *Biochem Biophys Res Commun*, 354, 27–32, 2007.
- Sun C.; Lucas J.M.; Waite, J.H.; Collagen-Binding Matrix Proteins from Elastomeric Extraorganismic Byssal fibers; *Biomacromolecules* 3: 1240-1248. 2002.
- Sun, C.; Waite, J.H.; Mapping chemical gradients within and along a fibrous structural tissue, mussel byssal threads; *J. Biol. Chem.* 280, 39332–39336. 2005.

Taipe, A., Yamashiro, C., Mariategui, L. Rojas, P., Roque, C. Distribution and concentrations of jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) off the Peruvian coast between 1991 and 1999, *Fish. Res.* 54 (2001) 21–32. Taipe et al, 2001.

Tavassoli M. Effect of the substratum on the growth of CFU-c in continuous marrow culture. *Experientia*;39:411–2. 1983.

Torres, F. G., Troncoso, O. P., & Ruiz, V. A thermomechanical study of elastomeric collagen-based fibers in the wet state. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 2(2), 93-97. 2013.

Torres, F. G.; Troncoso, O. P.; Lopez, D., Grande, C. J.; Gomez, C. M., Reversible stress softening and stress recovery of cellulose networks. *Soft Matter*, 2009.

Torres, F. G.; Troncoso, O. P.; Nakamatsu, J.; Grande, C. J.; Gómez, C. M., Characterization of the nanocomposite laminate structure occurring in fish scales from *Arapaima gigas*. *Mat Sci Eng C*;28 :1276–83, 2008.

Torres, F. G.; Troncoso, O. P.; Piaggio, F.; Hajar, A., Structure-property relationships of a biopolymer network: the eggshell membrane, *Acta Biomater*, 6: 3687–93, 2010.

Trębacz, H.; Wójtowicz K., Thermal stabilization of collagen molecules in bone tissue, *Int J Biol Macromol*, 37: 257–62, 2005.

Troncoso, O. P., Torres, F. G., & Grande, C. J. Characterization of the mechanical properties of tough biopolymer fibres from the mussel byssus of *Aulacomya ater*. *Acta biomaterialia*, 4(4), 1114-1117. 2008.

Troncoso, O.P.; Torres, F.G.; Grande, C.J.; Characterization of the mechanical properties of tough biopolymer fibres from the mussel byssus of *Aulacomya ater*; *Acta Biomaterialia* 4: 1114-1117. 2008.

- Varenberg, M.; Peressadko, S.; Gorb, S.; Arzt, E. Effect of real contact geometry on adhesion. *App Phys Lett*, 89, 121905. 2006.
- Vollrath, F.; Porter, D., Spider silk as archetypal protein elastomer, *Soft Matter*, 2: 377–85, 2006
- Volokh, K.Y., Prediction of arterial failure based on a microstructural bi-layer fiber-matrix model with softening, *J. Biomech.* 41, 447–453, 2008
- von der Mark, K. Localization of collagen types in tissues, *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 9, 265– 324. 1981.
- von der Mark, K. Structure, biosynthesis and gene regulation of collagens in cartilage and bone, *Dynamics of Bone and Cartilage Metabolism*, Academic Press, Orlando, pp. 3– 29. 1999.
- Waite, J. H. Adhesion à la moule. *Integr Comp Biol.*; 42(6):1172–80. 2002.
- Waite, J.H.; Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine- and hydroxyproline-containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel *Mytilus edulis*; *J. Biol. Chem.* 258: 2911–2915. 1983.
- Waite, J.H.; Lichtenegger, H.C.; Stucky, G.D.; Hansma, P.; Exploring the molecular and mechanical gradients in structural bioscaffolds. *Biochemistry* 43: 7653-7662. 2004.
- Watts DC, El Mowafy OM, Grant AA. Temperature-dependence of compressive properties of human dentin. *J Dent Res*; 66:29–32. 1987.
- Weiner, S., Wagner, H.D. The material bone: Structure mechanical function relations. *Ann Rev Mater Sci* 28: 271-298. 1998.
- Weiss, J. A.; Gardiner, J. C., Computational modeling of ligament mechanics, *Crit Rev Biomed Eng*; 29:303–71. 2001.

Wiegemann, M. Adhesion in blue mussels (*Mytilus edulis*) and barnacles (genus *Balanus*): Mechanisms and technical applications. *Aquat Sci*; 67: 166-176, 2005.

Weisenhorn, A. L., Khorsandi, M., Kasas, S., Gotzos, V., & Butt, H. J. Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with an AFM. *Nanotechnology*, 4(2), 106. 1993.

Whitesides, G. M., Grzybowski, B.; Self-Assembly at All Scales *Science*, 295: 2418–2421, 2002.

Wiegand, N.; Vámhidy, L.; Lőrinczy, D., Differential scanning calorimetric examination of ruptured lower limb tendons in human, *J Therm Anal Calorim*, 101: 487–92 2010.

Willett, T. L.; Labow, R. S.; Avery, N. C.; Michael, L. J., Increased proteolysis of collagen in an in vitro tensile overload tendon model, *Ann Biomed Eng*, 35: 1961–72, 2007.

Willis, G.L.; Skibinski D.O.; Variation in strength of attachment to the substrate explains differential mortality in hybrid mussel (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus edulis*) populations; *Mar. Biol.* 112: 403–408. 1992.

Witman J.D.; Suchanek, T.H.; Mussels in flow: drag and dislodgement by epizoans; *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 16: 259–268. 1984.

Xu, J.; Tseng, Y.; Wirtz, D., Strain hardening of actin filament networks. Regulation by the dynamic cross-linking protein alpha-actinin, *J. Biol. Chem.* 275, 35886–35892, 2000.

Yang D, Qi L, Ma J. Hierarchically ordered networks comprising crystalline ZrO₂ tubes through sol–gel mineralization of eggshell membranes. *J Mater Chem*;13:1119–23. 2003b

Yang, J.; Chuang S, Yang W, Tsay P. Egg membrane as a new biological dressing in split-thickness skin graft donor sites: a

preliminary clinical evaluation. *Chang Gung Med J*;26:153–9, 2003a.

Yi, F.; Guo Z, Zhang L, Yu J, Li Q. Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility. *Biomaterials* 25:4591-4599, 2004.

Zeidberg, L.D., Robison, B.H. Invasive range expansion by the Humboldt squid, *Dosidicus gigas*, in the eastern North Pacific, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104 (2007) 12948–12950. Zeidberg & Robinson, 2007.

Zhao, H.; Waite, J. H. Proteins in load-bearing junctions: the histidine-rich metal-binding protein of mussel byssus. *Biochemistry*, 45, 1423–1431. 2006.

Zhao, H.; Waite, J.H.; Coating proteins: Structure and cross-linking in fp-1 from the green shell mussel *Perna canaliculis*; *Biochemistry* 44: 15915-15923. 2005.

Publicaciones

PUBLICACIONES

Esta tesis doctoral ha dado lugar a cinco artículos cuya información se presenta en este libro. Además se presenta otra publicación relacionada a los temas abordados en esta tesis.

Publicaciones principales

1. F. G. Torres; **O. P. Troncoso**; E. R. Rivas; C. G. Gomez; D. Lopez. Reversible stress softening of collagen based networks from the jumbo squid mantle (*Dosidicus gigas*). *Materials Science and Engineering*, 37: 9-13, 2014.
2. F. G. Torres; **O. P. Troncoso**; M. V. Ruiz; A thermomechanical study of elastomeric collagen-based fibers in the wet state. *Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials*, 2: 93-97, 2013.
3. F. G. Torres; **O. P. Troncoso**; M. Montes; The effect of temperature on the mechanical properties of a protein-based biopolymer network. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 111: 1921-1925, 2013.
4. F. G. Torres, **O. P. Troncoso**, F. Piaggio, A. Hajar; Structure-property relationships of a biopolymer network: The eggshell membrane; *Acta Biomaterialia*, 6: 3687-3693, 2010.
5. **O.P. Troncoso**, F. G. Torres, C. Grande, Characterisation of the byssus fibres from *Aulacomya ater*, *Acta Biomaterialia*, 4 (4): 1114-1117, 2008.

Otras publicaciones relacionadas

1. F. G. Torres; **O. P. Troncoso**; D. Lopez; C. Grande; C. M. Gomez; Reversible stress softening and stress recovery of cellulose networks. *Soft Matter* 21, 4185-4190, 2009.

